



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Producción de compuestos de alto valor añadido a partir de gases de efecto invernadero en biorreactores

Producción de compostos de alto valor engadido a partir de gases de efecto invernadoiro en biorreactores

Production of high added-value compounds from greenhouse gases in bioreactors

María Clerins González-Sierra

Curso: 2020-2021. Convocatoria: diciembre

Director: Dr. Christian A.M. Henri Kennes

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de fin de grado se lo dedico a mis padres, María y Anthony, que siempre han confiado en mí y me han dado todo su apoyo, además de poder darme la oportunidad de estudiar una carrera y darme una educación plena tanto a mi hermana pequeña como a mí. También se lo quiero dedicar a mis abuelos, mi hermana, mis tíos por apoyarme y ayudarme a lo largo de mi vida tanto personal como académica.

A mis amigos, tanto a los de toda la vida como a mis compañeros de la Universidad de A Coruña que me ayudaron en esta última etapa académica. En especial agradecer a Sara Fernández y Antonio Ramos por confiar siempre en mí.

Por último, quiero agradecer a mi director Dr. Christian Kennes, quien me ha ayudado, guiado y aconsejado en cada parte de este trabajo tanto dentro como fuera del laboratorio en estos tiempos difíciles y diferentes debido a la situación sanitaria durante este año 2020. También agradecer a mi compañero de laboratorio Raúl Robles Iglesias, gracias por todo lo que me has aconsejado y enseñado, te deseo todo lo mejor.

INDICE

Contenido

1.RESUMEN	1
Palabras clave.....	1
RESUMO	2
Palabras chave.....	2
ABSTRACT	3
Keywords.....	3
CRONOGRAMA.....	4
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 El cambio climático.....	7
2.2 Vías alternativas de energía renovable con biocombustibles.....	8
2.3 Métodos de producción de compuestos de alto valor añadido a partir de gases.....	9
2.4 Bacterias anaerobias	12
2.5 Ruta Wood-Ljungdahl.....	13
2.6 Bacterias acetogénicas	15
2.6.1. <i>Acetobacterium woodii</i>	16
2.7 Estudio a desarrollar	17
2.8 Objetivo	18
2.9 Antecedentes	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Reactivos y medios de cultivo	20
3.2. Inoculación de la bacteria	27
3.3 Toma de muestra	28
4. EQUIPOS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	29
4.1 Medición de pH	29
4.2 Medidas de absorbancia en espectrofotómetro UV/VIS	30
4.3 Análisis de muestras de líquido en HPLC	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
5.1 Estudio de la producción de ácido acético con la bacteria <i>Acetobacterium woodii</i>	32
6.CONCLUSIONES	34
CONCLUSIÓNS	34
CONCLUSIONS	34
7. BIBLIOGRAFIA.....	36

1.RESUMEN

Uno de los problemas más importantes en la actualidad es el cambio climático, aumentando la temperatura del planeta. Esto es consecuencia de la producción de los denominados gases de efecto invernadero, entre ellos se encuentra el CO₂ que es uno de los más importantes, producido por la combustión de gas natural, carbón y petróleo.

Este problema lleva a científicos a investigar nuevas tecnologías como el uso de biocombustibles como alternativa para la obtención de nuevas fuentes de energía renovables. Para la obtención de estos biocombustibles se emplea biomasa, residuos, o incluso gases contaminantes (por ejemplo, CO₂ o CO). Es un método novedoso que permite obtener beneficios medioambientales como son la eliminación de contaminantes y gases de efecto invernadero, y además la obtención de combustibles de alto valor añadido.

Este estudio basa su investigación en la conversión del CO₂ en ácido acético (CH₃COOH). A través de una reacción de CO₂ y el H₂ generado, llevada a cabo en un medio de reacción, en condiciones anaerobias y por una bacteria acetogénica se obtiene el ácido acético. El experimento se llevó a cabo empleando la bacteria acetogénica *Acetobacterium woodii*.

El CO₂ es un compuesto química y termodinámicamente estable debido al elevado estado de oxidación del carbono (IV), por lo que requiere condiciones altamente reductoras para conseguir su reducción. Estas condiciones se consiguen con el H₂ generado por reacción del hierro de valencia cero en medio acuoso y en condiciones anaerobias.

En la obtención final del ácido acético a partir de CO₂ es necesario una bacteria acetogénica, ya que mediante una reacción bioquímica que usa el CO₂ y el H₂, y empleando una ruta metabólica conocida como vía de Wood-Ljungdahl, esta bacteria genera ácido acético (CH₃COOH) en condiciones anaerobias.

Palabras clave

Cambio climático, efecto invernadero, dióxido de carbono, hidrógeno, hierro de valencia cero, bacteria acetogénica, ruta Wood-Ljungdahl, ácido acético, condiciones anaerobias.

RESUMO

Un dos problemas máis importantes na actualidade é o cambio climático, aumentando a temperatura do planeta. Isto é consecuencia da produción dos denominados gases de efecto invernadoiro, entre eles atópase o CO_2 que é un dos máis importantes producido pola combustión de gas natural, carbón e petróleo

Este problema leva a científicos a investigar novas tecnoloxías como ou uso de biocombustibles como alternativa para a obtención de novas fontes de enerxía renovables. Para a obtención destes biocombustibles emprégase biomasa, residuos, o incluso gases (por exemplo, CO_2 , CO). É un método novo que permite obter beneficios ambientais como son a eliminación de contaminantes e gases de efecto invernadoiro, e ademais a obtención de combustibles de alto valor engadido.

Este estudo basea a súa investigación na conversión do CO_2 en ácido acético (CH_3COOH). A través dunha reacción de CO_2 e o H_2 xerado, que se leva a cabo nun medio de reacción, en condicións anaerobias e por unha bacteria acetogénica obtense o ácido acético. O experimento se levou a cabo empregando a bacteria acetogénica *Acetobacterium woodii*.

O CO_2 é un composto química e termodinamicamente estable debido ao elevado estado de oxidación do carbono (IV), polo que require condicións altamente redutoras para conseguir a súa redución. Estas condicións conséguense co H_2 xerado da reacción do ferro de valencia cero en medio acuoso e en condicións anaerobias.

Para a obtención final do ácido acético a partir de CO_2 é necesario unha bacteria acetoxénica, xa que mediante unha reacción bioquímica que usa o CO_2 e o H_2 , empregando un roteiro metabólico que se coñece como vía de Wood- Ljungdahl xera o ácido acético (CH_3COOH) en condicións anaerobias.

Palabras chave

Cambio climático, efecto invernadoiro, dióxido de carbono, hidróxeno, ferro de valencia cero, bacteria acetogénica, ruta Wood- Ljungdahl, ácido acético, condicións anaerobias.

ABSTRACT

One of the most important problems today is climate change, increasing the temperature of the planet. This is a consequence of the production of so-called greenhouse gases (GHG), including CO₂, which is one of the most important produced by the combustion of natural gas, coal and oil.

This problem leads scientists to investigate new technologies such as the use of biofuels as an alternative for obtaining new renewable energy sources. Biomass, wastes, or even volatile pollutants (for example CO₂, CO) are used to obtain these biofuels, and this is a novel method that allows obtaining environmental benefits such as the elimination of pollutants and greenhouse gases, as well as obtaining high added-value fuels.

This study focuses its research on the conversion of CO₂ to acetic acid (CH₃COOH). Through a reaction of CO₂ and the generated H₂, carried out in a reaction medium, under anaerobic conditions and by an acetogenic bacteria, acetic acid is obtained. The experiment was carried out using the acetogenic bacteria *Acetobacterium woodii*.

CO₂ is a chemically and thermodynamically stable compound due to the high oxidation status of its carbon (IV), so it requires highly reducing conditions to achieve its reduction. These conditions are achieved with the H₂ generated by the reaction with zero valence iron under anaerobic conditions.

In the final production of acetic acid from CO₂ an acetogenic bacterium is necessary, since by means of a chemical reaction using CO₂ and H₂, using a metabolic pathway of Wood-Ljungdahl, it generates acetic acid (CH₃COOH) under anaerobic conditions.

Keywords

Climate change, greenhouse effect, carbon dioxide, hydrogen, zero valence iron, acetogenic bacteria, Wood-Ljungdahl pathway, acetic acid, anaerobic conditions.

CRONOGRAMA

- Presentación del TFG
- Entrada en el laboratorio y comienzo del experimento
- Final del experimento
- Revisión bibliográfica y redacción del TFG

Febrero						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
					1	2
3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	

Marzo						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
						1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28	29
30	31					

Abril						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30			

Mayo						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
				1	2	3
4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31

Septiembre						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30				

Diciembre						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31			

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El cambio climático

El cambio climático y sus consecuencias es un tema que preocupa bastante en la actualidad. Existen diferentes causas que provocan este cambio climático, aunque una de las más importantes es la emisión, como resultado de la actividad humana, de los gases de efecto invernadero entre los que se encuentra el CO₂, uno de los gases de efecto invernadero de mayor importancia. Otro gas, el CO es un gas tóxico que debido a las emisiones de gases industriales ha sido emitido al medio ambiente en grandes cantidades, igual que el CO₂. Otros gases conocidos son, por ejemplo, los clorofluorocarbonados (CFC), el metano (CH₄) o el monóxido de dinitrógeno (N₂O). Estos gases incrementan la capacidad de la atmósfera para retener calor, dando lugar al calentamiento global.¹

Algunas de las evidencias de la existencia de un cambio climático que es un problema a escala mundial son, por ejemplo, las siguientes: aumento de la temperatura media del planeta, la subida del nivel del mar, o el deshielo en el Ártico. El aumento de las temperaturas medias se debe a la emisión a la atmósfera de gases de efecto invernadero. Estos gases absorben la radiación térmica que emite el planeta y la irradia en todas las direcciones impidiendo que se libere al espacio y devolviéndola a la superficie terrestre. La temperatura global media entre 2015-2019 está en camino de ser la más cálida de cualquier otro período registrado, se estima un incremento de 1,1°C; un grado más que en el período preindustrial. Además, los niveles de los principales gases de efecto invernadero han alcanzado niveles récord. El CO₂ es uno de los gases de efecto invernadero más relevante, la concentración de CO₂ atmosférico aumentó desde la era preindustrial de 280 μmol mol⁻¹ (ppm) a más de 420 ppm, pudiendo llegar a final de siglo a más de 800 ppm.^{2, 3}

El cambio climático provocado por el efecto invernadero tiene graves consecuencias y amenazas hacia la población, ya que puede provocar una mayor frecuencia de fenómenos meteorológicos y de mayor intensidad, además de la desaparición de numerosas especies tanto vegetales como animales. Otras consecuencias relacionadas con la salud son posibles golpes de calor o infecciones transmitidas por vectores⁴. Por todos estos motivos, es importante que se adapten las medidas necesarias a nivel mundial por todos los países para la reducción de la emisión de los gases de efecto invernadero, en especial del CO₂, invirtiendo en la ciencia y la tecnología.

