

FERMENTACION ACETOBUTILICA (ABE) CON CELULAS INMOVILIZADAS DE *Clostridium acetobutylicum*

EDELBERTO SILVA+
DOLLY MONTOYA*
GUSTAVO BUITRAGO*
GLADIZ DAZA
JUAN C. TORRES
HENRY ROMERO

was selected because of its chemical inertia, thermal stability, retention and desorption percent of microorganisms, mechanical strong, density and cost. A pellet was designed with this material using clay as agglomerating, it was hardened at 1100°C. The new support has lower density and larger porosity. Then, the immobilization conditions for the microorganism was established. It was designed a system of 2 packed bed, the first in order to develop the acidogenic phase and the second for the solventogenic phase. The system had a low production of total solvents but the productivity was 1.5 times larger than the batch system.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es la obtención de un soporte para el desarrollo de la fermentación ABE con células inmovilizadas de *C. acetobutylicum*. Se evaluaron doce materiales y se seleccionó la Mica Moscovita en función de su inercia química, estabilidad térmica, retención de microorganismos, porcentaje de desorción de microorganismos, resistencia mecánica, densidad y costo. Con este material se diseñó un "pellet" utilizando como aglomerante arcilla y se endureció por cocción a 1100°C, y se obtuvo un soporte de menor densidad aparente y verdadera, y mayor porosidad. Después se determinaron las condiciones de inmovilización del microorganismo. Se diseñó un sistema de dos columnas empacadas, la primera para el desarrollo de la fase acidogénica y la segunda para la solventogénica. Se obtuvo baja producción de solventes, pero alta productividad, 1.5 veces mayor que en el sistema "batch".

SUMMARY

The aim of this work is to get a support in order to develop the ABE fermentation with immobilized cells of *C. acetobutylicum*. 12 materials were evaluated and Mica Moscovita

INTRODUCCION

La fermentación acetobutílica se ha desarrollado industrialmente solo en sistemas batch, con una baja productividad total (7-8 g. de solventes /L*día) y una concentración final de solventes de 18 a 20 g/L. (1,2,3,4). El desarrollo de sistemas continuos con células inmovilizadas ha logrado mejorar la productividad por unidad de volumen o de tiempo. El hecho que la formación de solventes se dé durante la fase estacionaria, en los cultivos batch, sugiere que los sistemas con células inmovilizadas pueden ser más adecuados que los sistemas con células libres (3). Con la técnica de inmovilización de células viables en estado estacionario se encontró que era posible la producción continua en un proceso de un paso, un aumento notable de las productividades, que se podía usar un medio de cultivo más simple, que la recuperación del producto se facilita al salir el efluente libre de células, que las células son menos sensibles al oxígeno, además de disminuir el tamaño de la planta, la demanda de servicios para la operación de la misma, con la consecuente disminución de costos en todos los aspectos relacionados en la producción de solventes por fermentación (1). Para el desarrollo de este proceso se han inmovilizado esporas (1)(7), células vegetativas activas (6,8,9) y mutantes asporógenos (5), mediante atrapamiento en matrices poliméricas (1,7,5) o por absorción en materiales altamente porosos (6,8,9), en columnas empacadas (1,5,6,7,8,9) o lechos fluidos (5,6), con sistemas abiertos (1,6,7,9) o recirculados (5,6,7,8). Todos estos sistemas dan concentraciones de

* Instituto de Biotecnología.

+ Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.
Universidad Nacional, A.A. 14490. Santafé de Bogotá. Colombia.

solventes en la gran mayoría de aproximadamente 8 g/L, pero cuyas productividades varían entre 67 y 150 g/L*día, por las diferencias en varios aspectos de los sistemas. con este trabajo se pretende llegar a la obtención de un soporte que permita el desarrollo de la fermentación ABE.

MÉTODOS Y MATERIALES

Microorganismos: *Clostridium acetobutylicum* IBUN IV.

Medios de Cultivo: Para conservación y mantenimiento se usa RCM (Reinforced Clostridial Medium). Para Fermentación medio Industrial a base de Melaza (10).

