

OBTENCION DE ACIDO ACETICO POR FERMENTACION CONTINUA A PARTIR DE ALMIDON DE YUCA

FERNANDO ZAUSCHER V.
Químico, Universidad Nacional
Ph.D. Universidad de California
Profesor Asociado, UIS

JORGE CASTELLANOS
Ing. Químico, UIS

GUSTAVO DUARTE
Ing. Químico, UIS

RESUMEN

El almidón de yuca (*Manihot Esculenta*) se sometió a hidrólisis enzimática obteniendo un rendimiento del 82.81%. El análisis estadístico de la hidrólisis permitió plantear un modelo lineal que representa matemáticamente este proceso con las variables que resultaron significativas al nivel del 95%. La hidrólisis sigue el modelo cinético propuesto por Michaelis-Menten.

Se procedió enseguida a fermentar la glucosa obtenida por hidrólisis utilizando la *Saccharomices cerevisiae* como biocatalizador para obtener etanol. A las 30 horas de fermentación se observó la mayor velocidad de crecimiento celular (7.37×10^6 Mo/ml.h). La formación del producto llega a su mayor velocidad a las 38 horas. El sustrato proveniente de la fermentación alcohólica se sometió a la acción biocatalítica del *Acetobacter Aceti* para obtener ácido acético en forma continua a nivel de laboratorio. Se estudiaron y seleccionaron las mejores condiciones de operación y los nutrientes más adecuados.

Se observó que la máxima velocidad de crecimiento celular es de 1.2121×10^8 Mo/ml.h, la cual se obtiene a las 49 horas de proceso y la velocidad específica de crecimiento celular es de 0.059 h^{-1} .

El ciclo de tiempo óptimo es de 17 horas, al cabo de las cuales se retira ácido y se renueva el sustrato para obtener una productividad de 0.083 g/l.h. de ácido con una concentración de 7.4 g/100 ml . Se calcularon los valores experimentales para la ecuación de Michaelis-Menten.

INTRODUCCION

El objetivo de este estudio consiste en la producción a nivel de laboratorio de ácido acético diluido a partir de almidón de yuca (*Manihot esculenta*), el cual debe someterse previamente a un proceso de hidrólisis enzimática con el fin de transformar los polisacáridos en azúcares fermentables. Enseguida se efectúa la etapa de fermentación alcohólica, usando como biocatalizador la *Saccharomices cerevisiae* y luego se procede a la oxidación del alcohol formado por acción catalítica del *Acetobacter aceti*.

Para cada una de estas etapas se hace una selección de las variables óptimas de operación y se lleva a cabo un estudio de las características cinéticas con el fin de mantener siempre el proceso bajo control y obtener el mayor rendimiento posible.

Datos estadísticos reportados por el DANE (9) sobre el comportamiento de la oferta de vinagre en el país indican que la oferta satisface totalmente la demanda, por lo cual al diseñar una planta para obtener ácido acético glacial se hace necesario incluir el montaje de la planta para obtener vinagre con el fin de asegurar el suministro constante de materia prima.

MATERIALES Y METODOS

Para efectuar la hidrólisis enzimática de la yuca se trabajó con almidón comercial de yuca fresca, a la cual se le determinó el contenido de almidón, fibra y humedad según los procedimientos descritos en el AOAC (5).

El almidón se hidrolizó utilizando las enzimas hidrolíticas presentes en la malta cervecera, la cual se molió hasta grano fino. El proceso se efectuó en un balón de tres bocas de 500 ml., con agitación mecánica, manta de calentamiento y termómetro de control. Para mediciones de pH se usó un potenciómetro digital marca Pracitronic. La glucosa formada se analizó por el método de Lane-Eynon (5).

El almidón hidrolizado se esterilizó en autoclave y se sometió a la fermentación alcohólica usando un reactor de 500 ml. de capacidad y levadura comercial conservada en medio líquido (Wort) o en medio sólido (Agar de Sabouraud). El conteo de células se hizo por medio de la cámara de Nuebauer y la medición de etanol producido en un Cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo 900, equipado con una columna Halcomid M-18 con Carbowax 600 soportado en teflón.

Para la fermentación acética se usaron dos reactores con capacidades de uno y dos litros, agitación magnética, un baño termostático y dos bombas para acuario para el suministro de aire estéril a través de un filtro relleno con lana de vidrio. Las muestras de ácido acético se sometían a destilación fraccionada y luego se analizaban en el Cromatógrafo de Gases. El biocatalizador usado fue el *A. aceti*, el cual se aisló de un vinagre casero y se mantuvo en el medio de cultivo 66. Todo este material se esterilizó antes de cada experimento. La composición por litro del medio de cultivo 66 fue la siguiente:

Glucosa: 3.0 g; Carbonato de Calcio: 10.0 g;
Extracto de Levadura: 10.0 g

RESULTADOS Y DISCUSION

HIDROLISIS ENZIMATICA

El análisis de almidón de yuca comercial presentó los siguientes resultados:

% almidón : 84.3; % humedad : 9.0; % fibra : 6.7

Inicialmente se ensayaron tres métodos de hidrólisis enzimática para el almidón. En los dos primeros se utilizaron amilasas comerciales marca Novo, según procedimientos descritos en la literatura, usando como sustratos harina de arroz (6) y almidón de arroz (6). Para el tercer método se usó la malta cervecera de la cual ya se conocía su poder hidrolizante por estudios anteriores (4,9). Los resultados obtenidos con estos tres métodos se presentan en la Tabla 1., para tiempos de hidrólisis de 30 minutos, período para el cual se obtuvo el mejor rendimiento.

TABLA 1. Comparación de los resultados obtenidos por tres métodos de hidrólisis enzimática.

| Método | Temperatura °C | | pH | % Rendimiento |
|--------|----------------|------------|-----|---------------|
| | cocción | Hidrólisis | | |
| 1 | 70 | 70 | 7.0 | 15.45 |
| 2 | 92 | 80 | 6.5 | 22.84 |
| 3 | 95 | 60 | 5.0 | 52.15 |

Estos resultados indican que la hidrólisis efectuada con malta presenta un rendimiento notoriamente superior a aquellas efectuadas con enzimas comerciales, probablemente debido a que los dos primeros métodos fueron propuestos para utilizar las amilasas provenientes del *Bacillus subtilis*, pero no las que están presentes en la malta. En cambio el método No 3 fué desarrollado específicamente para las enzimas provenientes de la malta. El procedimiento seguido en el método No 3 se presenta en el Anexo 1.