Una medida para minimizar esta emisión de gases y, por lo tanto, el cambio climático es la producción de energía con fuentes renovables en vez de fuentes de origen fósil como carbón o gas natural y la producción de combustibles a partir de estos gases de efecto invernadero.

Debido a todo esto y a que los combustibles fósiles cada vez escasean más, es necesario encontrar nuevas alternativas de fuentes de energía renovables y respetuosas con el medio ambiente. Un ejemplo de producir energía es el uso de biocombustibles, aunque se deben cumplir unos requisitos como son: reducir la contaminación, competir económicamente con las fuentes no renovables, que sea sostenible... Los biocombustibles son combustibles derivados de la biomasa. Las tecnologías que usan la biomasa reducen las emisiones de CO₂, y simultáneamente producen productos o combustibles valiosos a través de procesos como la hidrólisis y la fermentación, aunque usando este método existen también preocupaciones.⁵

Otra forma de reducir las emisiones de gases como el CO₂, y además combatir la disminución de recursos fósiles, es el desarrollo de una economía circular. Esta economía circular consiste en aprovechar mejor los recursos y materias primas disponibles, (re)utilizar residuos, utilizar fuentes renovables (por ejemplo, la biomasa), o usar los azúcares contenidos en ciertas materias lignocelulósicas, como residuos agroindustriales, para la producción de biocombustibles.⁶

2.2 Vías alternativas de energía renovable con biocombustibles

Los biocombustibles se pueden clasificar en dos tipos, dependiendo de la manera en la que se obtengan: biocombustibles de primera generación y biocombustibles de segunda generación. Los de primera generación (por ejemplo, bioetanol, biodiesel, biogas) se producen a partir de recursos renovables que provienen de cultivos agrícolas, por lo que tienen la principal desventaja de que compiten con el suministro de alimentos; el azúcar, almidón o aceite vegetal que se obtienen de los cultivos son transformados, por ejemplo, en biodiesel o bioetanol. Los de segunda generación se obtienen, principalmente, a partir de biomasa o residuos lignocelulósicos en lugar de cultivos alimentarios⁷. Esta biomasa puede ser residuos agrícolas, desechos orgánicos y cultivos energéticos. El material lignocelulósico que se emplea para la obtención de los biocombustibles de segunda generación, no se puede fermentar fácilmente por microorganismos, ya que está formado por polímeros en vez de azúcares libres, por lo que será necesario llevar a cabo una serie de pretratamientos bioquímicos o termoquímicos⁸. El tratamiento bioquímico consiste en una hidrólisis enzimática que rompe el complejo lignocelulósico

obteniendo hemicelulosa, lignina y celulosa; los materiales con menor cantidad de lignina son más favorables, ya que la hidrólisis es más fácil sin estos materiales, y cuanto mayor contenido en celulosa y hemicelulosa mayor producción de biocombustible. La hemicelulosa y la celulosa están formadas por moléculas de azúcares y pueden ser fácilmente fermentados por microorganismos, mientras que la lignina no. Por otro lado, el tratamiento termoquímico consiste en la gasificación de biomasa en gas de síntesis (principalmente CO, CO₂ y H₂) empleando elevadas temperaturas. Este gas (“syngas”) es fácilmente fermentable y se utiliza como sustrato para la producción de biocombustibles por microorganismos, como las bacterias acetogénicas. Este proceso se resume en la figura 1. ⁹

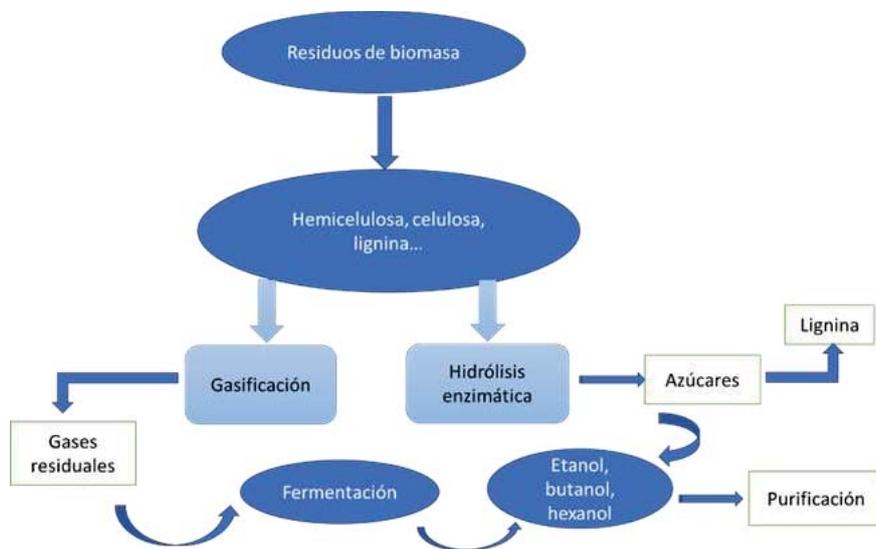


Figura 1. Producción de etanol, butanol y hexanol a partir de fuentes renovables ⁹

Los gases ricos en monóxido de carbono, y también dióxido de carbono, como son los gases residuales de industrias metalúrgicas o refinerías, por ejemplo, también se pueden utilizar para la obtención de biocombustibles. El uso de estos gases con un elevado efecto invernadero se pueden eliminar mediante la fermentación anaerobia.

2.3 Métodos de producción de compuestos de alto valor añadido a partir de gases

Hay numerosas investigaciones sobre microorganismos anaerobios capaces de realizar el proceso de fermentación y crecer con gases como CO, CO₂, o H₂ mediante vías de bioconversión anaerobias. Estos microorganismos son las bacterias acetogénicas o acetógenos, son bacterias anaerobias que pueden utilizar estas moléculas de CO, CO₂, H₂ en diferentes condiciones y concentraciones como sustrato para crecer y producir productos como ácidos o alcoholes. Estas bacterias pueden también utilizar biomasa, desechos o residuos lignocelulósicos como sustratos. Estas vías de bioconversión

consisten en la descomposición de compuestos biodegradables en ausencia de oxígeno, entre ellas se encuentran la acetogénesis y la metanogénesis. La primera etapa consiste en la hidrólisis o descomposición biológica de partículas orgánicas complejas como celulosa en compuestos más simples que puedan ser adsorbidos por la pared celular, estas moléculas hidrolizadas son metabolizadas y transformadas por bacterias fermentativas en alcoholes y ácidos grasos, teniendo como resultado final la producción de H_2 y CO_2 . Durante la acidogénesis, los compuestos solubles resultantes de la etapa anterior son transformados a través de bacterias fermentativas mediante un proceso de fermentación, dando lugar al crecimiento de la bacteria y a la producción de ácido acético, H_2 y CO_2 a valores de pH óptimos para el crecimiento (pH=6 aproximadamente). La acidogénesis también puede tener lugar con la oxidación de ácidos grasos de cadena corta o alcoholes, además de con la reducción del CO_2 . La metanogénesis consiste en la producción de metano a partir de dos tipos diferentes de microorganismos: los que producen metano y CO_2 mediante la degradación del ácido acético, y los que producen metano y agua a partir del H_2 y CO_2 resultante de etapas anteriores. La producción de ácidos provoca una acidificación del medio, la disminución del pH inhibe el crecimiento de biomasa y favorece la solventogénesis, que consiste en la producción de alcoholes, aunque no siempre es posible. El pH es un factor muy importante durante la fermentación, ya que determina la naturaleza de los productos finales. Mientras que los pH altos favorecen el crecimiento de la biomasa y la producción de ácidos, los pH bajos son más favorables a la producción de disolventes (por ejemplo, alcoholes). La digestión anaerobia se ha utilizado para producir metano, hidrógeno y productos químicos de alto valor añadido. El producto final principal que se obtiene en la digestión anaerobia es el biogas, una mezcla gaseosa de metano y CO_2 (Figura 2).¹⁰

Este método es una tecnología que permite un consumo bajo de energía y el empleo de materia prima es flexible, ya que puede utilizar tanto gases de efecto invernadero (CO_2) como gases residuales que contienen CO procedentes de procesos industriales como puede ser el caso de la industria metalúrgica.