Métodos de Determinación: Para la determinación de biomasa en las fermentaciones batch se usó la correlación entre el peso seco y la absorbancia medida a 540 nm (12). En los sistemas inmovilizados se determinó No. de células por g. de soporte. Para ello se desprenden las células del soporte con solución de Tripsina (1%) en buffer de citratos (0.1 M) pH 4. El conteo de células se hace en cámara de Petrofhauser. Para la evaluación del consumo de sustrato se utilizó el método del ácido dinitro salicílico (11). Se determinó acidez titulable por valoración ácido base con NaOH 0.1N y fenolftaleína como indicador (12). Los solventes se evaluaron por cromatografía de gases "Head Space" (13).

Evaluación de los Soportes: Para esto se usaron diferentes técnicas que describimos a continuación.

- **Estabilidad térmica y pH del agua de Esterilización:** Esterilizar 4 porciones de soporte (1 g), cada una en 10 mL de agua, a 121°C por 15 minutos. Luego se examina la apariencia del soporte y se determina el pH del agua.
- **Inmovilización Pasiva:** Las 4 porciones del soporte se les incuban a 37°C/24 h. en un cultivo de *C. acetobutylicum* IBUN IV en medio industrial. Luego se retira el soporte y se lava con solución salina hasta no detectar la presencia del microorganismo en las aguas de lavado mediante examen directo al microscopio con tinción de Gram, y de esta manera eliminar la biomasa no inmovilizada.
- **Retención de Células:** Una de las cuatro porciones se coloca en 10 mL de medio industrial, se hace choque térmico (80°C/3 min.), e incuban a 37°C/24 h. El crecimiento es indicativo de retención de células.
- **Capacidad de Retención:** Otra porción se lava con 10 mL de solución de tripsina para desprender las células. Colorear con violeta de Gram, hacer las diluciones necesarias y contar el No. de células en cámara de Petrofhauser.

- **Desorción:** Se coloca una tercera porción en 10 mL de medio industrial a pH 4.0 por 24 horas. Luego realizar el conteo de células desprendidas en el medio.
- **Resistencia Mecánica y/o Biológica:** La cuarta porción de soporte se coloca en 10 mL de agua destilada, agitar fuertemente en vortex por 5 min. y ver si el material se fracciona. También se puede observar si durante la fermentación el soporte se degrada.

Fermentación en Cultivo Continuo: Colocar 200 mL del "stock" de esporas del microorganismo en 3 mL de medio RCM, activar con choque térmico (80°C/3 min.) e incubar a 37°C por 24-36 horas. Después adicionar 7 mL de medio RCM fresco e incuban por 8 horas. Este preinóculo se trasfiere a 100 mL de medio industrial e incuban por 24 horas. Luego se pasa a un fermentador que contiene 1 L de medio industrial y el cual esta a 35°C y agitado a 200 rpm. Al cabo de las 24 horas de fermentación mediante una bomba peristáltica se recircula el cultivo através de las columnas empacadas con el soporte (Figura No. 1) por el tiempo necesario para lograr la máxima cantidad de células inmovilizadas. Una vez terminado el proceso, se retira la biomasa no inmovilizada haciendo circular solución salina esteril, y luego se comienza a hacer circular el medio industrial para dar inicio al proceso de fermentación con células inmovilizadas.

RESULTADOS Y ANALISIS

Selección del Soporte: Se tomaron doce soportes para evaluarlos en relación a pH del agua de esterilización, estabilidad térmica, resistencia mecánica, retención del microorganismo, reutilización y costo. Se seleccionaron cuatro de ellos (perlas de vidrio, gravilla, mica moscovita y ebonita) para evaluarlos en función de su capacidad de retención de microorganismos y su porcentaje de desorción con los siguientes resultados: 9, 20, 16 y 5 millones de células/g de soporte y 50, 18, 15 y 20 % de desorción respectivamente. Como se vé la Gravilla y Mica moscovita mostraron mayor retención de células con el menor porcentaje de desorción, por lo tanto son los soportes de elección. Sin embargo se seleccionó la Mica Moscovita por ser el material menos denso de los dos, puesto que desde el punto de vista de ingeniería de los procesos con sistemas inmovilizados se prefieren estos últimos ya que facilita el diseño de los montajes y además permite la opción de hacer procesos con lecho fluidizado, cosa que no se puede hacer con materiales muy densos como la gravilla.