Se escogió entonces este método para estudiar, mediante la técnica estadística del diseño factorial (7), los efectos de las diferentes variables sobre el rendimiento de la hidrólisis. Las variables independientes estudiadas y sus respectivos valores mínimo y máximo fueron los siguientes:

| | | | |
|---------------------------------|--------|---|--------|
| Concentración del sustrato (%S) | 10.00% | y | 15.00% |
| Relación malta sustrato (M/S) | 0.35% | y | 0.45% |
| Temperatura de hidrólisis (T) | 60.0 | y | 70.0°C |
| pH (pH) | 5.2 | y | 5.6 |

La matriz del diseño factorial y los resultados obtenidos al cabo de 30 minutos de hidrólisis se presentan en la Tabla 2. Los experimentos se efectuaron por duplicado.

TABLA 2. Matriz de diseño y resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática con malta.

| Exp No | Codificación | | | | %S | Variables | | | % Rendimiento Promedio |
|--------|--------------|---|---|---|----|-----------|----|-----|------------------------|
| | A | B | C | D | | M/S | T | pH | |
| 1 | - | - | - | - | 10 | 0.35 | 60 | 5.2 | 75.64 |
| 2 | + | - | - | - | 15 | 0.35 | 60 | 5.2 | 74.42 |
| 3 | - | + | - | - | 10 | 0.45 | 60 | 5.2 | 82.81 |
| 4 | + | + | - | - | 15 | 0.45 | 60 | 5.2 | 78.30 |
| 5 | - | - | + | - | 10 | 0.35 | 70 | 5.2 | 58.60 |
| 6 | + | - | + | - | 15 | 0.35 | 70 | 5.2 | 66.33 |
| 7 | - | + | + | - | 10 | 0.45 | 70 | 5.2 | 68.78 |
| 8 | + | + | + | - | 15 | 0.45 | 70 | 5.2 | 73.32 |
| 9 | - | - | - | + | 10 | 0.35 | 60 | 5.6 | 73.59 |
| 10 | + | - | - | + | 15 | 0.35 | 60 | 5.6 | 71.04 |
| 11 | - | + | - | + | 10 | 0.45 | 60 | 5.6 | 79.86 |
| 12 | + | + | - | + | 15 | 0.45 | 60 | 5.6 | 67.70 |
| 13 | - | - | + | + | 10 | 0.35 | 70 | 5.6 | 56.43 |
| 14 | + | - | + | + | 15 | 0.35 | 70 | 5.6 | 66.34 |
| 15 | - | + | + | + | 10 | 0.45 | 70 | 5.6 | 69.21 |
| 16 | + | + | + | + | 15 | 0.45 | 70 | 5.6 | 79.06 |

Varianza calculada = 2.2969

Las variables están codificadas en la siguiente forma:

$$A = (\%S - 12.5)/2.5; \quad B = ((M/S - 0.40)/0.5);$$

$$C = (T - 65)/5; \quad D = (\text{pH} - 5.4)/0.2$$

De acuerdo a los resultados obtenidos, el mejor rendimiento se obtuvo en el experimento No 3, bajo cuyas condiciones se realizó posteriormente el análisis cinético de la hidrólisis.

Se calculó enseguida la magnitud de los efectos de las variables y sus interacciones utilizando el Algoritmo de Yates (7). El objetivo de este análisis es determinar cuales son los efectos significativos a un nivel de confianza del 95% y poder plantear así una ecuación que defina matemáticamente el proceso y permita hacer predicciones. Resultaron significativas la concentración del sustrato (%S), la relación enzima sustrato (M/S) y la interacción entre la relación enzima sustrato con la temperatura ((M/S)*T).

Con estos datos se plantea el siguiente modelo lineal para la hidrólisis enzimática con malta:

$$\% \text{ Rendimiento} = 71.34 + 3.54*A - 4.08*B + 3.28*B*C$$

En esta ecuación solo intervienen las variables significativas, las cuales están codificadas. Sus respectivos coeficientes corresponden a las magnitudes de sus efectos previamente calculados. El valor del término independiente (71.34) representa el promedio de los rendimientos obtenidos en la hidrólisis.

Enseguida se realizó una experiencia adicional bajo las condiciones del experimento No 3., con el fin de determinar el orden de reacción y estudiar la cinética enzimática. Se tomaron muestras cada 5 minutos, se desactivaron calentando a 95°C en baño María y se analizó su contenido de glucosa.

Para conocer el orden de reacción, se supone inicialmente que puede ser uno, dos o tres y se calcula la constante de velocidad específica k para cada orden, teniendo en cuenta las concentraciones de sustrato S y producto P con respecto al tiempo t. Valores de k aproximadamente constantes indicarán el orden cinético correcto.

En la Tabla 3., se presentan los resultados de este estudio.

TABLA 3. Orden de reacción de la hidrólisis enzimática.

| t min | P g/ml | S g/ml | k n=1 | k n=2 | k n=3 |
|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| 0 | 0 | 0.084 | - | - | - |
| 5 | 0.017 | 0.068 | 0.043 | 0.574 | 7.637 |
| 10 | 0.030 | 0.056 | 0.041 | 0.595 | 8.834 |
| 15 | 0.043 | 0.044 | 0.043 | 0.714 | 12.290 |
| 20 | 0.049 | 0.038 | 0.036 | 0.713 | 13.530 |
| 25 | 0.057 | 0.031 | 0.039 | 0.806 | 17.660 |
| 30 | 0.059 | 0.028 | 0.036 | 0.777 | 18.260 |
| 35 | 0.060 | 0.027 | 0.032 | 0.695 | 16.680 |

- k (n=1) en min^{-1}
- k (n=2) en $\text{ml.g}^{-2}\text{min}^{-1}$
- k (n=3) en $\text{ml}^2.\text{g}^{-2}\text{min}^{-1}$

De estos resultados se deduce que el orden de reacción es uno para la hidrólisis enzimática y el valor de la constante k es de 0.0292 min^{-1} . Este valor es el promedio de los valores hallados en estos experimentos.

Con los mismos datos anteriores para P y S se efectuó el análisis cinético para saber si el proceso sigue el comportamiento descrito por Michaelis-Menten y deducir los valores de la constante de Michaelis k_m y de la velocidad máxima V_{max} . Ver Tabla 4.