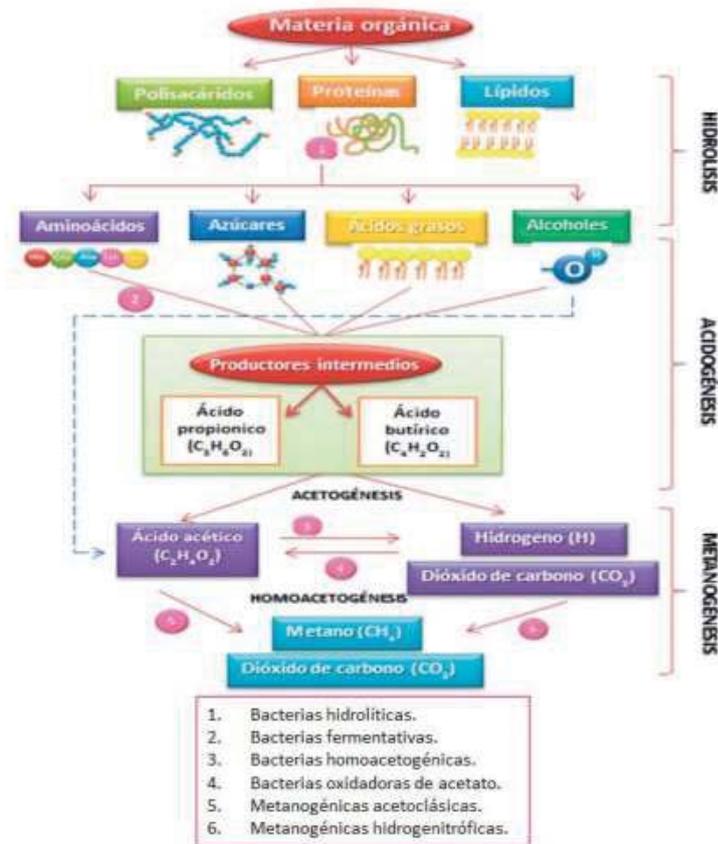


Figura 2. Digestión anaerobia ¹¹

Las bacterias aerobias también son estudiadas para la producción de compuestos de alto valor añadido a partir de gases, especialmente las bacterias carboxidotróficas. Estas bacterias pueden crecer en CO_2 , H_2 y CO (*syngas*) a través de la vía reductora de la pentosa fosfato para el anabolismo y el O_2 que actúa como aceptor de electrones. La vía de la pentosa permite la construcción de moléculas a partir de unidades más pequeñas. El *syngas* es un gas combustible que consiste principalmente en monóxido de carbono (CO), hidrógeno (H_2), dióxido de carbono (CO_2), vapor de agua (H_2O), metano (CH_4), nitrógeno (N_2), algunos hidrocarburos en muy baja cantidad y contaminantes, como partículas de carbono, alquitrán y cenizas¹². Este proceso se lleva a cabo en dos etapas principales: la fase oxidativa y la fase de síntesis no oxidativa de azúcares de cinco carbonos. En la fase oxidativa se genera el NADPH (Figura 3). La oxidación aerobia de CO es capaz de generar una mayor cantidad de ATP que la fermentación anaerobia, aunque es necesario que se investigue más acerca sobre las herramientas moleculares para las bacterias aerobias carboxidotróficas, pocas de ellas se han estudiado con detalle hasta el momento. También es importante un mayor estudio sobre la producción de cepas de estos microorganismos ¹³.

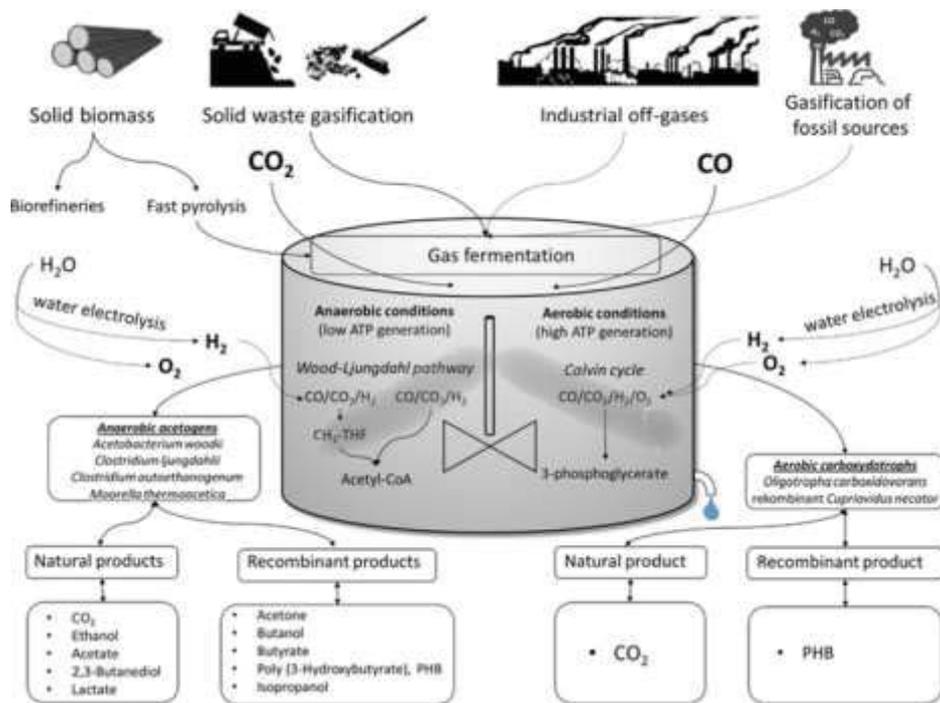


Figura 3. Fermentación de gas en condiciones anaerobias y aerobias ¹⁴

2.4 Bacterias anaerobias

Las bacterias anaerobias tienen una gran importancia debido al papel que desempeñan en procesos para el mantenimiento de la vida, estos microorganismos realizan procesos como la hidrólisis, acetogénesis y metanogénesis en la descomposición de materia orgánica. Estas bacterias tienen la ventaja de que con su metabolismo son capaces de generar su propia energía en ausencia de oxígeno, esto es posible debido a procesos de fermentación. El proceso de fermentación de las bacterias anaerobias consiste en una serie de reacciones metabólicas en ausencia de oxígeno, siendo de gran importancia en los ciclos biogeoquímicos. Estas reacciones o procesos metabólicos están divididos en tres etapas fundamentales: hidrólisis y fermentación, acetogénesis y metanogénesis. La digestión anaerobia (Figura 4) se trata de una fermentación microbiana en ausencia de oxígeno, el resultado de esta digestión anaerobia es una mezcla de gases entre los que se encuentran el metano (CH₄) y el dióxido de carbono (CO₂); aunque el producto principal es el biogás, mencionado anteriormente. ¹¹

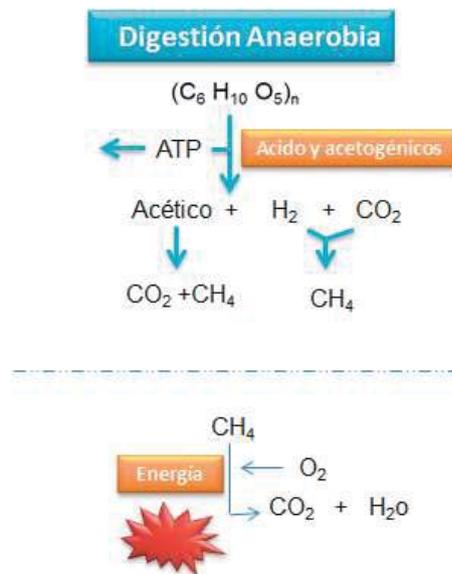


Figura 4. Digestión anaerobia ¹¹

Las bacterias anaerobias a través de su potencial permiten también la conversión de compuestos de carbono (C1) en diferentes compuestos químicos como el ácido acético, el etanol, o el lactato utilizando la vía reductora acetil-CoA, como ocurre en los procesos de acetogénesis y metanogénesis. Estos microorganismos se pueden clasificar en dos tipos diferentes dependiendo de su fuente de energía, microorganismos unicarbonotróficos que emplean los compuestos de carbono C1 como única fuente de energía y de carbono; y los microorganismos autotróficos que usan CO y CO₂ como fuentes de carbono y el H₂ como fuente de energía.

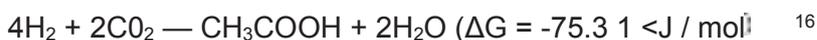
2.5 Ruta Wood-Ljungdahl

La vía reductora acetil-CoA es conocida como vía Wood-Ljungdahl en reconocimiento a sus primeros investigadores Lars G. Ljungdahl y Harland G. Wood. A este proceso también se le conoce, debido al descubrimiento de la enzima clave CO deshidrogenasa/Acetil-CoA sintasa, como ruta CODH/ACS ¹⁵. Permite la producción de compuestos químicos como acetato, etanol... mediante el metabolismo autótrofo de las bacterias acetogénicas. Los acetógenos usan esta vía para, en presencia de un agente reductor como el H₂, reducir directamente el CO y el CO₂ en acetil coenzima A (acetil-CoA) que es el compuesto intermedio principal de esta vía reductora para la posterior producción de metabolitos finales. El ácido acético es el producto más importante de

esta vía Wood-Ljungdahl. El H₂ se oxida actuando como donante de electrones y reduciendo el CO₂ a CO o un grupo metilo, después el acetil-CoA se forma por la combinación de CO con un grupo metilo⁵. Para que la reacción de reducción del CO₂ tenga lugar, es necesaria la presencia de H₂¹⁶. El H₂ que se necesita se puede conseguir mediante reacciones de hidrólisis del agua o con una mezcla gaseosa de CO₂ y H₂, como es el caso de nuestro experimento. Otra opción para obtener ese H₂ es a partir de hierro de valencia cero, una alternativa de bajo coste y no tóxico. El hierro es un metal que, en condiciones anaerobias por la producción de hidróxido y el aumento de la basicidad, permite generar H₂:



Una vez generado el H₂ es el que reacciona con el gas CO₂ produciendo el producto final, ácido acético, como ocurre en la siguiente reacción:



La mayoría de las bacterias acetogénicas usan la ruta Wood-Ljungdahl para la fijación del CO₂ o del CO (Figura 5). Esta ruta, que es una ruta irreversible (no cíclica), consta de dos ramas: la del metilo y la del carbonilo. En la del metilo una molécula de CO₂ se reduce a formiato; en el caso de tratarse de CO primero se oxida a CO₂. Este formiato se acopla a la coenzima tetrahidrofolato (THF), hidrolizando un ATP en ADP y fosfato inorgánico (P_i). Finalmente, el CO₂ se reduce sucesivamente a metil-tetrahidrofolato (metil-THF) y el grupo metilo se transfiere a una proteína hierro-azufre-corrinoide. Mientras, en la rama del carbonilo, una molécula de CO₂ se reduce a CO utilizando la ferredoxina reducida por la enzima acetil-CoA sintasa / CO deshidrogenasa, que luego también combina el metilo de la proteína hierro-azufre-corrinoide, una fracción de CoA y el grupo carbonilo para formar el intermedio acetil-CoA. Este intermedio se metaboliza adicionalmente en acetato, produciendo un ATP en la reacción acetato quinasa¹⁸.

Por lo que no queda ATP fosforilado a nivel de sustrato para las reacciones biosintéticas ni para el crecimiento, los acetógenos obtienen energía adicional de los gradientes de iones, ya sea por el complejo RnF (una ferredoxina reducida: NAD⁺ oxidoreductasa, produciendo un protón o un gradiente Na⁺) o el complejo Ech, que oxida a la ferredoxina reducida y reduce los protones produciendo hidrógeno y moviendo protones a través de la membrana plasmática¹⁴. Es decir, que el acetil-CoA generado en la ruta Wood-Ljungdahl actúa como intermedio clave para la producción de acetato, donde se usa el CO₂ como fuente de carbono que se fija al intermedio. Todos los acetógenos producen

acetato para ganar energía mediante la fosforilación a nivel sustrato y compensar la energía empleada en la rama del carbonilo para la activación del formiato.