SELECCION DEL TAMAÑO Y CARACTERIZACION FISICA: Se evaluaron cuatro tamaños de partícula (mallas 12, 10, 8 y 6) en función de la capacidad de retención

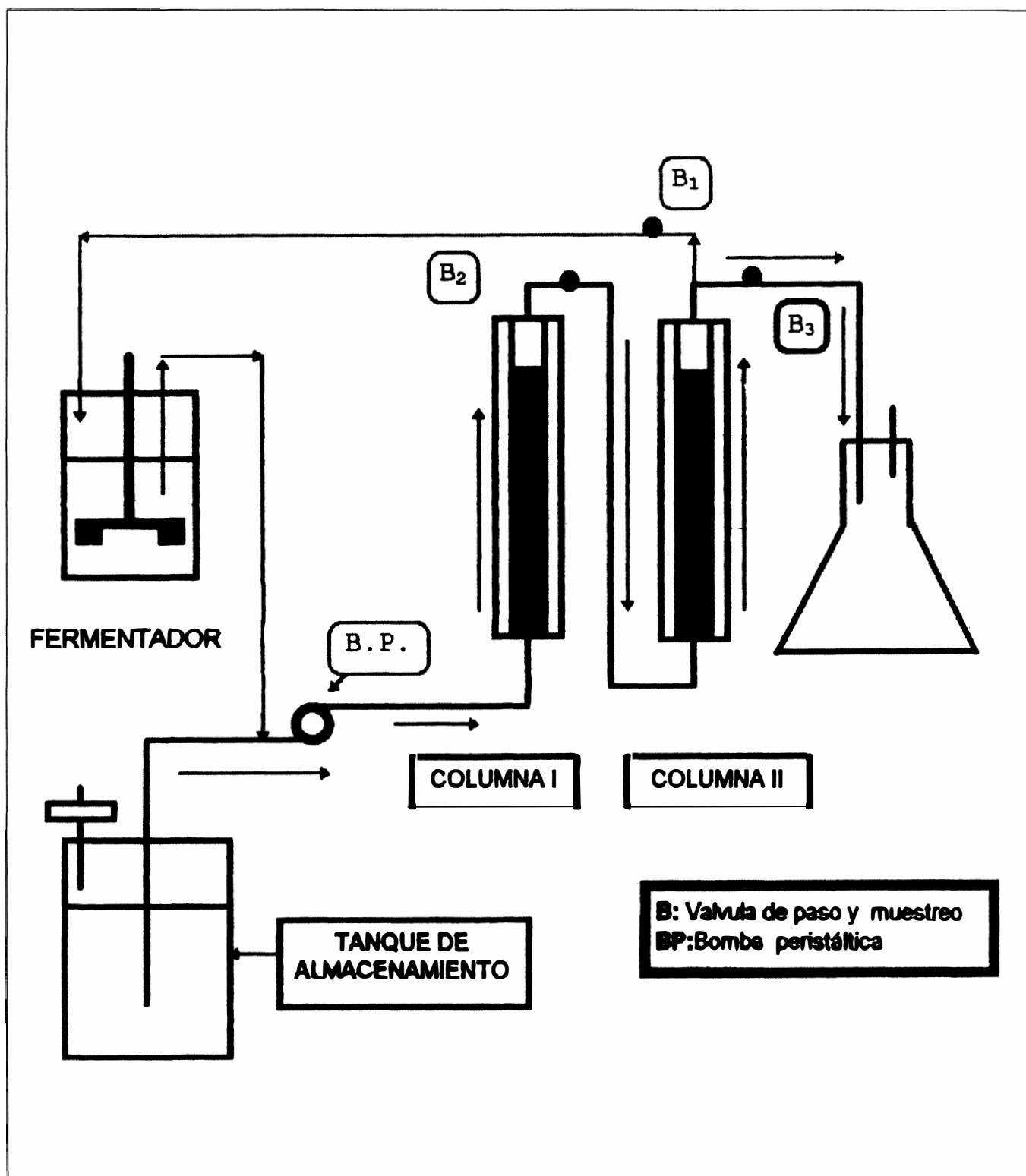


Figura No. 1 Esquema del montaje del sistema de Fermentación con Celulas Inmovilizadas de *Clostridium acetobutylicum*

