

FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA AMB CEL·LULES IMMOBILITZADES

per

FRANCESC GÒDIA I CASABLANCAS

Departament de Química Tècnica
Universitat Autònoma de Barcelona

SUMMARY

In this work the alcoholic fermentation using immobilized yeast cells is studied. The yeast strain used in the fermentation experiments has been isolated from a high grade wine and its growth and fermentation performance are studied in batch culture, as well as their mathematical modelization.

The cell immobilization is carried out by a method using carrageenan gel beads which is very simple and mild. The mechanical and hydrodynamic characterization of the immobilized cell particles is done and the distribution and activity of the the cells inside them is studied.

Finally, the continuous fermentation of a glucose solution in a tubular reactor filled with immobilized cells is carried out at different flow rates.

1. RESUM

Al present treball presentem l'estudi sobre la posada a punt d'un sistema de fermentació alcohòlica amb cèl·lules immobilitzades.

En primer lloc estudiem el creixement en discontinu i l'activitat fermentativa de la soca de llevats, aïllada de most de vi d'alta graduació de la comarca del Priorat, que s'empra en el treball. També estudiem la seva modelització matemàtica.

Es posa a punt un mètode d'immobilització de cèl·lules senzill i suau, utilitzant gels de carragenat. Es fa una caracterització mecànica i hidrodinàmica de les partícules amb cèl·lules immobilitzades i s'estudia l'estat i l'activitat dels llevats al seu interior.

Per últim, es posa a punt una instal·lació experimental i es porta a terme la fermentació alcohòlica en continu d'una solució de glucosa, emprant un reactor tubular reblert amb cèl·lules immobilitzades.

2. INTRODUCCIÓ

Els combustibles fòssils, i en particular el petroli i els seus derivats, són la font de l'enorme quantitat de combustibles i productes químics que s'utilitzen actualment en els països desenvolupats del Món. No obstant això, aquests compostos presenten dos importants inconvenients que limiten la seva producció i utilització: el seu exhauriment, posat especialment en evidència a partir de la crisi del petroli, i els problemes de contaminació ambiental que van lligats a la seva utilització.

Aquesta situació ha posat en evidència la necessitat de noves fonts d'energia i productes químics que siguin renovables i no contaminants. Una de les diferents alternatives proposades és l'aprofitament energètic de materials lignocel·lulòsics (en particular residus agrícoles, residus sòlids urbans i residus procedents de fàbriques de pasta i paper) mitjançant la seva conversió en etanol per fermentació¹. L'atractiu més important d'aquests materials és el seu cost pràcticament nul. D'altra banda la seva utilització fa necessari un pre-tractament previ del residu per tal de separar els seus components principals (lignina, hemicel·lulosa i cel·lulosa) i la posterior hidròlisi de la cel·lulosa és un problema força complex. De fet, en l'actualitat, la producció d'etanol per ús industrial utilitza com a matèries primeres bé materials que contenen sucres directament fermentables, bé materials amb alts continguts de midò, fàcilment hidrolitzable. Els dos inconvenients importants que es presenten en aquests casos són l'elevat cost de les matèries primeres (entre un 50 i un 70 per cent dels costos totals) i el fet que els productes rics en sucre o midò (canya de sucre, cereals, etc.) són materials aptes per a l'alimentació i per tant la seva utilització per a la producció d'etanol pot tenir serioses repercussions socials en alguns casos.

L'interés de la producció d'etanol com a combustible i com a matèria primera per a l'obtenció de productes químics està justificat per diverses raons: es pot produir a partir d'un ampli ventall de residus; el procés de fermentació és conegut, encara que són necessàries innovacions en la tecnologia actualment emprada; les propietats de l'etanol

com a combustible són molt bones; i mitjançant la seva fàcil conversió en etilè (per exemple) es proporciona una entrada a l'obtenció de nombrosos productes químics emprant processos ja existents.

El treball que presentem es centra en l'etapa de fermentació de sucres a etanol. L'objectiu del mateix és posar a punt un fementador que millori els fermentadors discontinus convencionals actualment emprats, la característica més desfavorable dels quals és la baixa productivitat d'etanol que s'obté. Les característiques més importants per tal de poder augmentar la productivitat són l'operació en continu i el manteniment d'altres densitats cel·lulars dins el fermentador, cosa que permet també la reducció del volum de l'equip de fermentació.

Entre els diferents sistemes alternatius de fermentació que s'han proposat² ha semblat especialment atractiu el fermentador amb cèl·lules inmovilitzades³. El sistema consisteix en retenir les cèl·lules a l'interior del reactor mitjançant un suport inert. La interacció entre el suport i les cèl·lules pot ser de diferents tipus⁴, essent les més àmpliament emprades la inclusió de les cèl·lules dins la matriu, l'enllaç covalent i l'adsorció. El mètode d'immobilització emprat en aquest treball és la inclusió en gels de carragenat, un polisacàrid que s'extrau de les algues vermelles del mar. Les característiques més importants d'aquest suport són la senzillesa de la immobilització i el fet que la mateixa es porta a terme en condicions suaus de temperatura i sense necessitat d'agents químics que perjudiquin les cèl·lules, el que permet tenir cèl·lules inmovilitzades vives, factor important per efectuar reaccions complexes com la fermentació alcoholica.

Els objectius del pla de treball que s'ha portat a terme han estat els següents:

- Estudi cinètic en discontinu del creixement de llevats i de la fermentació alcoholica. Aquest és un aspecte prou complex i important de cara al futur disseny de reactors.

- Preparació del mètode d'immobilització i caracterització física i biològica de les partícules amb cèl·lules inmovilitzades.

- Posada a punt d'un sistema de fermentació en continu amb cèl·lules inmovilitzades.

3. INSTAL·LACIÓ EXPERIMENTAL I MATERIALS

3.1. Instal·lació experimental

Per portar a terme els experiments de fermentació en continu amb cèl·lules inmovilitzades hem posat a punt la instal·lació experimental que s'esquemmatitza a la figura 1.

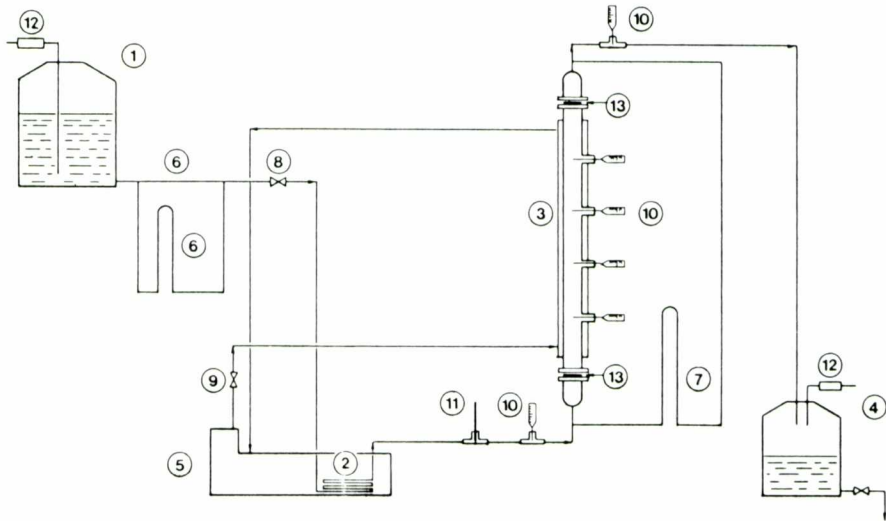


Fig. 1. Esquema de la instal·lació experimental.

- 1 – Tanc de magatzematge de medi d'alimentació.
- 2 – Serpentí de calefacció/refrigeració de l'aliment.
- 3 – Reactor tubular encamisat.
- 4 – Tanc de recollida de l'efluent del reactor.
- 5 – Termostat amb bomba de circulació exterior d'aigua.
- 6 – Estretament i manòmetre diferencial per a mesura del cabal.
- 7 – Manòmetre diferencial per a mesura de la pèrdua de càrrega al reactor.
- 8 – Clau de regulació del cabal d'aliment.
- 9 – Clau de regulació del cabal d'aigua de refrigeració.
- 10 – Preses de mostra.
- 11 – Termòmetre.
- 12 – Connexions estèrils a l'atmosfera.
- 13 – Plaques poroses per a retenir el biocatalitzador dins el reactor.

Tot l'equip està dissenyat de forma que es pot esterilitzar i funcionar en condicions estèrils. El fermentador tubular encamisat està fet de vidre Pyrex i té dos jocs de brides a cada extrem, entre les quals es col·loquen dues plaques de vidre poròs per tal de retenir la preparació de cèl·lules immobilitzades al seu interior. La distància entre els dos extrems és de 50 cm i a cada 10 cm hi ha una porta per presa de mostres. El diàmetre intern del fermentador és d'una polzada.

El tanc de magatzematge del medi d'alimentació té una capacitat de 20 l i el de recollida del producte 5 l. Ambdòs estan proveïts de connexions estèrils a l'atmosfera. L'alimentació al reactor es fa per càrrega i es regula mitjançant una vàlvula d'agulla de molta precisió, adequada als baixos cabals de treball.

3.2. Materials

Microorganismes. Els llevats emprats en aquest treball van ser aïllats de most de vi d'alta graduació de la comarca del Priorat i van ser seleccionats entre d'altres per la seva tolerància a l'etanol i la seva capacitat fermentativa.

Carragenat. El carragenat utilitzat en el procediment d'immobilització va ser subministrat per Ceratonia S.A. (Tarragona). Es tracta del Genugel tipus X-0828 desenvolupat a l'empresa "The Copenhagen Pectin Factory Ltd." per aplicació a procediments d'immobilització.