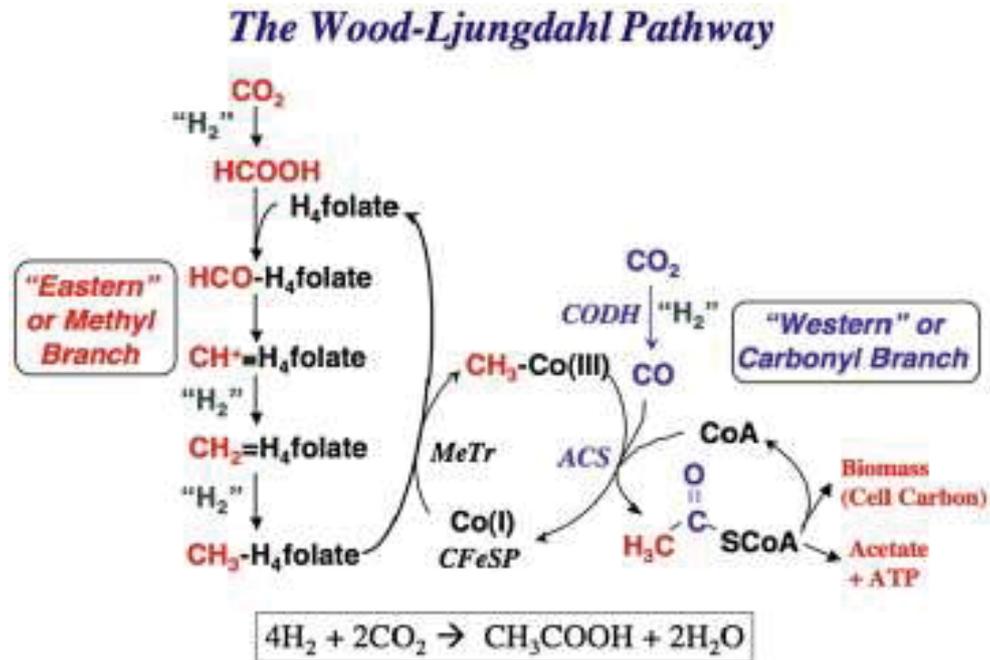


Figura 5. Ruta Wood-Ljungdahl¹⁹

El acetil-CoA que se ha generado en la ruta Wood-Ljungdahl sirve como intermedio clave para la producción de acetato y la síntesis de masa celular, donde el CO₂ es empleado como fuente de carbono y actúa fijándose al intermedio. Además, se sabe que todas las bacterias acetogénicas tienen la capacidad de producir acetato con el objetivo de ganar energía a través de la fosforilación a nivel sustrato (SLP) y así compensar la energía que se invierte en la activación del formiato en la rama del carbonilo de la vía reductora acetil-CoA.

2.6 Bacterias acetogénicas

Las bacterias acetogénicas o acetógenos son bacterias anaerobias capaces de crecer en gases como son el CO₂, CO, H₂ y producir biomasa y ácido acético a través de la ruta Wood-Ljungdahl citada anteriormente, utilizando gases de efecto invernadero como el CO₂. La mayoría de las bacterias acetogénicas pertenecen a los géneros *Clostridium* y *Acetobacterium*. En este estudio se utiliza la bacteria *Acetobacterium woodii*, y en todos los experimentos se utiliza Fe de valencia cero para generar el H₂ que se empleará para la reducción del CO₂ al grupo metilo y finalmente producir el acetil-CoA. Dentro de las bacterias acetogénicas, se encuentran las homoacetogénicas que son capaces de producir ácido acético a partir de H₂ y CO₂; pertenecientes a las especies *Acetobacterium*, *Clostridium* entre otras.²⁰ Para estas bacterias su fuente de energía y

de carbono son compuestos inorgánicos, como es en este caso el CO_2 . También el extracto de levadura del medio (*Yeast Extract*) o la fructosa son una fuente importante de carbono, sobre todo en la primera fase del crecimiento de la bacteria.

Las bacterias acetogénicas se pueden clasificar en homoacetógenas cuando el único producto final es el acetato o heteroacetógenas cuando además de acetato se obtienen otros productos de fermentación. La mayoría de las bacterias homoacetógenas tienen la capacidad de crecer en condiciones autótrofas en CO_2/H_2 , pero en algunas ocasiones es necesaria la adición de compuestos como extracto de levadura y/o vitaminas. Además, los metales son necesarios a nivel traza para el crecimiento de las bacterias acetogénicas.

2.6.1. *Acetobacterium woodii*



Figura 6. *Acetobacterium woodii*²¹

El microorganismo *Acetobacterium woodii* (DSM 1030), aislado en 1977 y secuenciado completamente en la actualidad y el tipo de cepa es WB1.²² Es una bacteria anaerobia, gram positiva, no formadora de esporas y con forma de bastoncillo que generalmente se presenta en pares (Figura 6). Se mueve con la ayuda de un flagelo subterminal, y con poca frecuencia posee dos flagelos. Es autótrofa y de fermentación homoacetogénica, ya que únicamente produce acetato.²³ Se trata de una bacteria mesófila (bacterias que descomponen la materia orgánica a temperaturas entre 30-40°C), ya que su temperatura óptima de trabajo es de 30°C. Tiene un pH óptimo de 7. Es una bacteria que se ha utilizado en numerosos estudios anteriores. El típico ciclo de crecimiento de una bacteria es el siguiente (Figura 7).

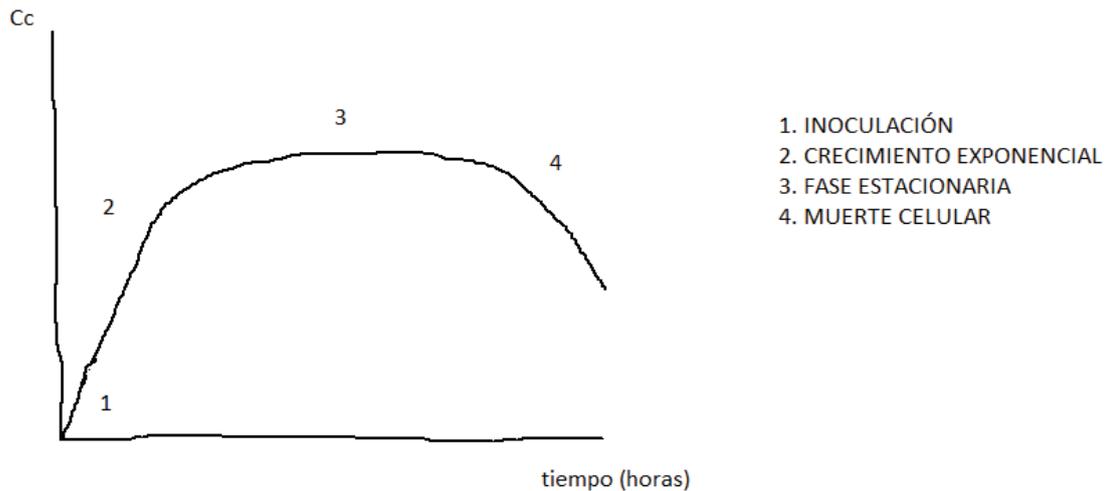


Figura 7. Ciclo de crecimiento de una bacteria

En un ciclo de vida de una bacteria tenemos fundamentalmente cuatro etapas: inoculación, crecimiento o fase exponencial, fase estacionaria y muerte celular o decaimiento. La inoculación consiste en introducir la bacteria para que crezca y se reproduzca, en este caso en un reactor. El crecimiento o fase exponencial corresponde al periodo en el que el microorganismo crece exponencialmente hasta la fase estacionaria, bajo condiciones óptimas la velocidad de crecimiento es máxima. Esta etapa está muy condicionada por las condiciones ambientales como son la temperatura, la composición del medio, el pH. Durante la fase estacionaria la bacteria agota sus nutrientes o sustratos y no puede crecer indefinidamente en forma exponencial llegando a la etapa de muerte celular. Por último, en la muerte celular si se continúa con la incubación después de que la bacteria alcance la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas pero el número de células viables va disminuyendo progresivamente ²⁴.

2.7 Estudio a desarrollar

Este estudio se basa en la bioconversión de CO₂, gas de efecto invernadero, con un método novedoso usando una mezcla gaseosa de H₂ y CO₂ como sustrato que permite la eliminación de esta mezcla de gases y al mismo tiempo, producir compuestos de interés industrial, en este caso ácido acético. Además, también se usa la fructosa como sustrato inicial. Para la conversión del CO₂ hace falta H₂, por este motivo el estudio se realiza con una mezcla gaseosa de CO₂ y H₂. Este hidrógeno se puede conseguir también por hidrólisis del agua entre otros métodos y utilizando hierro de valencia cero, aunque en este caso el hidrógeno procede directamente del gas de alimentación (mezcla gaseosa de H₂ y CO₂). Este estudio también sirve para la producción de otros productos como alcoholes que son utilizados como biocombustibles. Esto se lleva a

cabo utilizando como biocatalizador la bacteria anaerobia *Acetobacterium woodii*, aunque con este tipo de bacteria no se produce la obtención de alcoholes. La bacteria anaerobia utiliza la vía Wood-Ljungdahl (WLP), el H₂ generado se oxida reduciendo el CO₂ a CO o a un grupo metilo y obteniendo el acetil-CoA como intermedio para la obtención final de ácido acético.

Los parámetros que se deben controlar en este estudio para poder llevar a cabo el proceso de bioconversión del CO₂ son: la temperatura, el pH del medio de cultivo, la composición de la mezcla gaseosa usada, la composición del medio.

2.8 Objetivo

El objetivo principal de este estudio es la bioconversión de CO₂ y obtención de ácido acético a través de la bacteria *Acetobacterium woodii* que actúa como biocatalizador, usando una mezcla gaseosa de H₂ y CO₂. En este experimento, la bacteria *Acetobacterium woodii* crece en fructosa como inóculo, esto es así con el objetivo de alcanzar una mayor concentración bacteriana o biomasa, aunque el experimento se realice con una mezcla gaseosa de hidrógeno y dióxido de carbono. Otros factores que se comprueban durante el estudio es la variación de pH y sus efectos. Esto se consigue ajustando los valores de pH inicial lo máximo posible al pH óptimo de trabajo (pH 7) para el crecimiento de la bacteria.