de células (13.3, 12.4, 16.1 y 11.7 *10⁶ células/g de soporte), por lo tanto el tamaño a seleccionar el de malla 8. Como se ve no hay ninguna correlación entre el tamaño de la partícula y la cantidad de células retenida. Esto puede deberse a que las partículas no son de tamaño uniforme pues la diferencia de apertura entre las mallas hace que el tamaño de partícula este entre la apertura de malla que dejó pasar la partícula y la que la retuvo, adicional a esto la forma no es homogénea (esquistos) acentúa el efecto de distribución de tamaños.

Luego se hizo la caracterización física (Densidad Verdadera: 2.69g/mL, D. Aparente: 1.28 g/mL, Diámetro Equivalente de Partícula: 2.28 mm, Porosidad: 52%). Como se observa las características del material favorecen la retención de los microorganismos, aunque se forma no sea la más apropiada (esquistos) para la hidrodinámica del sistema.

Por esta razón se decidió cambiar la forma del material original de tal manera que pudieramos tener un tamaño uniforme sin detrimento de sus capacidades de retención de microorganismos. Con este objetivo se diseñaron unas tabletas moldeadas compuestas de una mezcla de mica moscovita: arcilla en una proporción de 80:20 respectivamente, las cuales se sometieron a cocción a 1100°C con lo que se obtuvo un material cuyas características se presentan en la Tabla No. 1.

TABLA 1. PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS SOPORTES PARA LA FERMENTACIÓN ABE CON CÉLULAS INMOVILIZADAS.

PROPIEDADES	MICA MOSCOVITA	MICA ARCILLA	ARCILLA ARCILLA
D. Aparente (g/mL)	1.28	1.24	1.07
D. Verdadera (g/mL)	2.69	2.30	2.13
f. de Partícula (mm)	2.28	5.00	2.82
Dureza (Kg-F)	—	>15	>15
Porosidad (%)	52	56	55

Con este tratamiento se logró disminuir la densidad verdadera y aparente con un aumento de la porosidad y la dureza (Tabla No. 1), lo cual hace que sea un material más manejable desde el punto de vista hidrodinámico, pues se alivian las caídas de presión en razón a la uniformidad del material y a la disminución de su densidad, además se pueden aplicar flujos mayores sin ir a desgastar el material. otro punto importante es que al aumentar la porosidad se aumenta la capacidad de adsorción de células. También se determinó la estabilidad térmica y el pH del agua de esterilización (datos no reportados) y junto a esto la liberación de iones a las aguas de lavado y se encontró que el soporte Mica-Arcilla es el que menor cantidad

de iones libera, algunos de estos no afectan el metabolismo del *C. acetobutylicum* (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄⁼) a las concentraciones encontradas y en otros casos favorecen el desarrollo de la fermentación ABE (Ca, Fe, Mg).

CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN Y FERMENTACION: Para desarrollar el proceso se optó por un sistema de dos columnas empacadas con el soporte. El propósito de este diseño es dividir el proceso en dos etapas, la primera correspondiente a una columna productora de ácidos (acético y butírico) y la segunda etapa es una columna en donde se reasimilaban los metabolitos primarios (los ácidos) para ser transformados en los productos finales, acetona, butanol, etanol. Para la inmovilización de los microorganismos en el soporte se optó por hacer recirculación de un cultivo del microorganismo en un punto determinado del proceso de fermentación, por tanto se estudiaron cuales debían ser las condiciones del proceso, tiempo de contacto, y el estado fisiológico del cultivo (Tabla No. 2).

TABLA 2. EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN DEL *C. ACETO BUTYLICUM* EN EL SOPORTE MICA-ARCILLA.