Medis. Es van emprar tres tipus de medis:

Agar extracte de malta. S'utilitza en els tubs on es conserven les soques de llevats i en la preparació de plaques de Petri pel recompte de colònies. Composició: extracte de malta, 30 g; peptona, 5 g; agar, 15 g; aigua destil·lada fins 1 l.

Medi de proliferació. Emprat en la preparació d'inòculs i en la proliferació de microorganismes prèvia a la seva immobilització. Composició: glucosa, 10 g; extracte de llevat, 3 g; peptona, 5 g; extracte de malta, 3 g; aigua destil·lada fins 1 l.

Medi d'aliment. Emprat en tots els experiments de fermentació, tant en continu com en discontinu. Composició: glucosa, 50-200 g; extracte de llevat, 8.5 g; NH_4Cl , 1.3 g; MgSO_4 , 0.1 g; CaCl_2 , 0.06 g; aigua destil·lada fins 1 l.

La preparació dels medis de proliferació i d'aliment es fa en dues parts. D'una banda s'esterilitza a l'autoclau una solució amb tots els components del medi excepte la glucosa. D'altra banda la solució de glucosa s'esteritza per filtració (filtres de $0.45\ \mu\text{m}$). A continuació es mesclen ambdues solucions en condicions estèrils.

Solució de blau de metilè. Aquesta solució s'empra en el mètode de determinació de la viabilitat dels llevats. Composició: blau de metilè, 0.025 g; NaCl , 0.9 g; KCl , 0.042 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.048 g; NaHCO_3 , 0.02 g; glucosa, 1 g; aigua destil·lada fins 100 ml.

4. MÈTODES I PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

4.1. Mètode d'anàlisi

Per tal de seguir l'evolució de la fermentació, les concentracions de glucosa i etanol s'analitzen per cromatografia líquida d'alta resolució. S'empra un cromatògraf Perkin-Elmer Series 2 amb una columna Shodex Ionpack S-501/S i aigua com eluent (cabal 1 ml/min i 80°C de temperatura), acoblat a un detector d'índex de refracció Waters R-401. La separació entre els pics de glucosa, glicerol (subproducte principal

la fermentació), etanol i sacarosa (sucre emprat com a patró intern) és satisfactòria i s'ha comprovat la reproductibilitat del mètode. L'avantatge principal d'aquest mètode és la determinació de tots els productes d'interès en una sola anàlisi.

4.2. Mètodes de mesura de la concentració cel·lular i determinació de viabilitat

Per tal de determinar la concentració de cèl·lules s'empren tres mètodes diferents segons les condicions dels experiments:

Recompte directe al microscopi. S'utilitza un microscopi Nikon S-KT i una càmera de recompte de tipus Burkner. L'avantatge més important d'aquest mètode és que, efectuant una tinció amb blau de metilè, es pot determinar la viabilitat de les cèl·lules al mateix temps que s'en fa el recompte (5), ja que les cèl·lules mortes queden tenyides de blau i les vives no.

Recompte per formació de colònies. En aquest mètode (6) es procedeix a una sèrie de dilucions de la solució de la qual volem mesurar la concentració de cèl·lules i tot seguit se n'escampen 0.1 ml homogèniament en plaques de Petri de 9 mm de diàmetre plenes de medi sòlid agar extracte de malta. Després d'incubar-les en una estufa de cultius, el nombre de colònies aparegudes correspon a les cèl·lules vives (encara que les concentracions mesurades per aquest mètode sempre acostumen a estar una mica per sota dels recomptes directes al microscopi). Aquest mètode és més laboriós, però permet de determinar concentracions baixes de cèl·lules. També ha estat emprat en aquells casos en què el recompte directe al microscopi era dificultós.

Mesura de l'absorbància. Aquest mètode ens dona una mesura de la biomassa total i no de la concentració de cèl·lules individuals. La concentració de biomassa es mesura mitjançant l'absorció de llum de 650 nm per la suspensió cel·lular, utilitzant-se un espectrofotòmetre Perkin-Elmer, tipus Lambda-5. Aquest mètode té l'avantatge de la seva simplicitat i rapidesa en les mesures i per aquesta raó s'ha emprat en els experiments de cinètica de creixement en discontinu donada la quantitat de mesures a fer en poc temps. D'altra banda presenta els inconvenients de mesurar solament la biomassa global i que a concentracions elevades la relació entre absorbància i concentració es desvia de la relació lineal de Beer-Lambert.

4.3. Procediment en l'estudi cinètic del creixement en discontinu de llevats

Per tal d'estudiar la modelització del creixement de llevats i la fermentació de solucions de glucosa, s'han realitzat una sèrie d'experi-

ments en discontinu. En tots aquests experiments es procedeix d'igual forma i l'única diferència entre ells és la concentració inicial de sucre. El mètode experimental és el següent:

- es prepara un inòcul de la soca de llevats enprada en el treball.
- es prepara un erlenmeyer d'un litre amb 400 ml de medi d'alimentació amb la concentració de glucosa requerida a l'experiment.
- s'afegeix 1 ml de l'inòcul al medi i es col·loca l'erlenmeyer en un bany agitat a 30°C de temperatura. La variació del pH no es segueix, encara que no és molt forta en tot l'experiment.
- s'agafen mostres d'un ml del medi del cultiu a intervals d'una hora i es mesura l'absorbància a 650 nm. Quan la concentració de cèl·lules és elevada, les mostres es dilueixen abans de mesurar l'absorbància i posteriorment el valor obtingut es corregit amb la dilució.
- s'agafen mostres d'un ml per analitzar les concentracions de glucosa i etanol. Les mostres es filtren immediatament amb filtres de 0.45 μm per eliminar els llevats i a continuació s'afegeix el patró, sacarosa. Si no es poden analitzar immediatament, les mostres es congelen per tal d'assegurar que la reacció s'atura. Les mostres s'agafen al començament cada dues hores i, a partir de les vuit hores de creixement, amb més freqüència, donada la important variació de les concentracions de glucosa i etanol.

Els experiments finalitzen quan les cèl·lules arriben a la fase estacionària de creixement. Les concentracions de glucosa inicial emprades són de 50, 98, 150 i 188 g/l.

4.4. Mètode d'immobilització

Les cèl·lules a immobilitzar s'obtenen prèviament per proliferació i centrifugació i es resuspenen en un petit volum de salina fisiològica (solució de NaCl al 0.9%, pes/volum). A continuació es procedeix a la immobilització, que consisteix en les següents etapes:

- preparació d'una solució de carragenat en aigua destil·lada. Les concentracions oscil·len entre el 2 i 5 per cent en pes/volum, segons els experiments. La solució es prepara afegint el carragenat a l'aigua poc a poc i amb molt bona agitació. Per afavorir el procés i aconseguir una dissolució homogènia, s'escalfa fins a uns 60-80°C. A continuació la solució s'esterilitza a l'autoclau i es deixa refredar fins a 30-45°C.

- la solució de carragenat es barreja amb una quantitat de la solució de cèl·lules prèviament obtinguda, en funció de la densitat de cèl·lules que es vulgui obtenir a la preparació d'immobilitzat. La barreja es manté a una temperatura de 30-45°C per tal d'evitar la gelificació del carragenat.

— a continuació es procedeix a la formació de partícules esfèriques de gel. Per això la barreja carragenat-cèl·lules s'afegeix gota a gota sobre una solució de CaCl_2 al 2 per cent (pes/volum) lleugerament agitada. En anar caient les gotes sobre la solució es van formant immediatament esferes de gel amb cèl·lules incloses al seu interior, L'addició es fa amb una xeringa i s'ha preparat un dispositiu mitjançant el qual la força sobre l'èmbol de la xeringa és efectuada per aire a una pressió de 1-2 Kg/cm^2 . D'aquesta forma el diàmetre de les esferes es pot regular mitjançant el diàmetre de l'agulla i la pressió, encara que també influeixen altres factors.

— després de la gelificació, les partícules de cèl·lules immobilitzades es mantenen en la solució de CaCl_2 , a 4°C , durant 30 minuts.

— finalment es treu la solució de CaCl_2 i s'afegeix una solució de KCl al 2 per cent en pes/volum. Les partícules amb cèl·lules immobilitzades es mantenen en aquesta solució a 4°C durant 30 minuts. L'objectiu d'aquest pas i de l'anterior és l'enduriment de les partícules.

Tot el procediment d'immobilització es porta a terme en condicions estèrils.

4.5. Procediment per a l'estudi del creixement de les cèl·lules immobilitzades a l'interior del gel

Una de les caracteritzacions que es fan de les cèl·lules immobilitzades es l'estudi del seu creixement a l'interior dels gels de carragenat. Per aquest motiu es porten a terme una sèrie d'experiments en discontinu, on diferents concentracions inicials de cèl·lules són immobilitzades en la mateixa concentració de carragenat. A continuació les partícules de cèl·lules immobilitzades s'afegeixen a un erlenmeyer d'un litre amb 400 ml de medi d'alimentació d'una concentració de glucosa de 100 g/l. L'erlenmeyer es col·loca en un bany agitat a 30°C i l'evolució de la concentració de llevats a l'interior dels gels és seguida diàriament, desfent-ne uns quants i procedint al recompte de cèl·lules per formació de colònies. També es segueix l'evolució de la concentració de glucosa i quan aquesta s'exhaureix, el medi és canviat per medi d'alimentació fresc.

El procediment per a desfer els gels de carragenat es força senzill i consisteix en afegir unes 5 partícules sobre 10 ml de solució de citrat sòdic al 1 per cent (pes/volum). Tot seguit s'agita a 37°C durant 10 minuts i els gels es desfan. Les cèl·lules resuspeses de nou es poden comptar. Aquest procediment també es porta a terme, com a tots els del treball, en condicions estèrils i s'ha comprovat que les condicions emprades per a desfer els gels no afecten la viabilitat dels llevats.