2.9 Antecedentes

El uso del hierro de valencia cero para la generación de H₂ que reaccione posteriormente con el CO₂ y formar ácido acético es un estudio novedoso que no tiene muchos antecedentes. Sin embargo, hay otros estudios que utilizan el hidrógeno y el dióxido de carbono para la producción de metano. También existen muchos estudios que emplean diferentes especies de bacterias acetogénicas de los géneros *Acetobacterium* y *Clostridium* para realizar el proceso de acetogénesis. En estos estudios además de usar gases de efecto invernadero como materia prima se usa lignocelulosa a partir de biomasa vegetal, y así obtener biocombustibles como el bioetanol.²⁵

Si nos referimos a estudios sobre bacterias acetogénicas y la ruta Wood-Ljungdahl usando syngas (CO o CO₂ y H₂) para la obtención de ácido acético, en muchos casos podemos obtener también otros productos de alto valor añadido como el etanol. En estos casos también se utilizan bacterias acetogénicas y gases de efecto invernadero como el CO₂, y también el H₂. Lo que se tiene más en cuenta en estos estudios son las condiciones óptimas ya que con pH altos se promueve el crecimiento de biomasa y la

producción de ácido acético, mientras que al reducir a pH bajos se favorece la obtención de disolventes como el etanol. ²⁶

En otros estudios que han empleado como sustrato H₂ y CO₂ sólo se ha conseguido obtener como producto final acetato, con cantidades pequeñas de productos como el etanol que se consiguen en casos excepcionales. Esto se debe a que el uso de acetil-CoA para la producción de etanol no es posible en condiciones autotróficas, ya que el rendimiento de ATP es menor que el ATP necesario para producir acetil-CoA en cantidades suficientes a partir del H₂ y CO₂.⁵

Según estudios anteriores, el uso de hierro de valencia cero también favorece el proceso de la metanogénesis debido a la disminución del potencial de oxidación-reducción (ORP). Algunos estudios se basan en la conversión de CO₂ como única fuente de carbono en la producción de metano o biogás con uso de hierro de valencia cero y con mezcla de cultivos anaerobios además de desechos residuales anaerobios. Las bacterias metanogénicas más empleadas en este tipo de estudios son del género *Methanobacterium*. Los metanógenos que se encuentran en el lodo granular anaeróbico pueden usar el H₂ como donante de electrones para la reducción del CO₂ a metano. Los homoacetógenos que también se encuentran en el lodo granular utilizan el H₂ y el CO₂ para la producción de ácido acético, también pueden ser utilizados por los metanógenos para la síntesis de biogás. ¹⁷

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se realizan las siguientes operaciones: preparación del medio, aplicar una corriente de N₂ para generar el medio de crecimiento en condiciones anaerobias, inocular la bacteria, toma de muestras, medición de pH y obtención de los resultados mediante espectroscopía y cromatografía de líquidos para conocer la concentración de los productos como el ácido acético.

3.1. Reactivos y medios de cultivo

Reactivos	Volumen de trabajo Leibniz (1000 mL)	Volumen de trabajo del estudio (200mL)
NH₄Cl	1,00 g	0,20 g
KH₂PO₄	0,33 g	0,066 g
K₂HPO₄	0,45 g	0,09 g
MgSO₄ . 7H₂O	0,10 g	0,02 g
Disolución metales traza	20,00 mL	0,40 mL
Extracto de levadura	2,00 g	0,40 g
Disolución Na- resazurin	0,50 mL	0,10 mL
NaHCO₃	10,00 g	2,00 g
Disolución de vitaminas	10,00 mL	2,00 mL
L-cisteína- HCl	0,50 g	1,00 g
Na₂S . 9 H₂O	0,50 g	1,00 g
D-fructosa	10,00 g	2,00 g

Tabla 1. Medio de cultivo para la bacteria *Acetobacterium woodii* ²⁷

La bacteria utilizada en el estudio, *Acetobacterium woodii*, es adquirida por el instituto Leibniz DSMZ, colección alemana de microorganismos y cultivos. Este instituto es el centro de recursos biológicos con una de las colecciones más grandes del mundo, siendo el instituto más completo ²², proporciona las condiciones de cultivo de cada bacteria y los reactivos que deben usarse para su crecimiento óptimo en condiciones anaerobias. Las cantidades de reactivos para el medio de cultivo de la bacteria proporcionadas por el instituto son para un volumen de 1L, por lo que hay que reajustar las cantidades para el volumen de trabajo que es de 200 mL (Tabla 1).

El instituto Leibniz también da información sobre los reactivos para preparar la disolución de metales traza (Tabla 2) y la de vitaminas (Tabla 3). ²⁸

Reactivos	Cantidad
Ácido nitrilotriacético	1,50 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	3,00 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,50 g
NaCl	1,00 g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,10 g
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,10 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,01 g
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,03 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,30 g
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,40 g
Agua destilada	1000,00 mL

Tabla 2. Reactivos para la preparación de la traza

Para la preparación de la disolución de metales traza como se indica, lo primero es disolver el ácido nitrilotriacético y que se ajuste el pH a 6,5, utilizando KOH; después se agregan los minerales. Finalmente se ajusta el pH a 7 con KOH.

La composición de la disolución de vitaminas es la que se indica en la Tabla 3. Esta disolución se prepara y se utiliza concentrada, por lo que la cantidad que se le añade finalmente a la botella del medio de cultivo de la bacteria son 4-5 gotas. La composición de la disolución de vitaminas es la siguiente:

Reactivos	Cantidad (mg)
Biotina	2,00 mg
Ácido fólico	2,00 mg
Piridoxina-HCl	10,00 mg
Tiamina-HCl	5,00 mg
Riboflavina	5,00 mg
Ácido nicotínico	5,00 mg
D-Ca-pantotenato	5,00 mg
Vitamina B12	0,10 mg
Ácido p-aminobenzoico	5,00 mg
Ácido lipoico	5,00 mg
Agua destilada	1000,00 mL

Tabla 3. Reactivos para la preparación de la disolución de vitaminas

Se prepara el medio de cultivo para un volumen de 200 mL, en un vaso de precipitados que después se pasará a un matraz aforado enrasando con agua destilada. Se añaden todos los reactivos menos el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, la disolución de vitaminas y la fructosa. Las disoluciones de Mg y de fructosa se preparan por separado, debido a que la fructosa reacciona en caliente. La disolución en el matraz aforado se agita con un agitador magnético después de enrasar teniendo una disolución incolora. Se añaden la L-cisteína y el Na_2S en la campana, ya que el Na_2S desprende gases tóxicos. La disolución cambia de color al añadir el Na-resazurin a un color violeta claro- rosado, esto ocurre porque es un indicador redox, no tóxico para las bacterias utilizadas, que controla el potencial redox indicando la presencia de oxígeno en los cultivos anaerobios. Al ser un experimento anaerobio no puede entrar oxígeno, ya que la bacteria se moriría. Después, se hace pasar una corriente de N_2 , para ello se hace pasar el aire del laboratorio por un equipo que separa, en este caso, el N_2 contenido y va llenando una bomba. Es necesario encender el equipo sobre 20 minutos antes de utilizar la corriente de N_2 para que la bomba se pueda ir llenando. Una vez que se termine la corriente de N_2 y la agitación, se dividen los 180 mL, ya que tenemos 10 mL de la disolución de Mg y otros 10 mL de la de fructosa (en total los 200 mL) en 5 botes con la misma cantidad aproximadamente

(35-36 mL). Para continuar, es necesario que se calibre el pH-metro con dos disoluciones tampón a pH=4 y pH=7, y así poder ajustar el pH de las disoluciones de los botes a un pH de 7-7,4 mientras se les pasa una corriente de N₂ durante 5 minutos para eliminar la posibilidad de que haya oxígeno en el medio. Al pasar una corriente de N₂ el pH aumenta, por lo que se irá ajustando a medida que se añaden simultáneamente pequeñas cantidades de HCl. Una vez ajustado el pH, los botes se cierran herméticamente y se etiquetan para meterlos en el autoclave durante 20 minutos. Este proceso consiste en que los botes de cultivo se someten a unas condiciones de elevadas presión y temperatura (hasta 120°C), permitiendo así eliminar cualquier microorganismo o degradar cualquier partícula que pueda estar presente en el medio y pueda afectar a la bacteria, por lo que se genera un medio estéril. Las etiquetas de los botes tienen un indicador que antes de meterlo en el autoclave es de color amarillo y cambia a negro para saber que en ese tiempo se alcanzó la temperatura y se consiguió la esterilización, como se indica en la Figura 8. La disolución vuelve a ser incolora. Pasado ese tiempo se sacan y se dejan enfriar, en este momento el medio es adecuado para su posterior inoculación y crecimiento de la bacteria con H₂ y CO₂.



Figura 8. Botes esterilizados (indicador negro)²⁹

Por último, se inocula la bacteria que en este caso se trata de la *Acetobacterium woodii*, solamente se inocula el 5-10% del medio de la bacteria. Para ello es muy importante desinfectar la zona de inoculación, las manos, las agujas, las tapas de los botes y todo el material que se emplea con alcohol y acercando a una llama de un mechero. Con una jeringuilla ya esterilizada y cerca de la llama se cogen los 10 mL de la disolución de Mg y se van añadiendo 2 mL en cada bote, desinfectando los botes antes y después de añadirlos. Después, se realiza lo mismo con la disolución de fructosa, también añadiendo 2 mL en cada bote. Es necesario añadir la disolución de vitaminas, para ello se cogen 2 mL de la disolución y se inyectan 0,4 mL en cada bote. Finalmente, se inocula el 10% del medio de la bacteria (200 mL) que serán 20 mL, así que se inyectan 4 mL del medio en cada bote. Los botes se dejan en una cámara varios días para su crecimiento, esta cámara está sobre 32°C y tiene un equipo de agitación (agitador

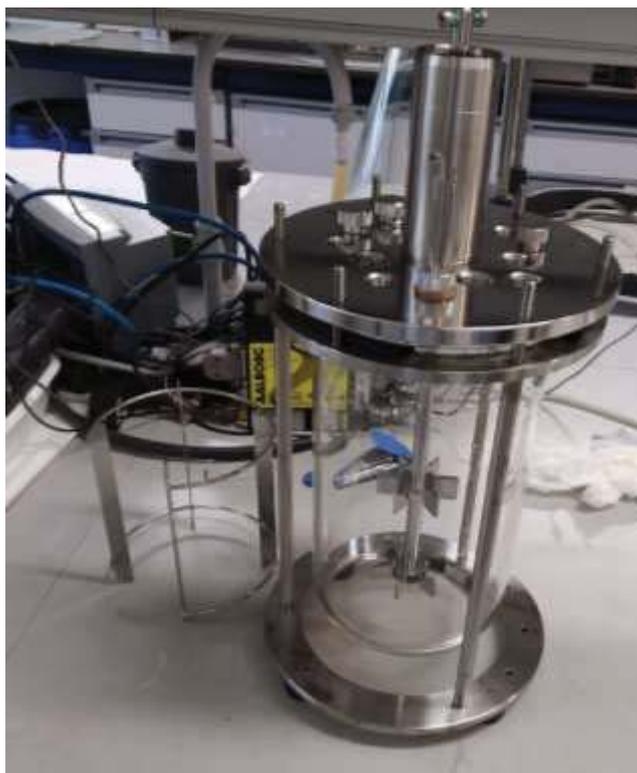
orbital) donde se depositan los botes girando a 150 rpm. Después de dejar crecer la bacteria en esa cámara durante tres días en los botes de 20 mL, se prepara el medio para el reactor. Se realizan los cálculos para preparar el medio de un reactor de 1,2 L (Tabla 4).