TABLA 4. Cálculo de la cinética enzimática.

| t min | P g/ml | S g/ml | V*10 ³ g/ml.min | 1/S ml/g | 1/V ml.min/g |
|----------|-----------|-----------|-------------------------------|-------------|-----------------|
| 0 | 0 | 0.084 | - | 11.86 | - |
| 5 | 0.017 | 0.068 | 3.29 | 14.73 | 303.95 |
| 10 | 0.030 | 0.056 | 2.81 | 17.81 | 354.99 |
| 15 | 0.043 | 0.044 | 2.67 | 22.57 | 374.53 |
| 20 | 0.049 | 0.038 | 2.30 | 26.12 | 434.78 |
| 25 | 0.057 | 0.031 | 2.12 | 32.00 | 471.69 |
| 30 | 0.059 | 0.028 | 1.86 | 35.16 | 537.63 |
| 35 | 0.060 | 0.027 | 1.62 | 36.18 | 617.28 |

t = tiempo; P = Producto; S = sustrato; V = velocidad

La Figura 1., indica el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción enzimática. Se observa que la reacción sigue el comportamiento descrito por Michaelis-Menten. La forma lineal propuesta por Lineweaver-Burk se presenta en la Figura 2., donde se grafica 1/S contra 1/V. La pendiente de la recta representa k_m/V_{max} , el intercepto en la abcisa corresponde a $-1/k_m$ y el intercepto en la ordenada indica el valor de $1/V_{max}$.

En esta forma se obtiene un valor para k_m de 0.08196 g/ml y para V_{max} de $7.246 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml.min}$. Debe tenerse en cuenta que el valor calculado para k_m es la constante para todo el complejo enzimático presente en la malta, por lo cual este valor puede ser diferente de otros reportados para las enzimas amilolíticas puras.

En consecuencia, la ecuación que describe la cinética enzimática con malta es la siguiente:

$$V_o = (V_{max} \cdot S_o) / (k_m + S_o)$$

$$V_o = 3.674 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml.min}$$

Donde V_o es la velocidad inicial de la reacción.

La forma lineal de Lineweaver-Burk toma los siguientes valores:

$$1/V = (k_m/V_{max}) \cdot (1/S) + (1/V_{max})$$

$$1/V = 138 + (11.31/S)$$

FERMENTACION ALCOHOLICA

Todos los experimentos de fermentación alcohólica se efectuaron a 25°C y el volúmen de trabajo fué de 500 ml. No se agregaron nutrientes adicionales a los medios de cultivo Wort Broth para el estado líquido y Agar de Sabouraud para el sólido. La levadura pura y estéril se conservó en la nevera, haciendo repiques frecuentes a un medio más fresco.

Inicialmente se efectuaron varios ensayos a las mismas condiciones de trabajo con el fin de determinar el número apropiado de microorganismos para alcanzar la máxima producción de etanol. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Concentración inicial de glucosa (proveniente del almidón hidrolizado) = 140 g/l

Temperatura = 25°C

pH = entre 4.5 y 5.2

Tiempo de aireación = 30 minutos.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.

TABLA 5. N° de células iniciales para la fermentación alcohólica.

| Células iniciales (MO/mm ³) | Etanol formado g/100 ml |
|--|----------------------------|
| 280 | 2.00 |
| 560 | 4.47 |
| 3500 | 5.99 |
| 5000 | 3.50 |
| 10000 | 3.10 |

MO/ml³ = microorganismos por milímetro cúbico de mosto.

De estos datos se observa que la máxima producción se alcanza con una cantidad inicial de 3500 MO/mm³. Cuando la cantidad inicial de levadura es inferior a esta cifra se presenta una dilución muy grande, por lo cual el tiempo de fermentación será más extenso. Si el número de levaduras es superior, se crea un nivel muy competitivo por los nutrientes, lo que hace disminuir la cantidad de etanol formado.

Con base en esta concentración inicial de células se efectuó entonces una fermentación de la cual se extraían muestras periódicas con el fin de analizar N° de células formadas, azúcar utilizado y etanol producido. Los datos se presentan en la Tabla 6.

Los datos experimentales obtenidos permiten graficar los cambios de estos tres parámetros con respecto al tiempo de fermentación, Ver Figura 3. Se observa que el crecimiento celular permanece aproximadamente constante desde las 36 horas hasta las 48 horas y de ahí en adelante comienza a decrecer. Tanto el consumo de azúcar, como la producción de etanol, se vuelven muy lentos a partir de las 48 horas.

TABLA 6. Datos para calcular la cinética alcohólica

| Tiempo hr | Células MO/ml*10 ⁶ | Azúcar Utilizado g/l | Etanol Formado g/100 ml |
|--------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 0 | 3.5 | 0 | 0 |
| 6 | 4.0 | 1.0 | 0.06 |
| 10 | 7.5 | 3.7 | 0.15 |
| 12 | 12.3 | 4.0 | 0.20 |
| 18 | 19.5 | 16.1 | 0.35 |
| 24 | 58.5 | 27.8 | 0.40 |
| 30 | 76.7 | 52.2 | 1.65 |
| 33 | 120.0 | 70.1 | 1.90 |
| 36 | 145.1 | 88.0 | 3.10 |
| 38 | 140.0 | 97.8 | 3.00 |
| 42 | 143.5 | 107.1 | 3.70 |
| 48 | 151.8 | 110.0 | 5.25 |
| 54 | 134.1 | 112.0 | 5.90 |
| 60 | 126.0 | 112.2 | 5.92 |
| 66 | 105.8 | 113.1 | 5.92 |
| 72 | 102.0 | 114.0 | 5.88 |

El paso siguiente es determinar las velocidades de crecimiento celular y la velocidad de formación del etanol mediante diferenciación gráfica de la curva anterior. La velocidad en cualquier punto fué calculada mediante la pendiente de ese punto.

Se calcularon enseguida las velocidades específicas de crecimiento celular y de formación del producto dividiendo la velocidad en cualquier instante del proceso por la concentración celular en ese instante. Las velocidades específicas se definen como la velocidad por unidad de concentración celular. Estos datos se presentan en la Tabla 7.

Las velocidades específicas se calculan con el objeto de comprobar si el proceso de fermentación alcohólica cumple el modelo propuesto por Luedeking y Piret (2,3) en el cual la velocidad de formación del producto está expresada en términos de la velocidad específica de crecimiento celular K:

$$(1/m)(dP/dt) = LK + B$$

donde m es la concentración celular, L es la constante de producción y B una constante de proporcionalidad.