4.6. Mètodes d'observació de les cèl·lules immobilitzades al microscopi

Per tal d'observar quin tipus de distribució i quin aspecte presenten les partícules amb cèl·lules immobilitzades, s'empren dos tipus de microscòpia: la microscòpia electrònica de rastreig i la microscòpia òptica.

La preparació dels gels per a la seva observació al microscopi electrònic de rastreig és la següent: primerament es deshidraten mantenint-los en mescles etanol-aigua cada vegada més concentrades en etanol (normalment es fa amb 20, 40, 60, 80 i 100 per cent d'etanol durant 10 minuts per cada barreja); després es fa el mateix tractament amb mescles d'acetat d'isoamil-etanol i tot seguit les partícules són sotmeses a la tècnica del punt crític amb CO_2 i, per últim, són metalitzades. El microscopi electrònic emprat és un ISI Super III A (Servei de Microscòpia Electrònica, Facultat de Ciències).

La microscòpia òptica és emprada per tal d'observar seccions transversals de les partícules amb cèl·lules immobilitzades. Aquestes seccions s'aconsegueixen mitjançant un criostat-microtom Miles Tissue-Tek II, on es congelen les partícules a -10°C i a continuació se'n fan talls de 5 i 10 μm de gruix. Els talls es col·loquen sobre un portaobjectes i s'observen amb un microscopi Leitz-Dialux 20 EB.

4.7. Procediment dels experiments de fermentació en continu

Aquests es realitzen en la instal·lació experimental prèviament descrita i la seva preparació requereix les següents etapes:

– preparació del medi d'aliment. Com en els demás casos es fa en dues parts. La solució amb tots els components del medi, excepte la glucosa, és esterilitzada a l'autoclaui dins del tanc de 20 l. La solució de glucosa s'esterilitza per filtració i posteriorment es mesclen ambdues.

– esterilització del muntatge experimental. Es fan en dues parts: per una banda el reactor i el tanc de recollida d'efluen s'esterilitzen a l'interior de l'autoclaui. Per altra banda la resta del muntatge s'esterilitza "in situ" amb vapor directe produït pel mateix autoclaui. Després de l'esterilització totes les sortides es tapen amb cotons estèrils per evitar contaminacions.

– preparació de les cèl·lules immobilitzades. Es procedeix segons el mètode ja descrit, produint-se un volum d'uns 250 ml per tal d'omplir tot el reactor.

– incubació de les cèl·lules immobilitzades. Consisteix en col·locar els gels en erlenmeyers amb medi d'alimentació i incubar-los a 30°C

durant tot un dia. L'objectiu d'aquesta incubació és augmentar el nombre de cèl·lules dins les partícules.

— posada en marxa. Les diferents parts del muntatge experimental es connecten segons l'esquema de la figura 1 i, a continuació, es comença a alimentar el fermentador.

L'experiment consisteix en ajustar una sèrie de cabals diferents d'alimentació i esperar que el fermentador arribi a l'estat estacionari en cada cas, aleshores s'agafen mostres per totes les preses de mostra distribuïdes al reactor per tal d'obtenir els perfils de concentracions. També es mesura la concentració de cèl·lules immobilitzades al principi i al final de l'experiment, així com la concentració de cèl·lules a l'efluent del reactor.

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.1. Cinètica de creixement en discontinu dels llevats

Com ja s'ha dit a l'apartat precedent, es realitzen quatre experiments de creixement en discontinu que es diferencien per la seva concentració inicial de glucosa: 50, 98, 150 i 188 g/l. Les evolucions de les concentracions de glucosa i etanol i de la biomassa es poden observar a les figures 2-5. Es pot observar que les corbes no presenten fase de latència i en canvi tenen una perllongada fase de creixement exponencial, deguda en part al baix percentatge d'inoculació (2%). A partir d'aquesta fase, la forma de les corbes varia substancialment degut a les diferents contribucions de la desaparició de substrat i l'acumulació de productes. Dels valors de la velocitat específica de creixement màxima (μ_m) obtinguts de la fase exponencial (veure taula I), es pot concloure que el creixement de la soca emprada no es veu molt afectat directament per la concentració inicial de sucre en el medi, dins dels marges en que es treballa.

TAULA I

Valors de μ_m pels experiments de creixement de llevats en discontinu.

Exp.	S_0 (g/l)	μ_m (hr ⁻¹)
A	50	0.566
B	98	0.578
C	150	0.547
D	188	0.535

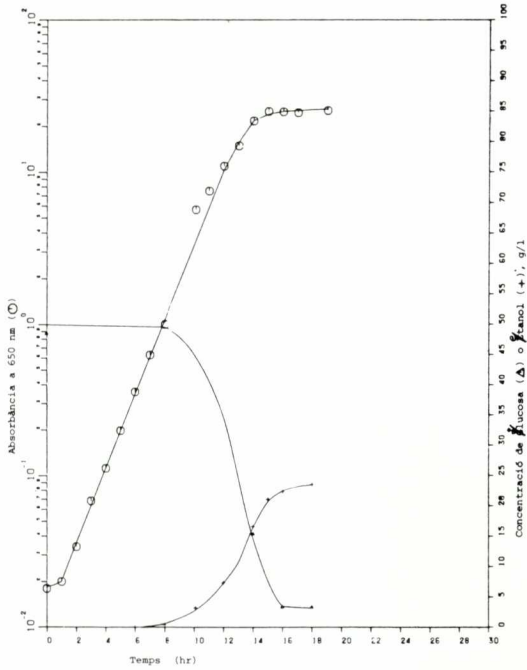


Fig. 2. Corba de creixement.
 $S_0 = 50$ g/l.

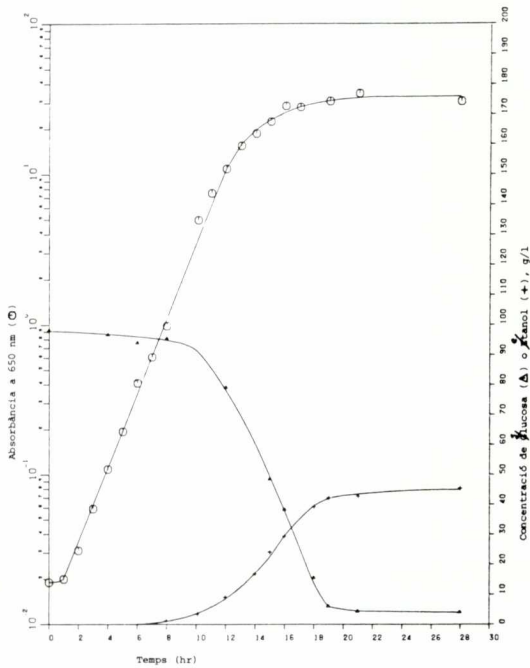


Fig. 3. Corba de creixement.
 $S_0 = 98$ g/l.

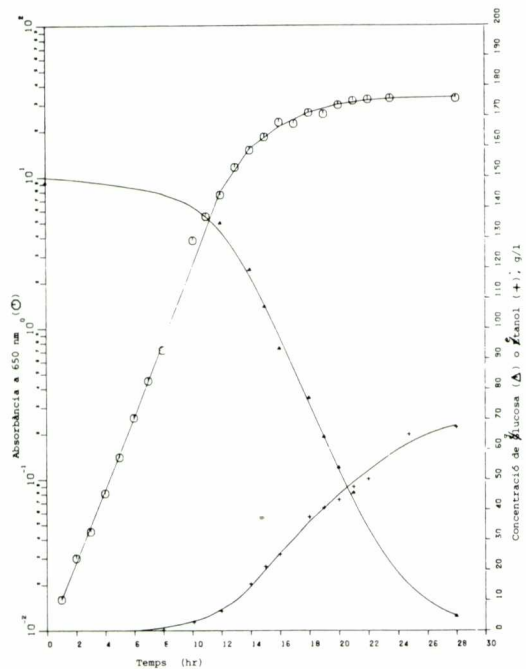


Fig. 4. Corba de creixement.
S₀ = 150 g/l.

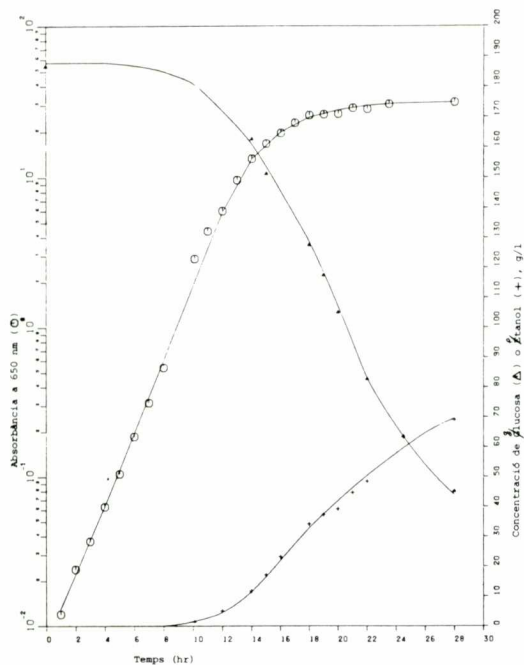


Fig. 5. Corba de creixement.
S₀ = 188 g/l.

Al representar els valors de la velocitat específica de creixement (μ) respecte a la concentració de substrat (figura 6) s'evidencia la inhibició exercida per l'etanol, ja que a valors elevats de S , μ decreix ràpidament i de forma molt diferent a si l'única causa limitant del creixement fos la desaparició de substrat, el que correspondria al model de Monod. Quan s'estudia la variació de μ i ν (velocitat específica de producció d'etanol) respecte a la concentració d'etanol (figures 7 a 10), s'observa que mentre μ decreix de forma immediata, ν roman constant un cert temps per començar a descendir a concentracions més elevades d'etanol. Així doncs la inhibició del producte afecta primer la velocitat de creixement i a continuació la de producció d'etanol.