Reactivos	Cantidad
NH₄Cl	1,20 g
KH₂PO₄	0,396 g
K₂HPO₄	0,540 g
MgSO₄ . 7H₂O	0,120g
Extracto de levadura	2,400 g
NaHCO₃	12,00 g
Disolución de metales traza	2,400 mL
Disolución de Na-resazurin	0,600 mL
Cisteína	0,600 g
Na₂S . 9H₂O	0,600 g

Tabla 4. Reactivos para el medio del reactor

Se prepara una disolución en un vaso de precipitados de 600 mL, obteniendo una disolución amarilla, color debido al extracto de levadura, con todos los reactivos excepto la disolución de metales traza, Na-resazurin, cisteína, Na₂S y el MgSO₄. La disolución de MgSO₄ se prepara en un bote a parte con 20 mL de agua destilada obteniendo una disolución incolora. La disolución del vaso de precipitados se traspa a un matraz de fondo redondo de 1L y se enrasa. Los botes se llevan a la campana de gases y se ponen a agitar, mientras se añaden la disolución de metales traza y de Na-resazurin teniendo una disolución azul. Es necesario preparar otras dos disoluciones en dos botes: una de 10 mL de cisteína y otra de Na₂S. Se pasa una corriente de N₂ a todas las disoluciones excepto a la del medio y se cierran los botes herméticamente. Después se ajusta el pH del reactor, para ello se preparan dos disoluciones, una de NaOH y otra de HCl 1M a partir de dos disoluciones de NaOH y HCl 2M; se dejan hervir un rato para eliminar cualquier posible contaminación que pueda haber y se pasa una corriente de N₂ durante una hora para eliminar el O₂. Estas disoluciones se conectarán al reactor y a las bombas del controlador por un tubo para ajustar el pH del medio del reactor. Es necesario calibrar el pH con el controlador del reactor utilizando dos disoluciones tampón, una de pH 7 y otra de pH 4. Para la calibración se utiliza el electrodo que se introducirá más tarde en

el reactor y se introduce en la disolución de pH 7 hasta que el dato de pH se estabiliza; y lo mismo se repite para la disolución de pH 4. El electrodo se va cambiando de una disolución tampón a otra y se mira el dato de pH, comprobando que el pH está calibrado. Una vez calibrado se monta el reactor (Figura 9) y se añade el medio, se deja toda la noche con una corriente de N_2 para que no entre oxígeno. El electrodo se deja en el interior de la disolución tampón de pH 7 para comprobar al día siguiente que el valor de pH está estabilizado, y por lo tanto el pH está calibrado.



*Figura 9. Reactor antes de montar*²⁹

Una vez comprobado que está calibrado, el electrodo se introduce en el reactor. A continuación, se introducen en el autoclave durante 20 minutos: el reactor con el medio (disolución violeta), los botes con todas las disoluciones necesarias ($MgSO_4$, cisteína, Na_2S , $NaOH$, HCl) y los dos tubos que se usarán para conectar las disoluciones de $NaOH$ y HCl al reactor y al controlador cubiertos con papel de aluminio. Al sacar el reactor del autoclave, se observa que la disolución del medio del reactor cambia a una disolución de color rosa (Figura 10). Se colocan los elementos restantes: el termómetro, el outlet en el reactor y se conecta el electrodo redox del reactor al controlador a través del potenciómetro. Se deja pasando una corriente de N_2 durante dos horas y se pone en marcha el agitador. La temperatura es de $70^\circ C$, hay que esperar a que descienda hasta $40^\circ C$ para inyectar el resto de las disoluciones que quedan ($MgSO_4$, cisteína y Na_2S) con una jeringuilla y un filtro. Al llegar a los $35^\circ C$, se pone la camisa de calor

alrededor del reactor. A continuación, se colocan las disoluciones de NaOH y HCl conectadas al controlador a través de dos tubos de goma diferentes, introducidos previamente en el autoclave. Estos tubos se conectan a las bombas, que han sido previamente calibradas, y al reactor con ayuda de dos agujas para poder ajustar el pH del medio del reactor a un pH 7 y poder controlar el pH a medida que se producen las reacciones.



Figura 10. Reactor con el medio ²⁹

Después de dejar que la bacteria crezca durante tres días, se inocular la bacteria.

Reactivos	Cantidad
Disolución de vitaminas	12,00 mL
Disolución bacteria (primer medio)	120,00 mL

Tabla 5. Reactivos inoculación bacteria en el reactor

Se inoculan 40 mL de la disolución de la bacteria, ya que son 3 botes, y se inyectan al reactor con una jeringuilla, cerca de una llama y desinfectando con alcohol la mesa, las manos y los tapones de los botes. Se inyectan también los 12 mL de la disolución de vitaminas, que se trata de una disolución marrón verdosa.

Una vez que el reactor se pone en marcha se toman muestras todos los días, una por la mañana y otra por la tarde, intentando que sea aproximadamente a la misma hora para poder comparar los resultados e ir observando los niveles de ácido acético. Este primer experimento termina cuando se obtiene la cantidad máxima de ácido acético.

3.2. Inoculación de la bacteria

El proceso de inoculación es siempre el mismo. Previamente se prepara un primer cultivo de la bacteria en un bote, este es usado para el inicio del crecimiento y la inoculación de la bacteria en el reactor. A esta botella se le añaden todos los reactivos necesarios, citados anteriormente, para el desarrollo de la bacteria y se le hace pasar una corriente de N_2 para conseguir esas condiciones anaerobias. La botella se cierra herméticamente con un septum y un sello de aluminio para, a continuación, introducirla en el autoclave y así esterilizar el medio de la bacteria e impedir cualquier posible contaminación existente.

Todas las operaciones se realizan en la mesa de inoculación, preparada para generar condiciones de trabajo siendo esterilizada con alcohol. Esta mesa cuenta con un mechero Bunsen, para que podamos inyectar las disoluciones cerca de la llama en un área más aséptica. Las tapas de los botes se esterilizan con la llama del mechero que contiene unas gotas de alcohol, ya que es la zona que está expuesta al aire del septum evitando así introducir cualquier posible contaminación. Se inyectan el resto de los reactivos (en este caso las disoluciones de $MgSO_4$, vitaminas y la de fructosa). En este estudio se utiliza fructosa, ya que es el sustrato utilizado como fuente de crecimiento de la bacteria. Todas estas disoluciones se inyectan cerca de la llama del mechero y con una jeringuilla. Después se deja que la bacteria crezca en unas condiciones de agitación (150 rpm) y temperatura (35°C) en una cámara.

Mientras se deja crecer la bacteria durante tres días, se prepara el medio del reactor con los reactivos y las cantidades ajustadas según el volumen de trabajo, las corrientes de gas como el N_2 , y la esterilización en el autoclave durante un tiempo de 20-45 minutos o incluso de una hora dependiendo del volumen de los botes que se van a esterilizar. Una vez pasados estos tres días y que el reactor ya está listo y con su medio en el interior, se inocula la disolución de la bacteria preparada al principio (40 mL de cada bote, ya que son tres) y se inyectan en el reactor. También se inyecta la disolución de vitaminas (12 mL). Ambas disoluciones se inyectan en el reactor con ayuda de una jeringuilla y un filtro para evitar alterar las condiciones asépticas y anaerobias del medio, sin introducir posibles contaminaciones o la entrada de oxígeno del aire.

3.3 Toma de muestra

Es necesario saber que en el reactor hay dos vías, una para gases y otra para líquidos, para que en la extracción no se introduzca contaminación en el medio de la bacteria cada vez que se necesite tomar una muestra (gaseosa o líquida). En una de las vías, la de líquidos, hay un tubo de goma que tiene un filtro. Este tubo se encuentra cerrado con una pinza para que no entre aire cuando no se esté tomando muestra (Figura 11).



*Figura 11. Zona de la toma de muestra*²⁹

Lo primero que hay que hacer es quemar el extremo del tubo de goma que se encuentra cerrado, por donde se va a extraer la muestra, con un mechero. Es importante que se desinfecten las manos antes con alcohol y todo el material que se vaya a utilizar en la toma de muestra para no contaminar el medio del reactor donde se encuentra la bacteria. Una vez que está desinfectado todo, con una jeringuilla que ya está esterilizada se introduce en el tubo de goma, se abre la pinza y se va extrayendo la muestra (antes de extraer la muestra se coge y se expulsa un cierto volumen para que se mezcle bien). Es importante cerrar la pinza antes de sacar la jeringuilla del tubo para que no entre aire y volver a quemar el extremo. Se extrae una muestra de 3,5 mL para que tengamos cantidad suficiente, ya que 1 mL se analiza en el espectrofotómetro y 2,5 mL son para las medidas en el HPLC (high performance liquid chromatography) y para medir amonios si fuese necesario.