El modelo se cumple cuando se obtiene una relación lineal al graficar la velocidad específica de crecimiento celular como función de la velocidad específica de formación del producto. El valor de L será la pendiente de la recta y el valor de B será su intersección en el eje de las ordenadas.

La Figura 4., presenta la velocidad de crecimiento celular V_{cc} y la velocidad de formación del producto V_p contra el tiempo. Se observa que la mayor V_{cc} se obtiene a las 30 horas de reacción y corresponde a un valor de $7.37 \cdot 10^6$ MO/ml.h. La formación del producto llega a su mayor velocidad V_p a las 38 horas.

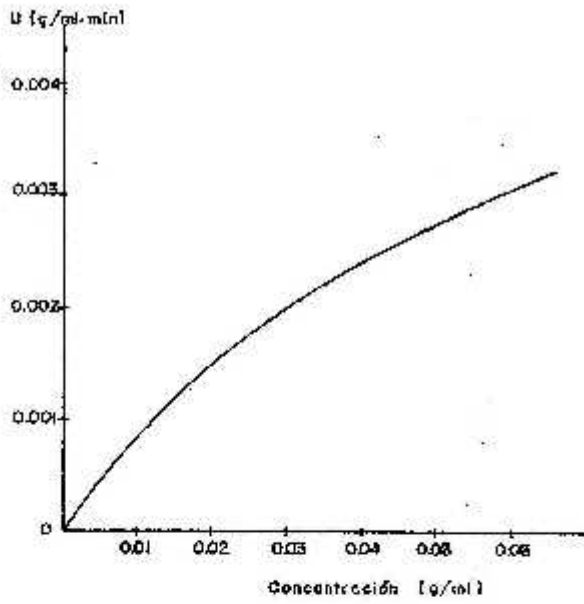


FIGURA 1. Velocidad de hidrólisis contra concentración de sustrato.

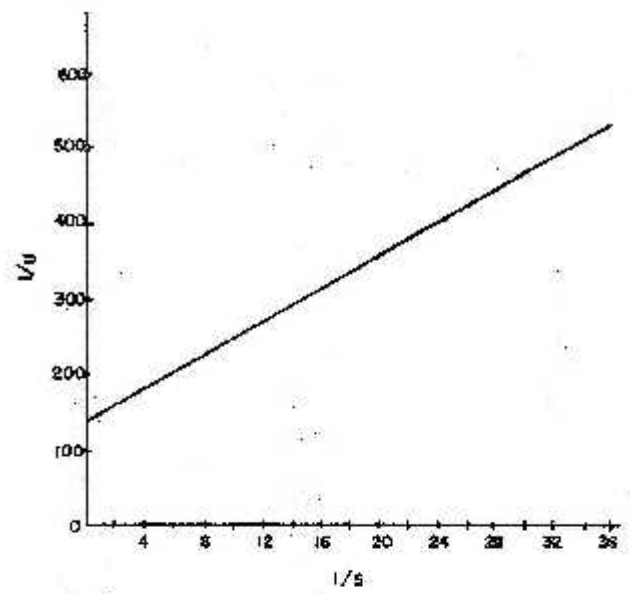


FIGURA 2. Cinética de Lineweaver - Burk

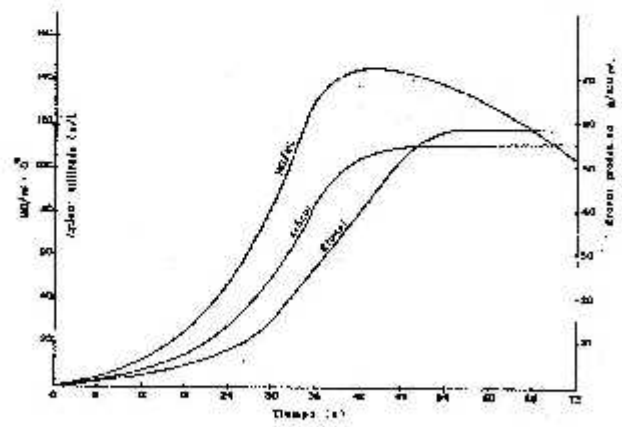


FIGURA 3. Concentración de sustrato, el nivel de producción y sustrato utilizado contra tiempo.

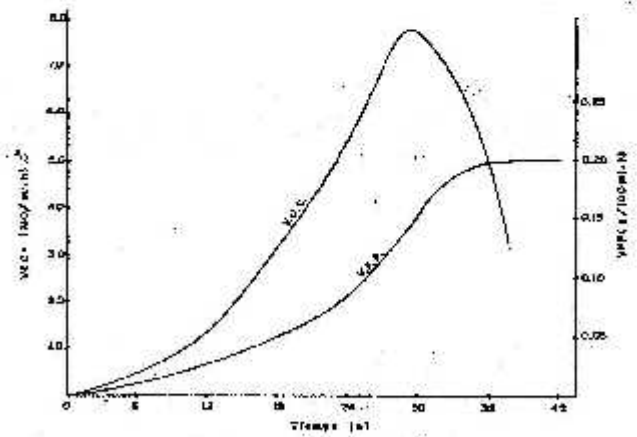


FIGURA 4. Velocidad de enfriamiento celular y formación de producto contra tiempo.

TABLA 7. Velocidades específicas para la cinética alcohólica.