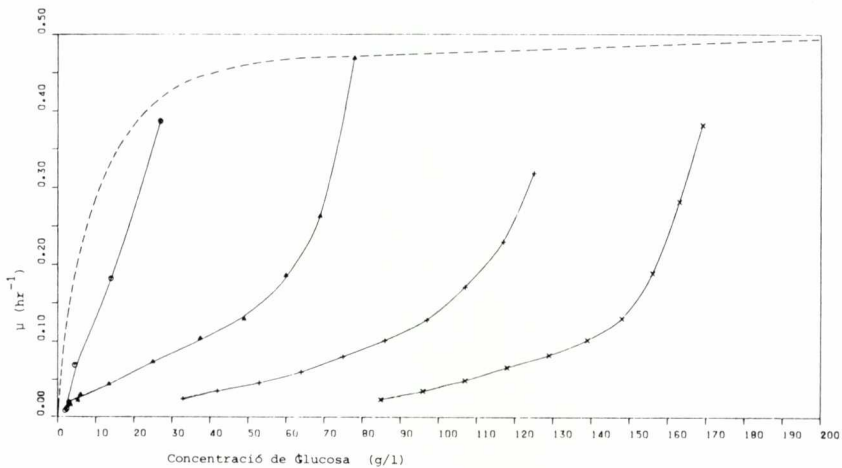


Fig. 6. Variació de μ en funció de S . \circ , $S_0 = 50$ g/l; Δ , $S_0 = 98$ g/l; +, $S_0 = 150$ g/l; X, $S_0 = 188$ g/l; --- Model de MONOD amb $\mu_m = 0.5$, $k_s = 3.0$.

Per portar a terme la modelització del creixement es realitzen ajustos de les dades a cinc models diferents entre els més utilitzats a la bibliografia. En aquests models, la velocitat específica de creixement es relaciona amb la concentració de substrat (S) segons la coneguda cinètica de Monod i, en canvi, tots ells proposen diferents formes de tenir en compte l'acció del producte. Són: el model d'inhibició no competitiva pel producte⁷ (equació 1), el model d'inhibició no competitiva pel producte amb un terme $(1-P/P_c)$ (equació 2), el model de Ghose i Tyafi⁸ (equació 3), el model de Levenspiel⁹ (equació 4) i el model d'inhibició no competitiva pel producte amb un terme relatiu a la biomassa (equació 5).

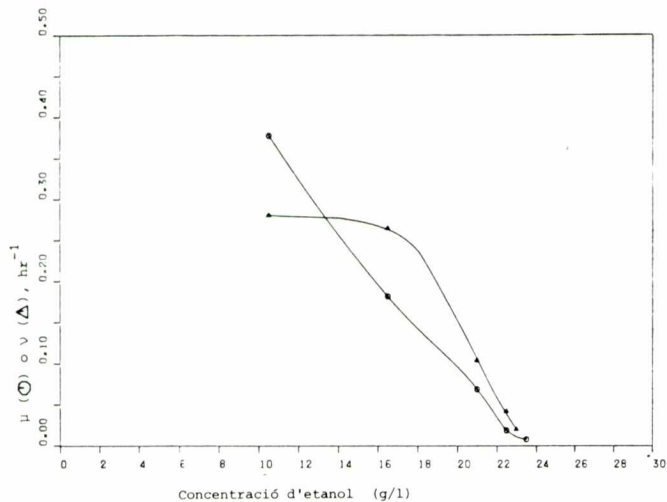


Fig. 7. Variació de μ i ν en funció de la concentració d'etanol. $S_0 = 50$ g/l.

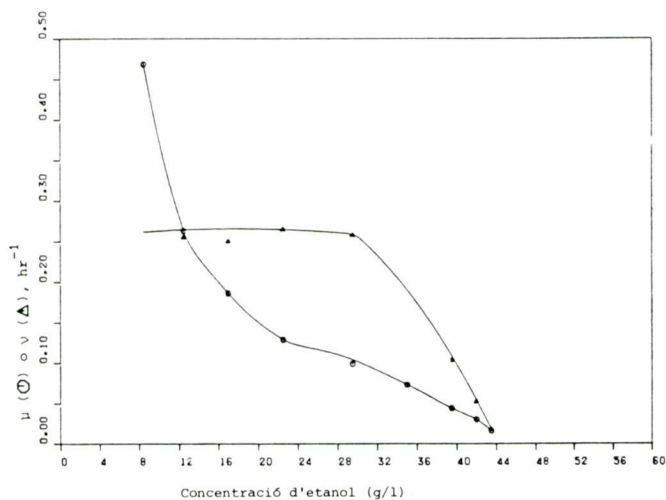


Fig. 8. Variació de μ i ν en funció de la concentració d'etanol. $S_0 = 98$ g/l.

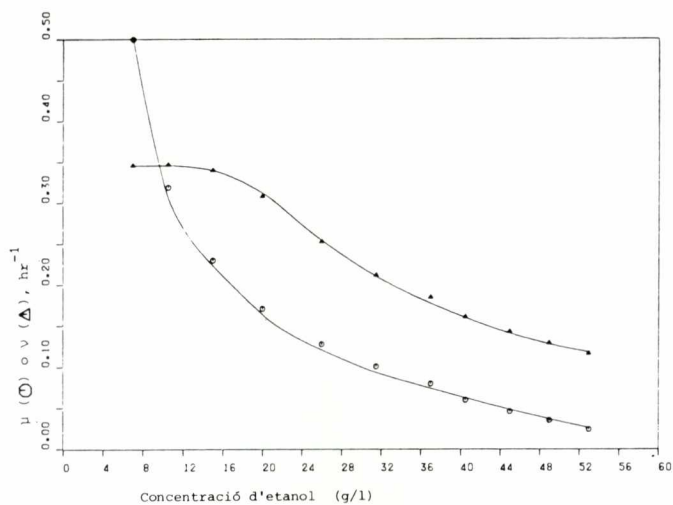


Fig. 9. Variació de μ i ν en funció de la concentració d'etanol. $S_0 = 150$ g/l.

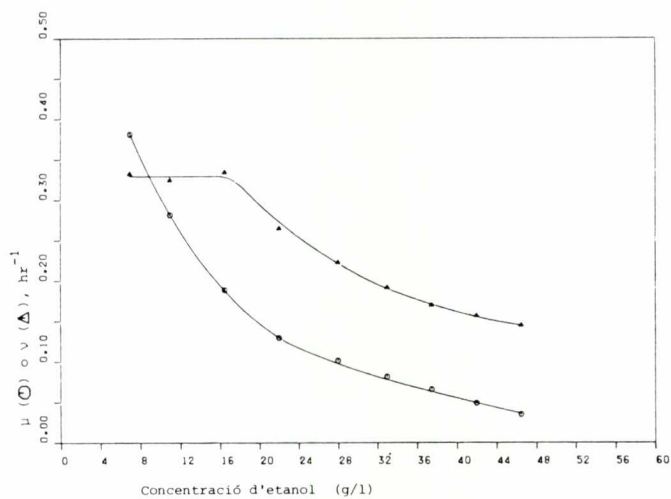


Fig. 10. Variació de μ i ν en funció de la concentració d'etanol. $S_0 = 188$ g/l.

$$\text{Equació 1.} \quad \mu = \mu_m \frac{S}{k_s + S} \frac{k_p}{k_p + P}$$

$$\text{Equació 2.} \quad \mu = \mu_m \frac{S}{k_s + S} \frac{k_p}{k_p + P} \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)$$

$$\text{Equació 3.} \quad \mu = \mu_m \frac{S}{k_s + S + \frac{S^2}{w k_s}} \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)$$

$$\text{Equació 4.} \quad \mu = \mu_m \frac{S}{k_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)^n$$

$$\text{Equació 5.} \quad \mu = \mu_m \frac{S}{k_s + S} \frac{k_p}{k_p + P} - k_x X$$

On μ és la velocitat específica de creixement,

μ_m és la velocitat específica màxima de creixement,

P és la concentració d'etanol,

S és la concentració de glucosa,

P_c és la concentració crítica d'etanol per sobre de la qual les cèl·lules no poden créixer,

i k_s, k_p, k_x, w i n són constants.

L'ajust numèric dels models a les dades experimentals (obtingudes per diferenciació gràfica de les corbes de creixement) es realitza mitjançant un programa de mínims quadrats no lineals segons el mètode de Marquardt¹⁰. Els resultats dels ajustos són raonablement bons en tots els casos, obtenint-se petits residus, però els valors dels paràmetres que s'obtenen són incongruents en la majoria dels casos. Així, a excepció del model 5, un mateix paràmetre assoleix valors molt diferents quan dades de diferents experiments s'ajusten a un mateix model. En el cas de μ_m , de la qual es té una determinació independent a partir de les corbes de creixement (veure taula I), els valors que s'obtenen als ajustos són sempre més alts que els reals. D'altra banda, quan algun dels paràmetres es fixa en un valor físicament raonable, de forma que la resta evoluciona a valors més congruents, els ajustos que s'obtenen són pitjors.

De fet, cal tenir en compte que l'ajust de models que arriben a tenir fins a quatre constants amb un sol tipus d'experiments és bastant difícil. Com exemple dels resultats obtinguts, a la taula II es donen els

valors de les constants de l'equació 1, que té tres paràmetres i és una de les més utilitzades pel fet de reflexar la naturalesa no competitiva de la inhibició. En ells s'observa la dispersió existent a l'emprar dades d'experiments diferents, en particular per la constant k_s , el valor de la qual és molt difícil d'ajustar.