FASE EXPONENCIAL		FASE ESTACIONARIA	
TIEMPO DE CONTACTO (horas)	# CEL.*10 ⁶ por g. de soporte	TIEMPO DE CONTACTO (horas)	# CEL.*10 ⁶ por g. de soporte
3	10.6	3	17.0
5	9.1	8	18.8
17	8.5	12	13.6
24	11.6	25	16.0

Los resultados indican que se debe usar un cultivo en fase estacionaria temprana y por la poca diferencia en la cantidad de células inmovilizadas a los tiempos de contacto evaluados, se optó por 3 horas como el tiempo adecuado para el proceso. Bajo estas premisas se montó un sistema cuyas características están detalladas en la Tabla No. 3.

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA DE LA FERMENTACION ABE CON CELULAS INMOVILIZADAS DE *CLOSTRIDIUM ACETO BUTYLICUM*.

CARACTERÍSTICAS	COLUMNA I	COLUMNA II
Volumen vacío (mL)	26.0	26.0
Cantidad de soporte (g)	60.0	60.0
Flujo (mL/h)	44.0	44.0
Tiempo de residencia (h)	0.56	0.56
Tasa de dilución (h ⁻¹)	1.69	1.69

FERMENTACION ABE CON CELULAS INMOVILIZADAS: En las Figuras Nos. 2 y 3 vemos el comportamiento cinético del sistema. Se observa que el consumo de sustrato (Figura No. 2A) se realiza principalmente en la primera columna, siendo aproximadamente el 91% del total del consumido en el transcurso de la cinética. Otro punto para descartar es que solo se consumió en promedio 17 g/L del sustrato disponible, que equivalen al 47% del total disponible (Tabla No. 4). Este escaso consumo de sustrato se ve reflejado en la acumulación de ácidos y solventes en el caldo de fermentación. La producción de ácidos (Figura No. 2B) tiene el mismo comportamiento que el consumo de sustrato pero las diferencias no són tan marcadas. La tendencia en este parámetro es la ir en aumento, que puede ser una manifestación del deterioro celular, pues al disminuir el consumo de sustrato, el microorganismo requiere mejorar el rendimiento energético, y con la producción de ácidos lo logra, ya que por esta vía obtiene mayor cantidad de ATP por mol de glucosa consumida que por la vía solventogénica (JONNES y WOODS, 1986). La producción de solventes (Figura No. 3A) igual que las anteriores manifiesta el mismo comportamiento la mayor producción se concentra en la primera columna, pero a diferencia de los

otros dos parámetros, al cabo del cuarto día cuando alcanza su máximo valor (0.914 g/L de solventes) para luego caer hasta llegar a ser menor (0.185 g/L de solventes) que en el primer día (0.329 g/L de solventes). Este comportamiento sirve para corroborar lo dicho al comienzo, respecto al deterioro del microorganismo y por tanto de la fermentación.

Nótese como hay una fuerte relación entre el consumo de sustrato y la producción de metabolitos, cuando hay aumento del consumo de sustrato hay aumento en la producción de ácidos y solventes, pero cuando cae el consumo de sustrato (5 día en adelante) la producción de solventes cae drásticamente, más no así la de ácidos, que del quinto día en adelante se recupera. Esto puede ser producto de algún fenómeno de