| t | V_{∞} | V_{fp} | V_{ecc} | V_{efp} |
|----|--------------|----------|-----------|-----------|
| 6 | 1.000 | 0.017 | 0.250 | 4.36 |
| 10 | 1.190 | 0.025 | 0.143 | 3.00 |
| 12 | 1.250 | 0.026 | 0.117 | 2.39 |
| 18 | 2.948 | 0.045 | 0.111 | 2.15 |
| 24 | 5.446 | 0.085 | 0.105 | 1.67 |
| 30 | 7.733 | 0.178 | 0.088 | 2.02 |
| 33 | 6.500 | 0.192 | 0.057 | 1.70 |
| 36 | 4.899 | 0.211 | 0.037 | 1.60 |
| 38 | 3.333 | 0.227 | 0.024 | 1.62 |
| 42 | 1.111 | 0.217 | 0.007 | 1.46 |
| 43 | 0.357 | 0.217 | 0.002 | 1.46 |

t = tiempo en horas

V_{∞} = velocidad de crecimiento celular en MO/ml.h *10⁶

V_{fp} = Velocidad de formación de producto en g/100 ml.h

V_{ecc} = Velocidad específica de crecimiento celular en (1/t)*10⁶

V_{efp} = Velocidad específica de formación de producto en (g/MO.h)*10⁻³

La Figura 5., presenta la relación lineal entre las velocidades específicas de crecimiento y de formación, lo cual comprueba la validez del modelo cinético. Los valores calculados para L y B son los siguientes:

$$L = 0.094 \text{ MO/g}; \quad B = 0.0012 \text{ g/MO.h}$$

La aplicación de estos valores en la ecuación de Luedeking y Piret proporciona datos de la velocidad de formación del producto V_{fp} muy cercanos a los valores experimentales obtenidos, especialmente para valores de concentración celular correspondientes a la fase exponencial de crecimiento. Por ejemplo, para 18 horas de proceso:

$$dP/dt = ((0.094 * 0.111) + 0.0012) / (1/19.5))$$

$$dP/dt = 0.043 \text{ g/100 ml.h; (dato experimental = 0.045)}$$

Se utilizó enseguida el método propuesto por Adams y Hungate (1) para calcular el tiempo mínimo requerido para la fermentación continua de un sustrato determinado, el cual se basa en los datos de crecimiento celular.

El ciclo de tiempo óptimo es aquel que corresponda a la máxima velocidad de crecimiento celular, puesto que la mayor producción celular dará la mayor velocidad de fermentación. Este ciclo de tiempo corresponde al inverso de la velocidad específica de crecimiento celular calculada para el estudio cinético.

La máxima velocidad de crecimiento celular se obtuvo a las 30 horas de proceso, tiempo para el cual la velocidad específica de crecimiento celular fué de 0.088. Por tanto, el ciclo de tiempo óptimo es de 11.36 horas.

En las gráficas de velocidad de crecimiento celular y de formación de etanol se observa que la utilización de los azúcares es incompleta, aún en el punto para el cual V_{cc} es óptima (30 horas). Para ese período de tiempo la velocidad máxima de formación de alcohol es de 0.178 g/100 ml.h.

Esto significa que la completa utilización de los azúcares no puede lograrse en un sólo fermentador. Se propone entonces usar un sistema con dos fermentadores, para que en el primero de ellos se deje progresar la reacción en presencia de aire estéril hasta alcanzar el valor máximo de concentración celular (30 horas). Se pasará luego el mosto al segundo fermentador, donde el proceso será anaerobio para obtener alcohol puro, y tendrá un tiempo de residencia de 11.36 horas con el fin de mantener una producción continua máxima.

FERMENTACION ACETICA

Se prepararon inicialmente tres cultivos separados en el medio 66 del *Acetobacter aceti*, el cual se aisló de un vinagre casero (solución madre).

Una vez esterilizado el medio, se tomó de la solución madre una pequeña muestra con una pipeta estéril y se sembró en el medio. Se mantuvo en incubación durante varios días, haciendo un seguimiento al microscopio del crecimiento bacterial.

Terminado el período de incubación se tomaron muestras del mejor de los cultivos para repetir el proceso hasta obtener un cultivo completamente puro del biocatalizador. El género *Acetobacter* es aerobio estricto y se caracteriza por estar constituido por células individuales elipsoidales en forma de bastón o en pares o en cadenas cortas o largas, móviles con flagelo polar. Las células jóvenes son gramnegativas; en cambio las células viejas son grampositivas.

El sustrato proveniente de la fermentación alcohólica fué sometido a decantación, centrifugación y pasteurización con el fin de eliminar todas las levaduras, cuya presencia inhibe la acción oxidativa de *A. aceti*. Se agregaron luego las siguientes sales nutritivas por litro de sustrato:

Pantotenato de Calcio: 2.6 g; Fosfato de diamonio e hidrógeno: 0.6 g; Fosfato de dipotasio e hidrógeno: 0.4 g; Sulfato de magnesio hidratado: 0.2 g; Sulfato de manganeso hidratado: 0.01 g; Tricloruro de hierro : 0.002 g; Extracto de levadura : 0.35 g.

Todos los experimentos de oxidación acética se efectuaron bajo las siguientes condiciones de operación:

pH inicial: 5.2; Temperatura: 30°C; Azúcares iniciales: 50 g/l; Etanol inicial: 58 g/l; Aireación: 3.5 l/min; Agitación : 500 rpm; Volúmen : 1.0 l

Inicialmente se efectuaron cinco experimentos con el fin de determinar la cantidad inicial apropiada de biocatalizador para obtener el mayor porcentaje de ácido acético. Se utilizaron las siguientes cantidades iniciales de *A. aceti*:

10000., 25000., 30000., 120000., 220000., MO/mm³. Las muestras para analizar por cromatografía de gases la cantidad de ácido formado se tomaron a las 72 h de reacción. Los mejores rendimientos se obtuvieron para 30000 MO/mm³, por lo cual se utilizó este valor para los siguientes ensayos.

Bajo las condiciones anteriores se realizó enseguida un experimento para medir la concentración celular a través del tiempo de oxidación con el objeto de determinar el punto de máximo crecimiento. En este punto se renueva el sustrato para lograr así un sistema continuo. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 8 y en la Figura 5.

TABLA 8. Concentración celular contra tiempo para la oxidación acética.

| Tiempo (h) | C_c (MO/ml *10 ⁸) |
|---------------|------------------------------------|
| 0 | 0.30 |
| 18 | 1.82 |
| 24 | 11.01 |
| 36 | 14.20 |
| 42 | 22.50 |
| 50 | 25.80 |
| 58 | 33.30 |
| 65 | 41.10 |
| 70 | 42.50 |
| 73 | 43.00 |
| 80 | 41.80 |
| 90 | 39.30 |

Como se puede apreciar el mayor valor para el crecimiento celular C_c fué de $43 \cdot 10^8$ MO/ml a las 73 horas de proceso.

Posteriormente se analizaron dos experimentos de fermentación continua en las condiciones de operación ya descritas, en los cuales el número inicial de bacterias fué de $0.3 \cdot 10^8$ Mo/ml. Por medio de estos ensayos se deseaba determinar los valores experimentales de algunos parámetros cinéticos y tener los datos necesarios para calcular el ciclo de tiempo mínimo requerido para la fermentación acética continua.