TAULA II

Resultats dels ajustos efectuats amb l'equació 1.				
S_0 (g/l)	μ_m (hr ⁻¹)	k_s (g/l)	k_p (g/l)	Residu
50	1.0	29.58	28.82	$4.9 \cdot 10^{-3}$
98	0.59	4.91	9.21	$2.9 \cdot 10^{-4}$
150	0.616	83.12	20.2	$1.1 \cdot 10^{-4}$
188	4.49	190.0	1.6	$1.3 \cdot 10^{-3}$

L'excepció d'aquest comportament general, ja mencionada anteriorment, és l'equació 5. Els resultats obtinguts, en ajustar aquest model que té en compte l'efecte de la biomassa, donen valors de les constants bastant similars en tots els casos (taula III), la qual cosa indica que el model sembla apte per a descriure les corbes de creixement. No obstant això, els valors de les constants estan mancats de sentit físic, així μ_m es situa molt per sobre del seu valor real.

TAULA III

Resultats dels ajustos efectuats amb l'equació 5.					
S_0 (g/l)	μ_m (hr ⁻¹)	k_s (g/l)	k_p (g/l)	k_x	Residu
50	23.71	123.9	3.51	0.0108	$1.4 \cdot 10^{-2}$
98	35.85	170.1	2.90	0.0122	$6.4 \cdot 10^{-2}$
150	24.29	111.1	4.70	0.0187	$5.9 \cdot 10^{-3}$
188	25.52	108.9	7.30	0.0270	$2.6 \cdot 10^{-3}$

La informació que es pot treure d'aquest tractament de dades no és suficient per a fer una discriminació amb garanties entre els diferents models provats, encara que l'equació 5 té un comportament prou millor que la resta. De fet aquests resultats posen en dubte la validesa general d'aquests models, l'aplicació dels quals pot variar substancialment amb el tipus de dades i les condicions experimentals emprades. Cal afegir, a més a més, que les darreres investigacions sobre la naturalesa de la inhibició de la fermentació semblen indicar que no és l'etanol el seu

principal responsable, sinó alguna altra substància encara no determinada que s'acumula durant el creixement^{11 12}. Sens dubte l'aprofundiment en els mecanismes d'inhibició ha de contribuir a la formulació de models més acurats.

5.2. Selecció de les condicions d'immobilització i caracterització de les preparacions obtingudes

Concentració de carragenat i propietats hidrodinàmiques.

La variable fonamental que s'estudia en la selecció de les condicions d'immobilització és la concentració de carragenat, car aquesta afecta directament les propietats hidrodinàmiques del gel, la caracterització de les quals és fonamental per a fer experiments en continu en el reactor tubular. Per aquest motiu es preparen partícules esfèriques de gel amb diferents concentracions de carragenat, entre el 2 i el 5 per cent en pes/volum. La preparació segueix el mètode descrit a 4.4, però sense afegir cèl·lules. Les partícules de gel s'introdueixen en un tub de 2 cm de diàmetre i 20 cm de llargada (amb llana de vidre a cada extrem, per tal de confinar les partícules al seu interior), que es connecta a la resta del muntatge experimental en el lloc del reactor, i es mesura la pèrdua de càrrega en funció del cabal d'aigua destil·lada que es fa circular. La utilització del tub mencionat en lloc del reactor tubular té per objecte evitar la preparació de grans volums de gel.

Els resultats es presenten a les figures 11 i 12. A la figura 11 es pot veure que per una concentració de carragenat del 2 per cent, la pèrdua de càrrega augmenta molt per a cabals elevats, la qual cosa indica una destrucció parcial de les partícules de gel. En canvi a la figura 12 s'observa que per les demés concentracions de carragenat (3, 4 i 5 per cent) la pèrdua de càrrega varia línealment amb el cabal i no es produeix cap augment brusca a cabals elevats. El mateix comportament s'observa quan el tub es rebleix amb esferes rígides de vidre de diàmetre semblant a les partícules de gel (uns 4 mm).

D'aquestes observacions es dedueix que el comportament hidrodinàmic del gel es prou bo quan la concentració de carragenat és superior al 2 per cent. Cal remarcar que en aquests experiments s'empren cabals força superiors als que posteriorment s'utilitzen en els experiments en continu. Finalment es selecciona una concentració del 4 per cent per a portar a terme els següents experiments, atès que, a més a més d'una bona resistència mecànica i propietats hidrodinàmiques adequades, les solucions de carragenat al 4 per cent es mantenen en estat soluble a 37°C, sense que es produeixi cap tipus de gelificació. Això permet fer

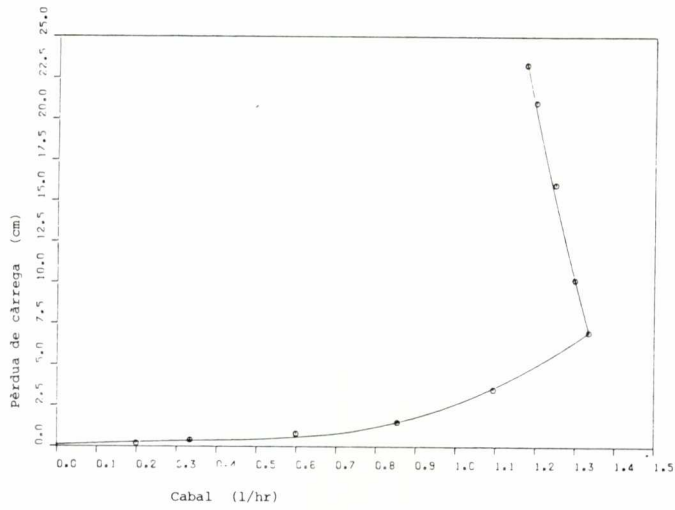


Fig. 11. Pèrdua de càrrega en funció del cabal de circulació. Gels del 2% en concentració de carragenat.

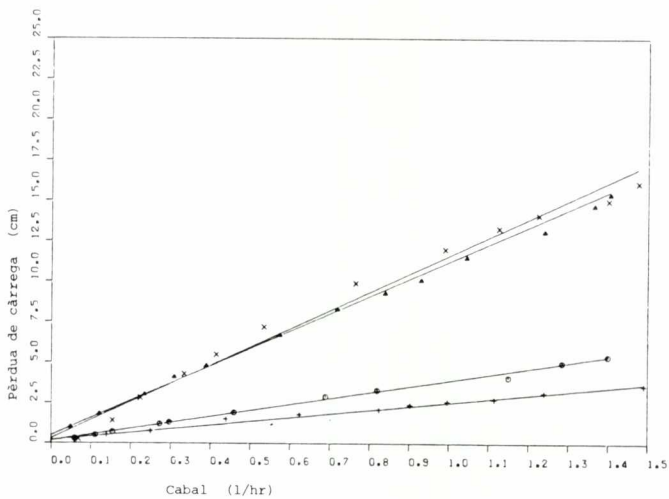


Fig. 12. Pèrdua de càrrega en funció del cabal de circulació. Gels cel 3% (●); 4% (△); 5% (+) en concentració de carragenat i esferes rígides (X).

la barreja carragenat-cèl·lules en condicions adequades per a la viabilitat de les cèl·lules.

Caracterització biològica de les cèl·lules immobilitzades.

Com ja s'ha assenyalat prèviament, s'ha comprovat que el mètode d'immobilització no afecta per a res la viabilitat de les cèl·lules, i també s'ha comprovat que el mètode era capaç d'immobilitzar un nombre força elevat de cèl·lules, de l'ordre de 10^9 cèl·lules per g de gel.

L'objectiu de la caracterització, que anomenem biològica, és observar si les cèl·lules creixen a l'interior del gel, i en cas que sigui així veure quina és l'evolució de la població.

Es duen a terme quatre experiments en els quals s'immobilitzen diferents concentracions de cèl·lules en gels de la mateixa concentració de carragenat (4 per cent) i es segueix la seva concentració a l'interior de les partícules. El mètode que s'utilitza per a mesurar la concentració de cèl·lules és el recompte d'unitats formadores de colònies, atès que, al començar a concentracions baixes de cèl·lules, el recompte directe al microscopi no es pot emprar i per altra banda el mètode espectrofotomètric no és adient degut a la interferència del carragenat. Cal recordar que les concentracions que s'obtenen per recompte d'unitats formadores de colònies (UFC) són més baixes que les trobades per recompte directe al microscopi. Les concentracions inicials al gel (en UFC per gram de gel) són les següents: 10^7 a l'experiment A, 10^6 a l'experiment B, 10^4 a l'experiment C i 10^3 a l'experiment D. Els resultats d'aquests experiments es presenten a les figures 13 a 16.

Es pot observar que als tres primers experiments la concentració de cèl·lules augmenta molt durant els dos primers dies fins arribar a un màxim, a continuació del qual comença a disminuir fins estabilitzar-se als voltants de 10^8 , independentment de la concentració inicial de cèl·lules que tingui el gel. D'altra banda les dades de l'experiment D són molt disperses i això és degut al creixement irregular en el gel, que es apreciable visualment. Degut a aquesta irregularitat, les partícules que s'agafen de mostra poden tenir concentracions de cèl·lules molt diferents.

Per tant, podem concloure que per a concentracions inicials de cèl·lules immobilitzades de l'ordre de 10^4 cèl·lules per gram de gel o superiors, les cèl·lules creixen d'una manera uniforme dins el gel i arriben a assolir una població estacionària.