4. EQUIPOS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS

4.1 Medición de pH

Durante este estudio es importante el ajuste y control del pH con dos objetivos diferentes. En primer lugar, uno de los objetivos, es el ajuste del pH durante el paso de la corriente de nitrógeno (N_2), ya que es necesario que el experimento se inicie a un pH determinado, que será el pH óptimo para que tenga lugar el crecimiento de la bacteria. El otro objetivo es el control de la variación de pH a medida que el experimento va avanzando, ya que la bacteria crece y usa CO_2 y H_2 como sustrato para poder formar ácido acético, como consecuencia a medida que se vaya formando el ácido se irá modificando el pH del medio, y nos dará información del transcurso de las reacciones o procesos que tienen lugar.

En este experimento, durante la aplicación de corrientes de gases, se ajusta y controla el pH midiéndolo con un pH-metro, Basic 20 (Figura 12).



Figura 12. pH-metro Basic 20³⁰

El electrodo se introduce en la disolución cuando la corriente de gas ya está terminando, y el pH se ajusta con HCl o NaOH dependiendo de si lo que se necesita es disminuirlo o aumentarlo. En el caso de que el pH se tenga que reducir se emplea HCl, y si se necesita aumentarlo se usa NaOH.

4.2 Medidas de absorbancia en espectrofotómetro UV/VIS

Uno de los análisis de muestras de líquido es la medida de la absorbancia, observando los diferentes valores a medida que la bacteria va creciendo y formando ácido acético. Se utiliza un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 11 (Figura 13).



Figura 13. Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 11 ³¹

Lo primero es comprobar que el equipo está trabajando a una longitud de onda de 600 nm y ajustar las lámparas (UV off, VIS on). Se mete una cubeta de agua, actuando como patrón, y se hace el autozero sacando la cubeta y midiendo la absorbancia. Después se mete la cubeta vacía donde después se va a añadir la muestra y se mide la absorbancia. Finalmente, se mide la absorbancia de la cubeta con la muestra. Para ello de los 3,5 mL de muestra que se toman del reactor, se coge 1 mL y se introduce en la cubeta.

4.3 Análisis de muestras de líquido en HPLC

El objetivo principal de este análisis de muestras de líquido es estudiar la concentración de ácido acético que se va produciendo. Mediante este análisis, se estudia la concentración de fructosa que se va consumiendo en el medio de reacción; además de la concentración de ácido fórmico. Por último, se estudia la producción de ácido acético a medida que avanza el experimento.

Para este análisis se emplea la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con un sistema HP 1100 (Agilent Co., USA), (Figura 14) está equipado con un detector de matriz de diodos (DAD) y con un detector de índice de refracción (RID) a 50°C para determinar las concentraciones del ácido acético producido. En este experimento se emplea principalmente el detector de índice de refracción para obtener y registrar los resultados. El detector de matriz de diodos se utiliza fundamentalmente

para la comparación de picos obtenidos en los cromatogramas entre los detectores, en caso de que haya dudas, debido a los tiempos de retención. Para actuar como fase móvil se utiliza una disolución H_2SO_4 0,005M, con un caudal de 0,800 mL / min. Las muestras que se inyectan son de un volumen de 20 μL en la columna Agilent Hi-Plex H (300 x 7,7 mm) a 45°C.

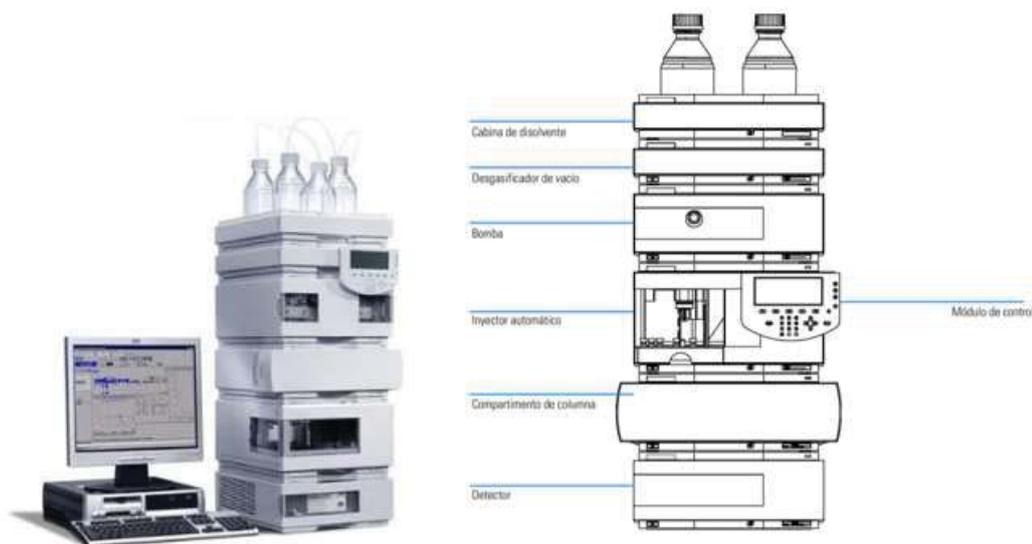


Figura 14. Equipo HPLC HP 1100^{32 33}

Las muestras se preparan en la mesa de inoculación en condiciones asépticas. Para ello, de los 3,5 mL de muestra que tomamos del reactor se toman 1,25 mL aproximadamente y se introducen en un vial Eppendorf. La muestra contenida en el vial se centrifuga durante 5 minutos en una centrifugadora ELMI Skyline Ltd CM-70M-07 a 7000 rpm, después el sobrenadante se filtra. Para filtrar el sobrenadante se usa una jeringuilla y una aguja extrayendo todo el volumen de la muestra y sustituyendo la aguja por un filtro de aguja de 0,22 μm PTF (Labbox, Barcelona, España) antes del análisis por HPLC. La muestra centrifugada y filtrada está contenida en otro vial Eppendorf.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio se han obtenido periódicamente a medida que la bacteria va creciendo y por lo tanto aumenta la biomasa. El experimento se inicia inoculando la correspondiente bacteria en los botes del medio con la fructosa como sustrato y utilizando también una mezcla gaseosa de H_2 y CO_2 . Se basan en la obtención y análisis de parámetros como el pH, las concentraciones de fructosa, ácido fórmico y ácido

acético a través de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y la medida de la absorbancia en un espectrofotómetro.

5.1 Estudio de la producción de ácido acético con la bacteria *Acetobacterium woodii*

En este experimento es necesario ajustar el pH lo máximo posible a 7, que es el óptimo para el crecimiento de la bacteria. El pH es un factor de gran importancia para el crecimiento de la bacteria, lo que se estudia es la producción de ácido acético a partir de una bacteria que utiliza, en este caso, una mezcla gaseosa de H₂ y CO₂ como sustrato para crecer. Esta bacteria a medida que consume la mezcla gaseosa va creciendo, aumentando la biomasa y, como consecuencia, produciendo el compuesto de interés, en este caso ácido acético. El crecimiento de la bacteria *A. woodii* se puede cuantificar en función de la biomasa contenida en el sistema a lo largo del tiempo. Esta se determinó mediante espectroscopía, midiendo la variación de la absorbancia de cada muestra extraída del reactor a una longitud de onda de 600 nm obteniendo los siguientes resultados (Figura 15):

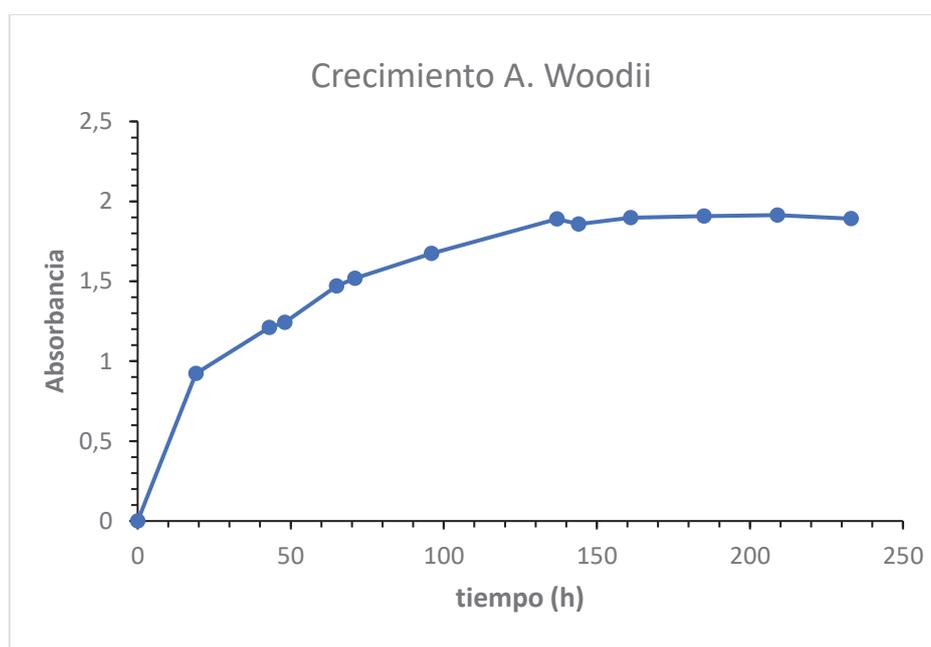


Figura 15. Resultados de la medición de absorbancia en el crecimiento de la bacteria

El estudio de los resultados nos indica que la bacteria ha sido capaz de crecer en el medio y en las condiciones indicadas anteriormente. Como se puede observar, en las primeras horas del experimento se percibe una mayor velocidad de crecimiento de la bacteria, por lo que se puede diferenciar así la fase de crecimiento exponencial (fase exponencial) de la fase estacionaria. No se observa una fase de latencia, que consiste

en el período de adaptación de la bacteria al medio de cultivo, esto se puede deber a que el inóculo utilizado ya se encontraba en la fase exponencial al ser introducido en el reactor. El punto máximo de crecimiento se observa a $t = 180$ horas, y a partir de ahí es cuando comienza la fase de muerte celular o decaimiento. En esta última fase la reserva energética de las células se termina agotando debido a las condiciones de inanición o como consecuencia del metabolismo celular. El tiempo entre la fase estacionaria y la fase de muerte celular depende del tipo de microorganismo y también del proceso utilizado.

Es interesante la comparación de los datos de crecimiento con los datos de formación de ácido acético en el reactor con respecto al tiempo (Figura 16).