Las Tablas 9 y 10 presentan los resultados obtenidos en estos experimentos. La reacción se dejó progresar hasta las 73 horas, tiempo en el cual se logra el mayor crecimiento celular. En este punto comienzan a removerse 14 ml/h del líquido fermentado y se adiciona simultáneamente el mismo volumen de alimento y célula frescas con el fin de mantener una producción máxima continua de ácido acético.

Como puede observarse en las Tablas 9 y 10 la producción de ácido acético permanece aproximadamente constante después de las 73 horas de fermentación, con un valor promedio de 7.48 g/l para el experimento N° 1 y de 7.38 g/l para el experimento No 2.

Los resultados obtenidos en el experimento No 1 sirvieron de base para determinar si la cinética de este proceso sigue el modelo de Monot, y también para calcular el ciclo de tiempo mínimo para renovar el sustrato.

La Figura 6 presenta los resultados del experimento No 1, ajustados por medio de un programa de mínimos cuadrados.

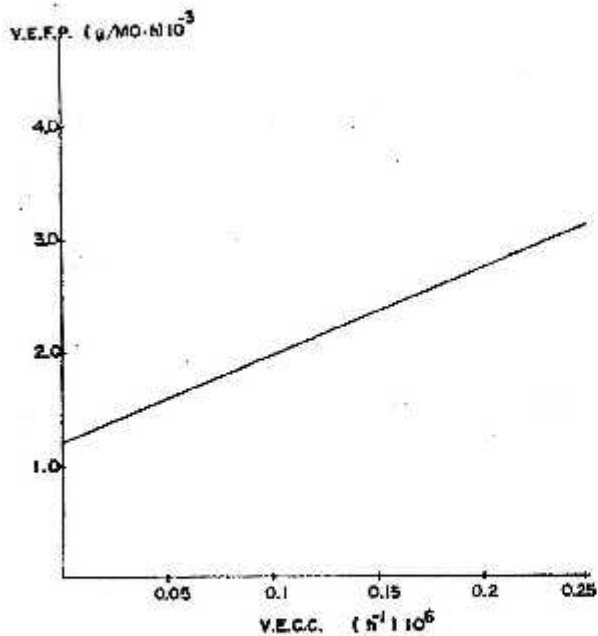


FIGURA 5. Velocidades específicas de crecimiento celular y formación de producto para comprobar modelo de Luedeking and Piret para fermentación alcohólica.

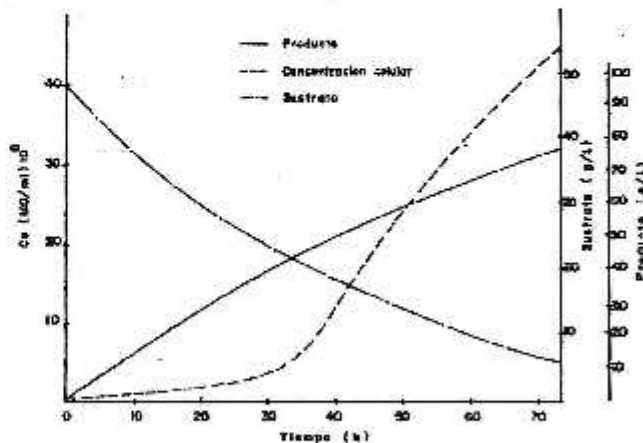


FIGURA 6. Concentración celular, producto, sustrato contra tiempo para la fermentación acética número 1. Ajustaron

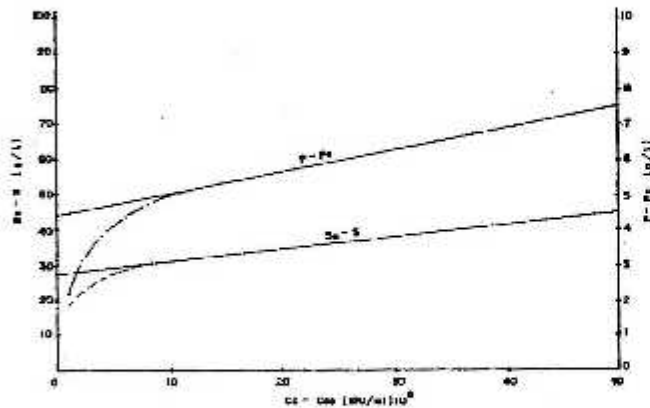


FIGURA 7. Cálculo de Y_p y para el método de Monod.

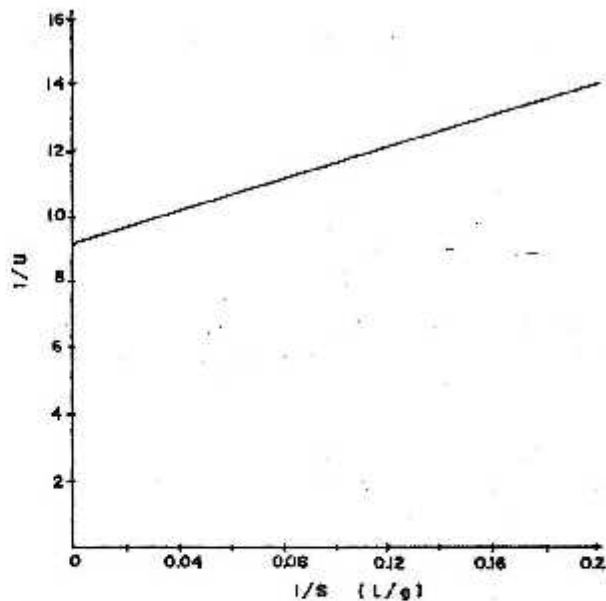


FIGURA 8. $1/U$ contra $1/S$ para calcular U máximo y K_s de la ecuación de Monod.