Tambè s'aprecia en els quatre experiments que les cèl·lules surten fora de les partícules, ja que s'aprecia que la terbolesa del medi va augmentant, degut a la proliferació de cèl·lules a l'exterior del biocatalitza-

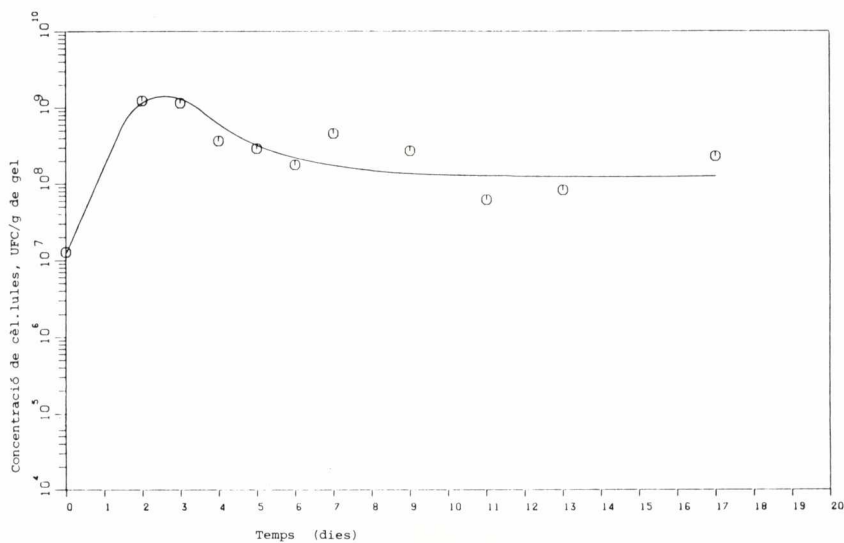


Fig. 13. Creixement de cèl·lules immobilitzades. Exp. A. Concentració inicial al gel = $1.29 \cdot 10^7$ UFC/g.

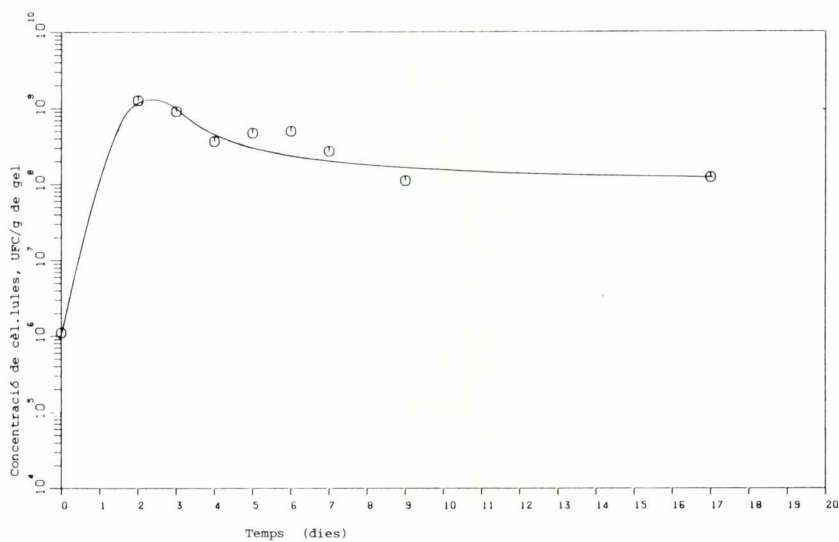


Fig. 14. Creixement de cèl·lules immobilitzades. Exp. B. Concentració inicial al gel = $1.1 \cdot 10^6$ cel./g.

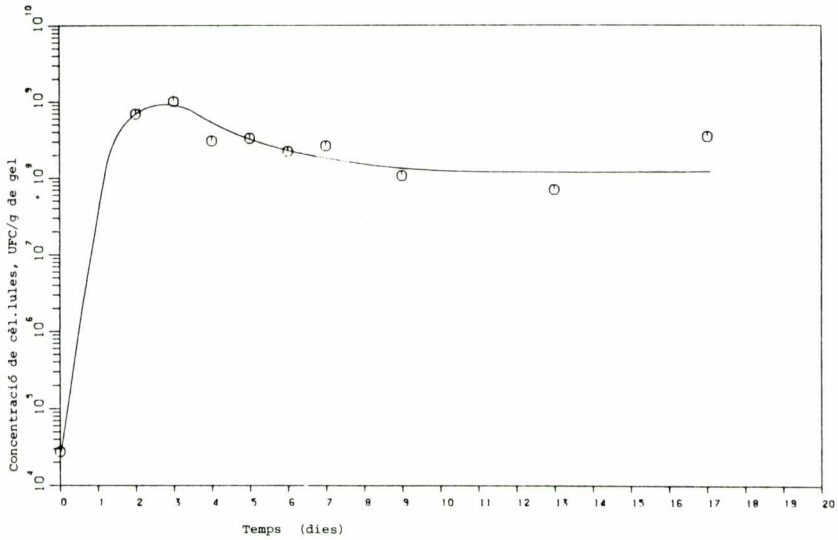


Fig. 15. Creixement de cèl·lules immobilitzades. Exp. C. Concentració inicial al gel = $2.74 \cdot 10^4$ cel./g.

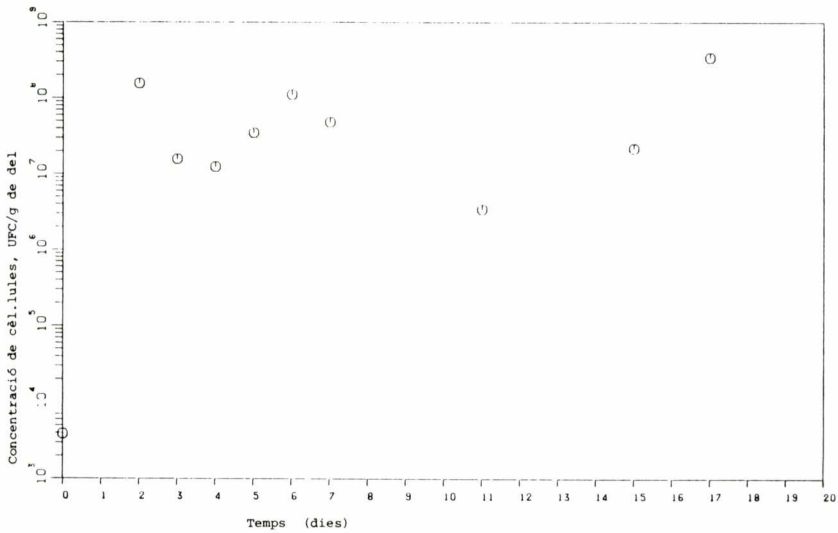


Fig. 16. Creixement de cèl·lules immobilitzades. Exp. D. Concentració inicial al gel = $3.9 \cdot 10^3$ cel./g.

dor. A més a més, la glucosa del medi s'exhaureix aproximadament en un dia. Ambdòs fets obliguen a canviar diàriament el medi d'alimentació, operació que s'aprofita per a rentar les partícules de gel amb solució de KCl al 2 per cent, per tal d'eliminar les cèl·lules adherides a l'exterior de les partícules i que poden passar fàcilment al medi fresc que s'afegeix. Malgrat aquesta precaució, es produeixen noves proliferacions al medi, degudes a noves cèl·lules que continuament surten fora del gel.

Els experiments tenen una duració de vint dies i en acabar es fa un recompte de la concentració de cèl·lules als gels i de la seva viabilitat, els resultats dels quals es donen a la taula IV.

Cal remarcar que, durant el creixement de cèl·lules a l'interior de les partícules, aquestes no sofreixen alteracions apreciables en el seu volum i forma.

TAULA IV

Recompte final de cèl·lules al microscopi després del creixement dins del gel i determinació de viabilitat.

Experiment	Concentració de cèl·lules (cel./g de gel)			Viabilitat (%)
	Vives	Mortes	Totals	
A	1.48 10^9	1.26 10^9	2.94 10^9	53.90
B	0.91 10^9	0.78 10^9	1.69 10^9	54.05
C	0.58 10^9	0.33 10^9	0.91 10^9	63.40
D	0.38 10^9	0.37 10^9	0.75 10^9	50.68

Per tal d'arribar als objectius fixats a l'apartat anterior, entre els quals es troba estudiar la distribució de cèl·lules a l'interior de les partícules, es veu la necessitat d'observar-les al microscopi.

Microscòpia electrònica de rastreig.

Amb aquest mètode només es poden observar partícules amb una elevada concentració de cèl·lules. En el cas de les partícules amb concentracions baixes, el mètode de deshidratació previ a l'observació microscòpica afecta molt seriosament el diàmetre de la partícula, que queda molt reduït.

S'observen partícules dels experiments de l'apartat anterior, quan la població a l'interior és alta, i s'obté evidència de:

- l'elevada densitat de cèl·lules a les partícules.
- la viabilitat de les cèl·lules i la seva capacitat de reproduir-se dins el gel.
- la sortida vers l'exterior de cèl·lules crescudes dins el gel.

Les darreres observacions s'il·lustren a la figura 17, on es presenten fotografies obtingudes per aquest mètode.