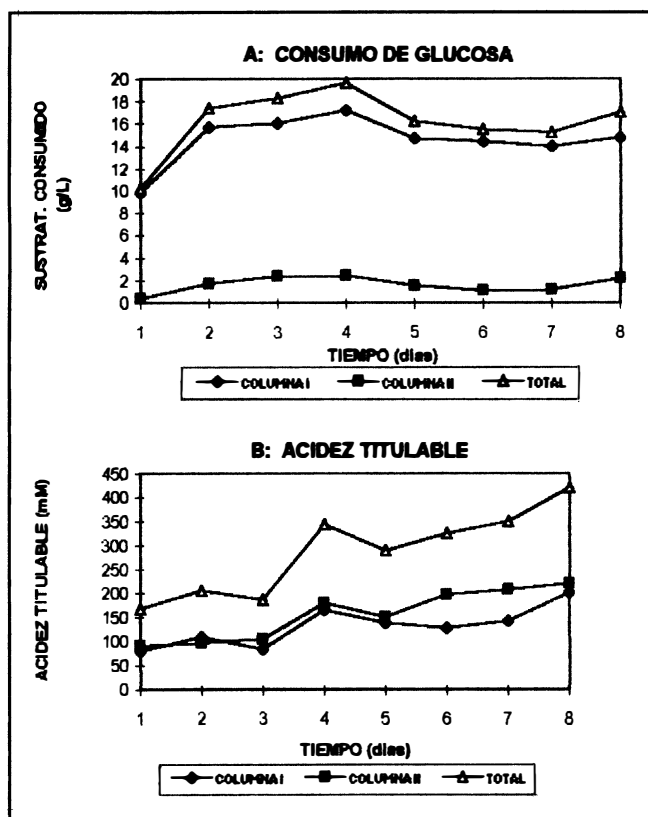


Figura 2. Fermentación Abe con Células Inmovilizadas

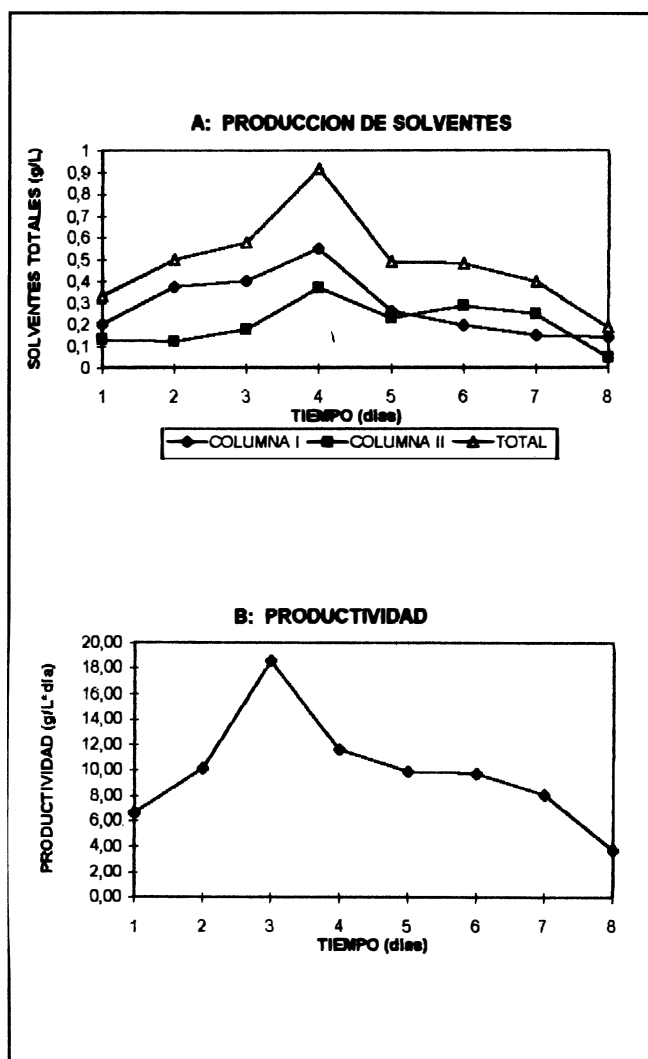


Figura 3. Cinética de Fermentación Abe con Células Inmovilizadas

deterioro celular causado por la acumulación de metabolitos (LINDEN et al, 1986), que impide que se lleve a acabo la reasimilación de los ácidos excretados, para lo cual se requiere consumo de sustrato (JONES y WOODS, 1986). Por otra parte si el microorganismo se deteriora, el puede requerir una mayor cantidad de energía (ATP) por mol de glucosa para su mantenimiento, condición que satisface produciendo ácidos (acético y butírico) que le reporta 4 moles de ATP por mol de glucosa, mientras que por la vía solventogénica solo obtiene dos moles de ATP.