TABLA 9. Resultados de la oxidación acética. Experimento 1 - Sistema continuo

| Tiempo h | pH | Células MO/ml*10 ⁸ | Azúcar g/l | Etanol g/l | Producto g/100 ml |
|-------------|-----|----------------------------------|---------------|---------------|----------------------|
| 0 | 5.2 | 0.3 | 67.8 | 50.1 | 0.1 |
| 16 | 5.0 | 1.2 | 58.5 | 35.0 | 2.3 |
| 22 | 4.8 | 3.5 | 42.9 | 26.9 | 2.7 |
| 39 | 4.1 | 8.0 | 42.9 | 21.3 | 5.3 |
| 49 | 3.8 | 24.1 | 42.9 | 10.5 | 5.6 |
| 63 | 3.8 | 35.1 | 42.9 | 8.2 | 6.9 |
| 73 | 3.6 | 42.6 | 42.9 | 4.5 | 7.6 |
| 89 | 3.6 | 18.0 | 50.2 | 13.8 | 7.6 |
| 94 | 3.6 | 22.7 | 45.3 | 9.0 | 8.2 |
| 97 | 3.6 | 18.4 | 45.3 | 8.5 | 7.5 |
| 113 | 3.5 | 20.4 | 45.3 | 2.4 | 6.6 |

Para llevar a cabo el análisis cinético de estos experimentos, deben tenerse en cuenta las ecuaciones:

$$(S_0 - S) = (1/Y)(C_c - C_{c0}) \quad (1)$$

$$(P - P_0) = (1/y)(C_c - C_{c0}) \quad (2)$$

TABLA 10. Resultados de la oxidación acética. - Experimento 2 - Sistema continuo

| Tiempo h | pH | Células MO/ml*10 ⁸ | Azúcar g/l | Etanol g/l | Producto g/100 ml |
|-------------|-----|----------------------------------|---------------|---------------|----------------------|
| 0 | 5.2 | 0.3 | 65.9 | 51.5 | 0.2 |
| 16 | 4.7 | 2.2 | 53.6 | 36.0 | 2.2 |
| 22 | 4.7 | 3.5 | 40.1 | 27.6 | 3.0 |
| 25 | 4.4 | 4.0 | 39.9 | 27.2 | 3.3 |
| 39 | 4.3 | 5.7 | 39.9 | 21.9 | 4.8 |
| 49 | 3.9 | 18.3 | 39.9 | 10.8 | 5.5 |
| 63 | 3.8 | 16.6 | 39.9 | 8.4 | 5.9 |
| 73 | 3.6 | 24.2 | 48.5 | 5.1 | 7.4 |
| 89 | 3.5 | 15.9 | 40.3 | 12.3 | 7.3 |
| 94 | 3.6 | 18.8 | 40.3 | 9.2 | 7.9 |
| 97 | 3.6 | 16.2 | 40.3 | 6.5 | 7.3 |
| 113 | 3.7 | 17.8 | 40.3 | 3.5 | 7.0 |

Las cuales se obtienen al integrar las ecuaciones que describen la velocidad de consumo de sustrato y de formación del producto con respecto al tiempo.

Cuando se grafica $(S_0 - S)$ y $(P - P_0)$ contra $(C_c - C_{c0})$ se deben obtener dos rectas con pendientes $1/Y$ y $1/y$ respectivamente.

La figura 7 indica que efectivamente para los datos obtenidos en el experimento No 1 se obtiene una recta en los puntos correspondientes a la fase logarítmica, lo cual confirma que la cinética cumple el modelo de Monod.

La Figura 8 representa la forma lineal propuesta por Lineweaver-Burk, o sea la gráfica de $1/S$ contra $1/V$. Se deducen entonces los siguientes valores experimentales para k_m y para V_{max} relacionados con este proceso de fermentación:

$$k_m = 3.0514 \text{ g/l}; V_{max} = 0.10847 \text{ MO/ml.h}$$

Los resultados del experimento No 1 también permitieron calcular, según el método de Adams y Hungate (1), que la máxima velocidad de crecimiento celular es de $1.2121 \cdot 10^8$ MO/ml.h, la cual se obtiene a las 49 horas de proceso. En este punto la concentración celular ajustada es de $20.5 \cdot 10^8$ MO/ml. Por tanto la velocidad específica de crecimiento celular (V_{max}) es de 0.059 h^{-1} . El inverso de esta velocidad proporciona el ciclo de tiempo óptimo, o sea aproximadamente 17 horas.

Esto significa que se hace necesario el diseño de dos fermentadores, para que en el primero de ellos se lleve a cabo el proceso hasta alcanzar el crecimiento máximo a las 49 horas. Luego se pasa el mosto al segundo reactor donde se debe renovar el sustrato cada 17 horas para mantener una producción de acético estable de 0.083 g/l.h . Este último dato corresponde a la pendiente en la curva de P contra t, Figura 6., en el punto de 49 horas de fermentación.

Finalmente, el producto que sale del segundo fermentador al cabo de un total de 73 horas de proceso, tendrá una concentración final (ajustada) de 7.4 g/100 ml de ácido acético.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se seleccionó el método más apropiado para efectuar la hidrólisis enzimática del almidón de yuca usando malta cervecera como agente catalizador. Se recomienda una temperatura de 95°C durante 30 minutos para la cocción del almidón y 60°C durante 30 minutos para la hidrólisis.
2. El estudio estadístico del efecto de las diferentes variables sobre el rendimiento de la hidrólisis enzimática permitió deducir que las mejores condiciones de operación son las siguientes:

| | |
|----------------------------|----------------------|
| Concentración del Sustrato | = 10% |
| Relación Malta/Sustrato | = 0.45 |
| Temperatura de hidrólisis | = 60°C |
| pH | = 5.2 |

3. Mediante análisis estadístico de la hidrólisis enzimática del almidón se obtuvo la siguiente ecuación lineal que representa matemáticamente este proceso y permite hacer predicciones dentro de los rangos estudiados:

$$\% \text{ Rendimiento} = 71.34 + 3.54 \cdot A - 4.08 \cdot B + 3.28 \cdot B \cdot C$$

En esta ecuación solo intervienen las variables que resultan significativas al nivel del 95%, a saber: concentración del sustrato (A), la relación Enzima sustrato (B) y la interacción enzima sustrato con la temperatura (B*C). Estas variables están codificadas.

4. Se estableció experimentalmente que la hidrólisis enzimática con malta, realizada según condiciones de operación descritas atrás, tiene orden de reacción uno y que su constante de velocidad específica k tiene un valor de 0.0392 min^{-1} .