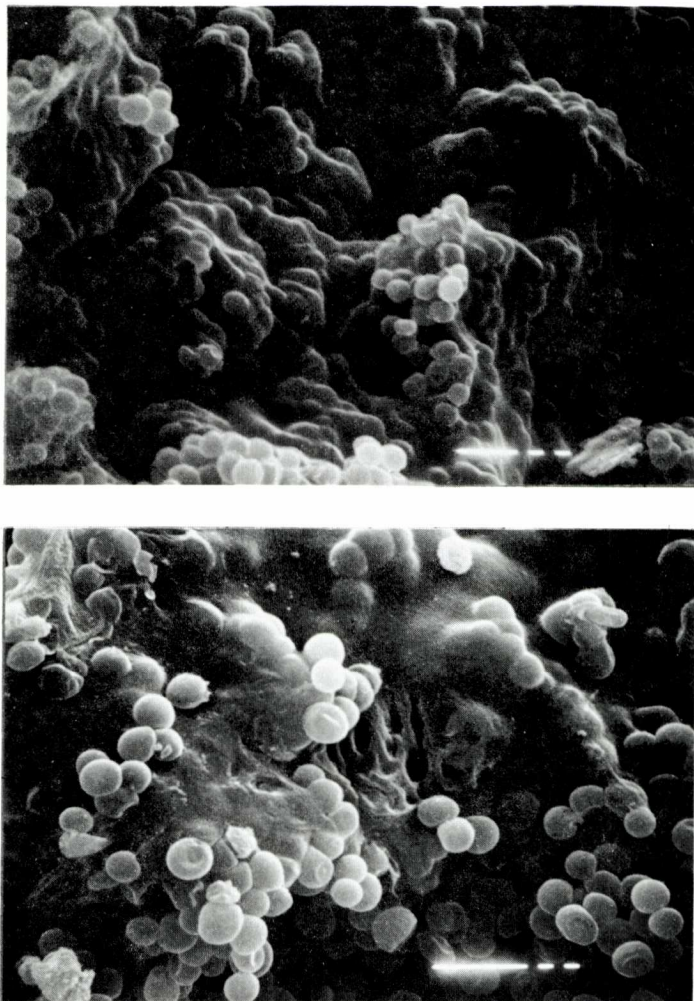


Fig. 17. Fotografies corresponents a l'observació de la paret externa de partícules amb cèl·lules immobilitzades mitjançant microscòpia electrònica de rastreig.

Microscòpia òptica.

Aquest mètode permet l'observació de seccions transversals de partícules, amb la qual cosa es pot determinar quina és la distribució de les cèl·lules al seu interior. A la figura 18 es poden veure les fotografies corresponents a un tall d'una partícula de l'experiment de l'apartat anterior, immediatament després de la immobilització, i a la figura 19 les corresponents a una partícula del mateix tipus en acabar l'experiment.

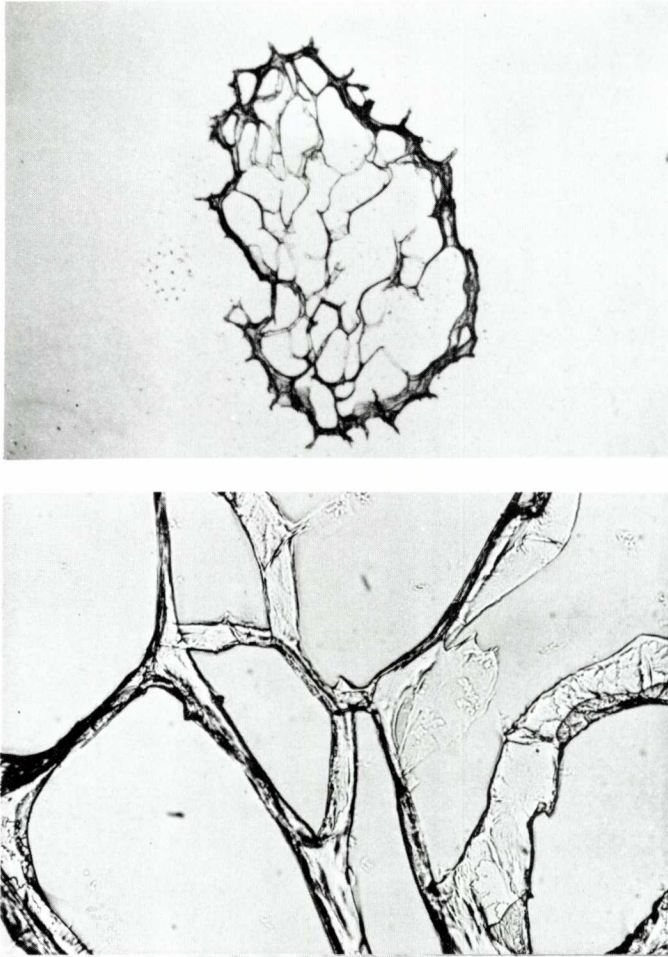


Fig. 18. Fotografies corresponents a l'observació al microscopi òptic d'un tall de $10\ \mu\text{m}$ de gruix d'una partícula de cèl·lules immobilitzades immediatament després de la seva formació.

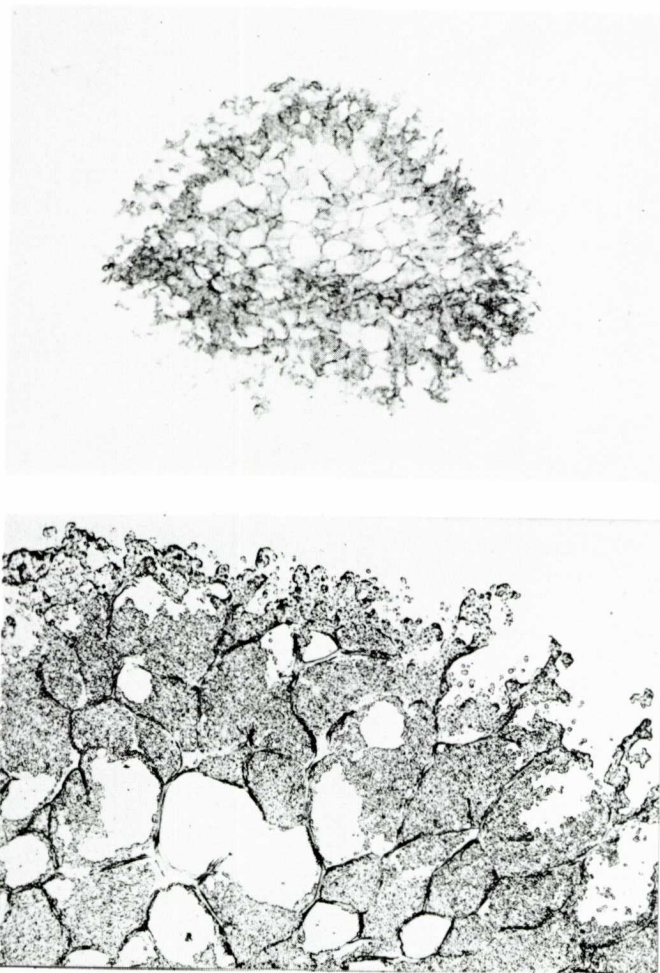


Fig. 19. Fotografies corresponents a l'observació al microscopi òptic d'un tall de $5 \mu\text{m}$ de gruix del mateix tipus de partícules de la figura 18 després de la seva incubació en medi de cultiu.

Les diferències entre els dos talls són remarcables. El primer sembla pràcticament buit i només s'observa l'estructura de les parets de carra-genat, que semblen més gruixudes a l'exterior. El segon, en canvi, té una elevada densitat cel·lular i l'espai al seu interior es distribueix en zones plenes de cèl·lules i espais buits que segurament corresponen a l'estructura porosa de la partícula. També és molt important en aquest tall l'evidència de que les cèl·lules han crescut més a la part exterior de la

partícula. Aquesta última consideració coincideix amb les fetes per altres autors^{13 14}, i indica una limitació del creixement dins el gel per la difusió del substrat. Per últim, també s'evidencia el creixement de cèl·lules cap a l'exterior de la partícula.

5.3. Fermentació alcohòlica en continu amb cèl·lules immobilitzades

Es porta a terme un experiment amb el reactor tubular reblit amb partícules de cèl·lules immobilitzades de diàmetre 4 mm aproximadament. La part del fermentador que no està en contacte directament amb la camisa de refrigeració, 5 cm a cada extrem, es rebleix amb partícules inerts de vidre per tal d'assegurar que el control de la temperatura sigui el més acurat possible a tot el reactor. Així doncs la longitud de la part del fermentador plena de cèl·lules immobilitzades és de 40 cm.

La preparació de l'experiment s'indica a 4.7 i cal fer esment especial de les precaucions que cal tenir per tal d'evitar qualsevol tipus de contaminació al sistema.

El medi d'alimentació té una concentració de 165 g/l de glucosa i pH 5.2, després d'esterilitzar-lo es deixa refredar i saturar d'aire durant un dia sencer. D'aquesta forma es considera que el nivell d'oxigen al medi és suficient per als requeriments de la fermentació. La temperatura del reactor es manté a 25°C.

La concentració de cèl·lules es segueix per recompte al microscopi. Es mesura la concentració al gel abans i després de l'experiment i la concentració de cèl·lules a la sortida del reactor. Els resultats obtinguts són els següents:

Concentració de cèl·lules al reactor (cel/g de gel)

Abans de l'experiment	9.75 10 ⁸
Després de l'experiment	1.25 10 ⁹

Concentració de cèl·lules a la sortida del reactor 2.07 10⁷

A les figures 20 a 22 es donen els resultats dels perfils de glucosa i etanol a l'interior del fermentador, corresponents a tres cabals diferents, seleccionats entre els cinc amb que s'ha treballat. A la taula V es donen les productivitats d'etanol i les principals característiques d'operació del reactor pels diferents cabals emprats. En aquests càlculs s'ha considerat que el volum líquid eficaç era el 40 per cent del volum total del llit, valor acceptat per a gels de carragenat i que té en compte l'acumulació de gas dins el reactor¹⁵.

El funcionament del reactor és, en general, prou satisfactori. S'observa que es poden aconseguir productivitats elevades d'etanol i que la concentració i viabilitat de les cèl·lules dins el reactor es mantenen a alts nivells durant els cinc dies d'operació. També s'evidencia que un elevat percentatge de la reacció es porta a terme en els primers quinze cm de reactor. D'altra banda, l'acumulació de bombolles de gas dins el reactor es prou important i la concentració de cèl·lules a la sortida força elevada.