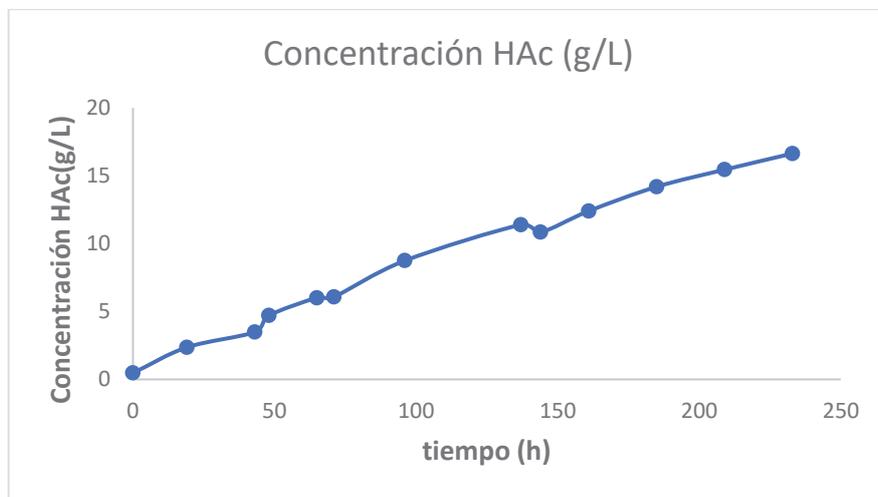


Figura 16. Formación del ácido acético a lo largo del tiempo

Se puede observar que a medida que la bacteria va creciendo y aumentando la biomasa se va formando ácido acético, aunque la velocidad de crecimiento de la bacteria no va en función de la velocidad de formación de nuestro producto. En este caso la máxima concentración de ácido acético es a $t = 233$ horas, que corresponde a la fase de muerte celular en el crecimiento de la bacteria.

6.CONCLUSIONES

Se ha observado que la bacteria ha sido capaz de crecer en el medio de cultivo y producir ácido acético como resultado del proceso de la ruta de Wood-Ljungdahl con la bacteria *Acetobacterium woodii*. Además, a partir de los reactivos empleados en el medio de cultivo se produce un compuesto intermedio, el ácido fórmico, que reacciona y se consume para formar ácido acético. Debido a la situación sanitaria actual no se pudo continuar con el experimento utilizando diferentes tipos de bacterias y condiciones para comparar los resultados y saber cuáles son las condiciones óptimas para obtener los mejores resultados.

Finalmente, debido al empleo de una mezcla gaseosa de H₂ y CO₂ que se usan como sustrato, se consigue la producción de ácido acético. Por lo que es un método válido y viable para la producción de compuestos de alto valor añadido, como es el ácido acético, a partir de gases de efecto invernadero, como es el CO₂.

CONCLUSIÓNS

Observouse que a bacteria foi capaz de crecer no medio de cultivo e producir ácido acético como resultado do proceso do roteiro de Wood- Ljungdahl coa bacteria *Acetobacterium woodii*. Ademais, a partir dos reactivos empregados no medio de cultivo prodúcese un composto intermedio, o ácido fórmico, que reacciona e consómese para formar ácido acético. Debido á situación sanitaria actual non se puido continuar co experimento utilizando diferentes tipos de bacterias e condición óptimas para comparar os resultados e saber cales son as condicións para obter os mellores resultados.

Finalmente, debido ao emprego dunha mestura gasosa de H₂ e CO₂ que se usan como sustrato, conséguese a produción de ácido acético. Polo que é un método válido e viable para a produción de compostos de alto valor engadido, como é o ácido acético, a partir de gases de efecto invernadoiro, como é o CO₂.

CONCLUSIONS

It has been observed that the bacteria has been able to grow in the culture medium and produce acetic acid as a result of the Wood-Ljungdahl pathway, with the bacterium *Acetobacterium woodii*. In addition, formic acid is produced as intermediate compound, from the reagents used in the culture medium, which reacts and is consumed to form acetic acid. Due to the current health situation, the experiment could not be continued

using different types of bacteria and conditions to compare the results and know which are the best experimental conditions.

Finally, due to the use of a gaseous mixture of H_2 and CO_2 as substrates, acetic acid production is achieved. So, it is a valid and viable method for the production of high value-added compounds, such as acetic acid, from greenhouse gases, such as CO_2 .

7. BIBLIOGRAFIA

1. Serrano Pérez, A. ¿Qué es el Cambio Climático? *Front. la Cienc.* **5**, 18–25 (2019).
2. Quiñones, L. El Cambio Climático llega antes y más fuerte de lo previsto: esto es lo que dicen los científicos. *22 de septiembre 2019*
https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/cambio-climatico-llega-antes-y-mas-fuerte-previsto-esto-es-que-dicen-cientificos_14742 (2019).
3. Cuevas Agulló, E. Gases de Efecto Invernadero y Cambio climático. *Centro de Investigación Atmosférica de Izaña Agencia estatal de Meteorología* 2018 (2010).
4. Roca Villanueva, B., Beltrán Salvador, M. & Gómez Huelgas, R. Change climate and health. *Rev. Clin. Esp.* **219**, 260–265 (2019).
5. Cheng, H. H., Syu, J. C., Tien, S. Y. & Whang, L. M. Biological acetate production from carbon dioxide by *Acetobacterium woodii* and *Clostridium ljungdahlii*: The effect of cell immobilization. *Bioresour. Technol.* **262**, 229–234 (2018).
6. Takors, R. *et al.* Using gas mixtures of CO, CO₂ and H₂ as microbial substrates: the do's and don'ts of successful technology transfer from laboratory to production scale. *Microb. Biotechnol.* **11**, 606–625 (2018).
7. Gowen, C. M. & Fong, S. S. Applications of systems biology towards microbial fuel production. *Trends in Microbiology* vol. 19 516–524 (2011).
8. Mohammadi, M. *et al.* Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* vol. 15 4255–4273 (2011).
9. Fernández-Naveira, Á., Veiga, M. C. & Kennes, C. H-B-E (hexanol-butanol-ethanol) fermentation for the production of higher alcohols from syngas/waste gas. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **92**, 712–731 (2017).
10. Abubackar, H. N. *et al.* Effects of size and autoclavation of fruit and vegetable wastes on biohydrogen production by dark dry anaerobic fermentation under mesophilic condition. *International Journal of Hydrogen Energy* vol. 44 17767–17780 (2019).
11. Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A. & Corredor Vargas, A. M. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la

- vida en el planeta. *Nova* **13**, 55 (2015).
12. Couto, N., Rouboa, A., Silva, V., Monteiro, E. & Bouziane, K. Influence of the biomass gasification processes on the final composition of syngas. in *Energy Procedia* vol. 36 596–606 (Elsevier Ltd, 2013).
 13. Kruger, N. J. & Von Schaewen, A. The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 236–246 (2003).
 14. Takors, R. *et al.* Using gas mixtures of CO, CO₂ and H₂ as microbial substrates: the do's and don'ts of successful technology transfer from laboratory to production scale. *Microbial Biotechnology* vol. 11 606–625 (2018).
 15. Min, F., Kopke, M. & Dennis, S. Gas Fermentation for Commercial Biofuels Production. in *Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques* (InTech, 2013). doi:10.5772/52164.
 16. Steger, F., Rachbauer, L., Windhagauer, M., Montgomery, L. F. R. & Bochmann, G. Optimisation of continuous gas fermentation by immobilisation of acetate-producing *Acetobacterium woodii*. *Anaerobe* **46**, 96–103 (2017).
 17. Vyrides, I. *et al.* CO₂ conversion to CH₄ using Zero Valent Iron (ZVI) and anaerobic granular sludge: Optimum batch conditions and microbial pathways. *J. CO₂ Util.* **27**, 415–422 (2018).
 18. Schiel-Bengelsdorf, B. & Dürre, P. Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Lett.* **586**, 2191–2198 (2012).
 19. Ragsdale, S. W. & Pierce, E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* vol. 1784 1873–1898 (2008).
 20. Flotats, X. & Campos, E. Procesos biológicos. La digestión anaerobia y el compostaje. *Trat. y valorización energética residuos.* 618–684 (2012).
 21. Balch, W. E., Schoberth, S., Tanner, R. S. & Wolfe, R. S. *Acetobacterium, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing, Carbon Dioxide-Reducing, Anaerobic Bacteria.* *International Association of Microbiological Societies* vol. 27 (1977).

22. Rhode, C. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. in *1st German Phage Symposium* (2018).
23. Lake, A. *Acetobacterium woodii* - microbewiki.
https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Acetobacterium_woodii Fecha de acceso (29/12/2020)
24. Microbiano, C. Reproduccion Y Recimiento Microbiano. 1–23 (2009).
http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_6_crecimiento.pdf
25. Groenestijn, J. W. van, Abubackar, H. N., Veiga, C. & Kennes, C. Chapter 18 - Bioethanol. In: Kennes C. and Veiga MC (eds). *Air Pollution Prevention and Control: Bioreactors and Bioenergy*. J. Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 431 - 463 (2013).
26. Arslan, K., Bayar, B., Nalakath Abubackar, H., Veiga, M. C. & Kennes, C. Solventogenesis in *Clostridium aceticum* producing high concentrations of ethanol from syngas. *Bioresour. Technol.* **292**, (2019).
27. DSMZ. Medium 135. *Acetobacterium* Medium. 4132 (2015) doi:10.1007/978-0-387-30160-0_7361. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1030>. Fecha de acceso (23/12/2020)
28. Mgcl, K., Cacl, C., Trace, N., Yeast, N. & Bbl, B. D. *Sulfurovum lithotropicum* methanogenium medium (h₂/co₂). 6–8 (2014).
29. (Imagen propia del primer experimento. Laboratorio de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de La Coruña, La Coruña, España.)
30. Crison. Medidor PH BASIC 20 - Crison Instruments.
<http://www.crisoninstruments.com/es/laboratorio/medidor-de-ph-/medidor-de-ph-de-sobremesa/Medidor-PH-basic-20> (2011). Fecha de acceso (22/12/2020)
31. Perkin Elmer Lambda 11 UV / VIS Spectrophotometer - Price, Specs.
<https://www.artisanng.com/Scientific/79523-1/Perkin-Elmer-Lambda-11-UV-VIS-Spectrophotometer>. Fecha de acceso (22/12/2020)
32. Agilent 1100 HPLC System | GMI - Trusted Laboratory Solutions. <https://www.gmi-inc.com/product/gmi-hp-agilent-1100-hplc/>. Fecha de acceso (22/12/2020)

33. *Módulo de control Serie Agilent 1100 Guía del usuario.* Fecha de acceso (22/12/2020)