En la Tabla No. 4 podemos ver algunos parámetros que nos permiten determinar el potencial del proceso, estos valores son promedios de los obtenidos en el transcurso del proceso. Si comparamos el mismo proceso desarrollado en sistema "batch" en función de la productividad (Figura 3B), el sistema inmovilizado es mucho más eficiente que el batch, puesto que con el sistema inmovilizado se logró una productividad media de 11.98 g/L*día de solventes y el sistema "batch" se tiene una productividad: 7-8 g/L*día. Esto nos da una idea del enorme potencial que tiene el sistema continuo con células inmovilizadas. Se deben superar problemas como el taponamiento de las columnas por el crecimiento de la biomasa, la baja utilización del sustrato (47 %) y la escasa producción de solventes (menor de 1 g/L). Para superar estos problemas actualmente se está desarrollando un trabajo en cultivo continuo para obtener un medio de cultivo apropiado para procesos continuos, que tiene una dinámica completamente diferente a la de los sistemas batch. Luego se estudiarán los efectos de factores fisicoquímicos como el pH y la temperatura en el desarrollo de los sistemas de cultivo continuo y en especial con células inmovilizadas para hacer frente al problema del taponamiento de las columnas por crecimiento celular y mejorar la transformación de sustrato en solvente, para al menos llegar al límite mayor obtenido en sistemas continuos con células libres que es de 12 g/L (SILVA, 1989), con lo cual la productividad se dispararía en un orden de magnitud y sería un sistema mucho más eficiente que el batch, lo que tendría un enorme impacto en los costos de producción del proceso. Para terminar se puede afirmar que se ha logrado desarrollar un soporte que permite la colonización del microorganismo pero que falta ajustar algunos parámetros que le permitirán desarrollar el proceso de fermentación con mayor eficiencia.

TABLA 4. PARAMETROS DE LA FERMENTACION ABE CON CELULAS INMOVILIZADAS DEL *Clostridium acetobutylicum*.

PARAMETRO	TOTAL
Sustrato Consumido (g/L)	17,0
Porcentaje de Consumo de Sustrato (%)	47,0
Producción de Solventes Totales (g/L)	0.59
Productividad (g/L*día)	11.98

BIBLIOGRAFIA

1. L. HAGGSTROM and S. O. ENFORS. *Biochem. Biotechnol.* **7**, 3 (1982).
2. M. T. WALTON and J. L. MARTIN. "Microbial Technology". J. PEPLER and D. PERLMAN. Edits. 2nd. Edit. 1979. Volumen 1. Pp 187-209.
3. D. T. JONES and D. R. WOODS. *Microbiol. Rev.* **50**, 484 (1986).
4. J. C. LINDEN, A. R. MOREIRA and G. LENZ. "Comprehensive Biotechnology. The Principles of Biotechnology: Engineering Consideration". C. L. CONNEY and A. E. HUMPHREY Edits. 1986. Pp. 915-931.
5. S. T. LARGIER, S. LONG, J. D. SANTANGELO, J. D. JONES and D. R. WOODS. *App. Environ. Microb.* **50**, 477 (1985).
6. N. QURESHI and I. S. MADOX. *Bioproc. Eng.* **3**, 69 (1988).
7. K. F. REARDON and J. E. BAILEY. *Biotechn. Bioeng.* **34**, 825 (1989).
8. C. H. PARK, M. R. OKOS and P. C. WANKA. *Biotechn. Bioeng.* **34**, 18 (1989).
9. A. FRIEDL, N. QURESHI and I. MADOX. *Biotech. Bioeng.* **38**, 518 (1991).
10. J. SIERRA y R. ACOSTA. *Estandarización y optimización de un medio de cultivo industrial para la fermentación acetobutílica*. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. (1987).
11. D. RAMIREZ y R. ARAMENDIS. "Selección y caracterización de un soporte para la inmovilización de *Kluyveromyces fragilis* con actividad B-D Galactosidasa". Tesis. Universidad Nacional de Colombia. (1989).
12. J. DUMAR y J. M. GRANADOS. "Estandarización de técnicas analíticas para la determinación de parámetros cinéticos en la fermentación acetobutílica". Tesis. Universidad Nacional de Colombia. (1987).
13. E. SILVA. "Producción de butanol y acetona por cultivo continuo con células de *Clostridium acetobutylicum*". Tesis. Universidad Nacional de Colombia. (1989).