TAULA V

Principals característiques d'operació del reactor tubular amb cèl·lules immobilitzades.				
Cabal (ml/hr)	Temps de residència (hr)	% utilització de sucres	Conc. etanol sortida (g/l)	Productivitat (g/l hr)
20.2	4.01	98.2	63.5	16.25
44.0	1.84	96.0	72.5	39.67
71.1	1.14	84.2	58.0	50.87
105.4	0.77	63.6	45.0	58.44
156.8	0.52	55.7	32.5	61.53

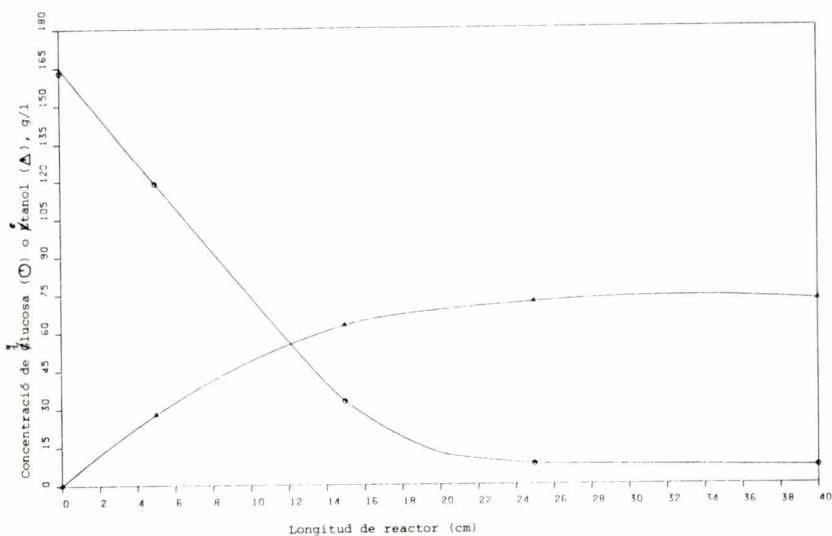


Fig. 20. Perfils de concentració al reactor en un experiment en continu. Cabal 44 ml/hr.

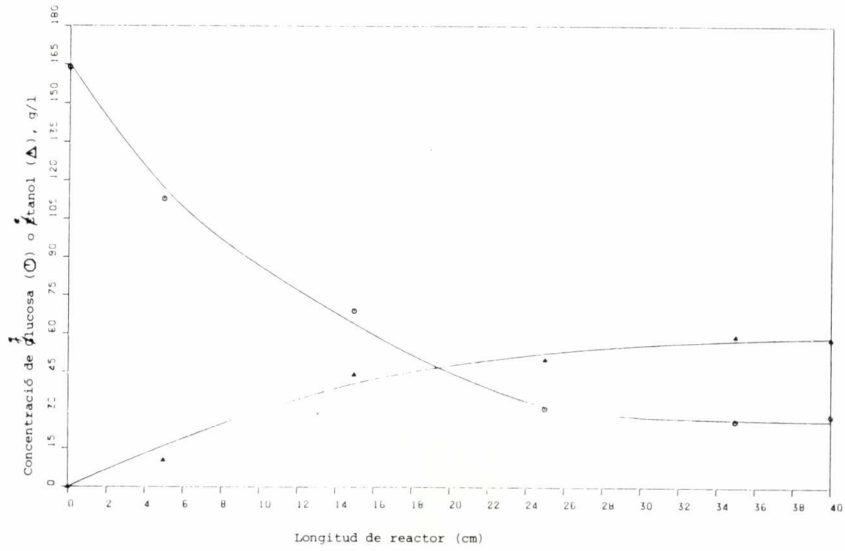


Fig. 21. Perfils de concentració al reactor en un experiment en continu. Cabal 71.12 ml/hr.

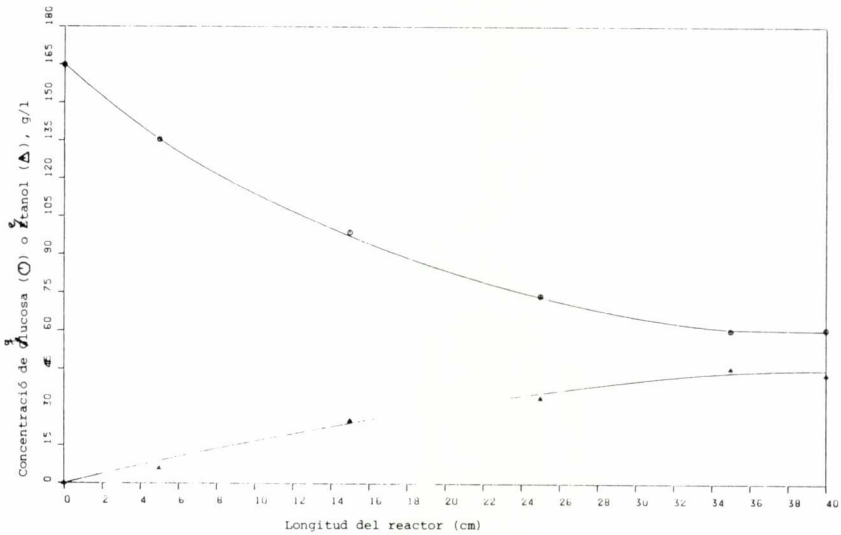


Fig. 22. Perfils de concentració al reactor en un experiment en continu. Cabal 105.41 ml/hr.

6. CONCLUSIONS

Les conclusions a les quals arribem després del treball efectuat són les següents:

- La cinètica de creixement en discontinu dels llevats seleccionats per a portar a terme el treball no es veu molt afectada per la concentració de glucosa inicial en els marges que s'ha treballat, però sí per la d'etanol que primerament inhibeix el creixement del llevat i tot seguit la seva capacitat fermentativa.

- La modelització matemàtica d'aquesta cinètica no s'ha pogut realitzar de forma completament satisfactòria. Entre els models estudiats, tanmateix, el que considera al mateix temps la inhibició no competitiva de l'etanol i l'efecte de la biomassa, sembla el més prometedor. De tota manera es fa necessari un aprofundiment en el coneixement dels mecanismes d'inhibició per poder formular models amb més sentit físic.

- s'ha posat a punt un mètode d'immobilització de cèl·lules emprant gels de carragenat, el qual és senzill, permet immobilitzar concentracions importants de cèl·lules i no afecta la seva viabilitat.

- les propietats mecàniques i hidrodinàmiques dels gels són adequades quan la seva concentració de carragenat és superior al 2 per cent.

- les cèl·lules immobilitzades per aquest mètode estan vives i es reproduïxen en presència de nivells adequats de nutrients. El creixement és més acusat a la part externa de les partícules i part de les cèl·lules surten a l'exterior de les mateixes.

- la població cel·lular a l'interior de les partícules de cèl·lules immobilitzades evoluciona cap a un estat estacionari, independentment de la concentració inicial, quan aquesta és de l'ordre de 10^4 cèl·l/g o superior.

- s'ha posat a punt una instal·lació experimental per a la producció en continu d'etanol en un reactor amb cèl·lules immobilitzades. Les seves productivitats són prou elevades. L'evolució de gas al seu interior és prou important i constantment surten cèl·lules cap a fora del reactor.

7. AGRAÏMENT

Aquest treball ha estat realitzat amb l'ajut econòmic de la Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica de la Generalitat de Catalunya.

8. NOMENCLATURA

A₆₅₀ Absorbància a 650 nm

k_s Constant del terme de substrat als models de creixement, g/l

k_p	Constant del terme de producte als models de creixement, g/l
P	Concentració d'etanol, g/l
P_c	Concentració de producte (etanol) crítica per sobre de la qual les cèl·lules no poden créixer, g/l
S	Concentració de substrat, g/l
t	Temps, hr
UFC	Unitats formadores de colònies
X	Concentració de cèl·lules
μ	Velocitat específica de creixement de cèl·lules, hr^{-1}
ν	Velocitat específica de producció d'etanol, hr^{-1}

Subíndex

0	Condicions inicials
m	Valor màxim

9. BIBLIOGRAFIA

1. TSAO, G.T. i Col.; *Process Biochem.*, 17 (5), 34-38 (1982)
2. MARIORELLA, B.; WILKE, C.R. i BLANCH, H.W.; *Adv. in Biochem. Eng.*, 20, 43-92 (1981)
3. VENKATASUBRAMANIAN, K. (Ed.): "Immobilized Microbial Cells", ACS SYMP. Series, 106, Amer. Chem. Soc., Washington (1978)
4. JACK, T.R. i ZAJIC, J.E.; *Adv. in Biochem. Eng.*, 5, 125-144 (1977)
5. LEE, S.S. i Col.; *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, 11, 641-649 (1981)
6. GERHARDT, P. (Ed.): "Manual of Methods for General Bacteriology". Am. Soc. for Microbiol., Washington (1981)
7. NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M. i GOMA, G.; *Biotechnol. and Bioeng.*, 23, 201-211 (1981)
8. TYAGI, R.D. i GHOSE, T.K.; *Biotechnol. and Bioeng.*, 24, 39-44 (1982)
9. LEVENSPIEL, O.; *Biotechnol. and Bioeng.*, 22, 1671-1687 (1980)
10. ROBERTS, G.W.; a: "Computer Programs for Chemical Engineering Education", M. Reilly (Ed.), Vol. 2, Aztec Publishing Co., Austin (1972)
11. STREHAIANO, P.; MOTA, M. i GOMA, G.; *Biotechnol. Lett.*, 5, 135-140 (1983)
12. SHIN, C.S.; DAMIANO, D.; JU, N.K. i WANG, S.S.; *Biotechnol. Lett.*, 5, 831-836 (1983)
13. SIESS, M.H. i DIVIES, C.; *Eur. J. of Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 12, 10-15 (1981)
14. WADA, M. i Col.; *Eur. J. of Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 10, 275-287 (1980)
15. LINKO, P. i LINKO, Y.Y.; *Enz. Eng.*, 6, 335-342 (1981)