5. La hidrólisis enzimática estudiada obedece el comportamiento descrito por Michaelis-Menten y presenta los siguientes valores experimentales:

$$K_m = 0.08196 \text{ g/ml}$$

$$V_{\max} = 7.246 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml.min}$$

6. Se calculó la velocidad inicial de la hidrólisis enzimática, la cual resultó tener el siguiente valor:

$$V_o = 3.674 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml.min}$$

Así mismo, se calculó el valor del factor $1/V$ de la forma lineal de Lineweaver-Burk, el cual depende de la concentración del sustrato S :

$$1/V = 13S + (11.31/S)$$

7. El biocatalizador usado para la fermentación alcohólica fué la *Sacharomices cerevisae* y las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

| | |
|----------------------------------|--------------|
| Concentración inicial de glucosa | = 140 g/l |
| Temperatura | = 25°C |
| Rango de pH | = 4.5 - 5.2 |
| Tiempo de aireación | = 30 minutos |

Trabajando bajo estas condiciones, se dedujo que la máxima producción de etanol se obtiene con una concentración inicial de levadura de 3500 MO/mm^3 .

8. El análisis cinético de la fermentación alcohólica permitió calcular tanto la velocidad de crecimiento celular V_{cc} como la velocidad de formación del producto V_{fp} , con relación al tiempo de reacción. El mayor valor para V_{cc} se obtuvo a las 30 horas de proceso y tiene una magnitud de $7.73 \cdot 10^6 \text{ MO/ml.h}$. La formación de producto llega a su máxima velocidad V_{fp} a las 38 horas y su magnitud es de 0.227 g/100 ml.h .

9. Se comprobó que existe una relación lineal entre las velocidades específicas de crecimiento celular V_{cc} y de formación de producto V_{fp} , lo cual confirma que el proceso se ajusta al modelo cinético propuesto por Luedeking y Piret. Los valores calculados para la constante de producción L y para la constante de proporcionalidad B son los siguientes:

$$L = 0.094 \text{ MO/g}; \quad B = 0.0012 \text{ g/MO.h}$$

10. El ciclo de tiempo óptimo, calculado mediante el procedimiento propuesto por Adams y Hungate, es de 11.36 horas. Esto indica que la fermentación continua para obtener etanol conviene realizarla en dos fermentaciones.

tadores. En el primero de ellos se lleva la reacción aeróbica hasta el crecimiento máximo (30) horas y luego se pasa al segundo fermentador, donde el proceso es anaerobio con un tiempo de residencia de 11.36 horas. En esta forma se puede mantener una producción continua máxima de alcohol.

11. Para el proceso de fermentación acética se utilizó como biocatalizador la bacteria *Acetobacter aceti* y se trabajó bajo las siguientes condiciones:

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| pH inicial | = | 5.2 |
| Temperatura | = | 30°C |
| Azúcares iniciales | = | 50 g/l |
| Etanol inicial | = | 58 g/l |
| Aireación | = | 3.5 l/min |
| Agitación | = | 500 rpm |
| Volúmen | = | 1.0 l |

Para estas condiciones se dedujo experimentalmente que la concentración inicial del biocatalizador que produce el mejor rendimiento es de 30000 MO/mm³.

12. El mayor valor para el crecimiento celular en la fermentación acética fué de $43 \cdot 10^8$ MO/ml a las 73 horas de proceso. Con base en este dato, se realizaron experimentos de fermentación acética continua, en los cuales se mantuvo un valor promedio de 7.48 g/100 ml de ácido acético entre 73 y 113 horas de proceso.
13. La cinética de la fermentación acética cumple el modelo de Monot y presenta los siguientes valores experimentales para la constante de Michaelis-Menten k_m y para la velocidad máxima V_{max} :

$$k_m = 3.0514 \text{ g/l}; \quad V_{max} = 0.10847 \text{ MO/ml.h}$$

14. La máxima velocidad de crecimiento celular se obtiene a las 49 horas de fermentación, por lo cual se recomienda ejecutar el proceso en el primer reactor hasta ese período y luego pasarlo a un segundo fermentador.
15. La velocidad específica de crecimiento celular V_{occ} para la fermentación acética es de 0.059 h^{-1} . El inverso de esta velocidad proporciona el ciclo de tiempo óptimo, o sea aproximadamente 17 horas. Este es el período recomendado para retirar ácido del segundo fermentador y renovar el sustrato, con el fin de mantener una producción estable de 0.083 g/l.h de ácido. La concentración final de ácido obtenido será de 7.4 g/100 ml.

ANEXO 1

METODO PARA HIDROLISIS DE ALMIDON DE YUCA USANDO MALTA CERVECERA

Pesar la malta y el almidón en las cantidades necesarias, según la siguiente relación:

| | | |
|---------|---|--------|
| Almidón | = | 10 g |
| Malta | = | 3 g |
| Agua | = | 200 ml |

Agregar todo el almidón a la mitad del agua de hidrólisis y calentar a 60°. Estando a esta temperatura agregar

mas o menos 1% de la malta y el resto del agua. Mantener a esta temperatura por 15 minutos y llevar a pH 5.0 con ácido fosfórico o con amoníaco, según el caso.

Mantener la temperatura 15 minutos más con el fin de ablandar el almidón.

Enseguida aumentar la temperatura hasta 95°C y mantener así 30 minutos para la cocción del almidón. Cumplido este tiempo, bajar la temperatura hasta 60°C, agregar la malta restante, previamente diluida en agua a esta misma temperatura y dejar actuar durante 30 minutos.

Al finalizar se filtra y se determina el contenido de azúcares fermentables. Mantener agitación constante durante todo el proceso.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS S. y HUNGATE, R. Continuous fermentation cycle time. *Ind. and Eng. Chemistry*, 42, 9, 1815, 1950.
2. AIBA, S y HUMPHREY, A. *Biochemical Engineering*. Academic Press, New York, 1973.
3. AIYAR, A. y LUEDEKING, R. Kinetic study of the alcoholic fermentation of glucosa by *Sacharomices cerevisiae*. *Bioengineering and Food processing*, vol. 62, 9, 1981.
4. ARIZA, M y FORERO, M. Obtención de alcohol a partir de bore. Proyecto de Grado, UIS, 1987.
5. ASSOCIATION OF AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 1980.
6. CARRERA, L. y BENAVIDES, M. *Tecnología IIT*, No 146, Nov-Dic de 1983, pp 7-14.
7. COCHRAN, W. y COX, G. *Diseños experimentales*. Editorial Trillas. México, 1973.
8. DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADISTICAS. *Industria Manufacturera Colombiana*, 1987.
9. HERRERA, P. y MADRID, J. Estudio cinético del proceso de obtención de Glicerina por fermentación aerobia a partir de almidón de Yuca. Proyecto de Grado, UIS., 1986.