



MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Bioconversión de Gas de Síntesis
en productos químicos sostenibles

Autor: Dña. Silvia García Casado

Tutor 1: Dña. Raquel Lebrero Fernández

Tutor 2: Dña. Eva Marcos Rodrigo

Valladolid, julio de 2022



Universidad de Valladolid

Bioconversión de Gas de Síntesis



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL



Resumen

La transformación del gas de síntesis en productos químicos y combustibles se caracteriza, actualmente, por emplear procesos físico-químicos que operan a altas presiones y temperaturas donde el syngas procede de fuentes no renovables. Sustituir las materias primas no renovables por biomasa y llevar a cabo la conversión biológica del syngas para obtener productos químicos de alto valor constituye una alternativa sostenible y rentable a estos procesos convencionales, lo que hace que exista un gran interés por optimizar los procesos de fermentación de esta mezcla gaseosa. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue conocer el comportamiento de la cepa *Acetobacterium woodii* en presencia de diferentes concentraciones de gas de síntesis. En un primer ensayo, donde se trabajó con una atmósfera formada por un 20 y un 30% de syngas, sólo se observó el crecimiento de la cepa en una de las botellas con el 20% de gas de síntesis, comprobándose así que *A. woodii* era capaz de consumir el 5% de CO presente en ella. Bajo estas condiciones se alcanzó una concentración de 268,16 mg·L⁻¹ de ácido acético en el medio y se observó un crecimiento en dos etapas, marcadas por la concentración de CO y diferenciadas por la velocidad de consumo del CO, CO₂ y H₂. Esto sugiere que el consumo de H₂ y CO₂ puede verse inhibido cuando la concentración de CO supera el ≈2,3%. Tras obtener un cultivo de *A. woodii* adaptado a la presencia de CO, este fue empleado como inóculo en un segundo ensayo donde se trabajó con un 30, 40 y 50% de syngas, pero no se llegó a observar crecimiento de la cepa en este experimento.

Palabras clave: *Acetobacterium woodii*, Bacterias acetogénicas, Biorrefinerías, Gas de síntesis, Producción de ácido acético



Abstract

Nowadays, the conversion of synthesis gas to chemical products and fuels is based on physicochemical processes, which operate at high temperatures and pressures, and on the use of non-renewables sources as feedstock for syngas production. The use of biomass as raw material in the syngas synthesis and its biological conversion into high valuable chemical products constitute a sustainable and cost-effective alternative to conventional processes. Therefore, there is an increasing interest for the optimization of syngas fermentation processes. In this context, the present study investigated the tolerance of the acetogen *Acetobacterium woodii* to different syngas concentrations. To this aim, the strain was first exposed to gas atmospheres containing 20 and 30% synthesis gas. This experiment showed that *A. woodii* could consume 5% CO contained in one of the 20% synthesis gas bottles, while reaching 268,16 mg·L⁻¹ acetic acid concentration in the medium. Under these conditions, a two-phase growth was observed depending on the CO concentration, a lag and an exponential stage, characterized by different CO, CO₂ and H₂ consumption velocity. The results suggest an inhibition of H₂ and CO₂ consumption when CO concentration is higher than ≈2,3%. On the contrary, no growth was observed under any of the other conditions studied. Finally, the culture of *A. woodii* adapted to CO presence was used as inoculum in a second test under gas atmospheres of 30, 40 and 50% of synthesis gas, although no growth of the strain was recorded regardless of the concentration.

Key words: *Acetobacterium woodii*, acetogens, biorefineries, synthesis gas, acid acetic production



Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Biorrefinerías como alternativa a las industrias actuales	1
1.2. Gas de síntesis, estado del arte	3
1.2.1. Composición y formas de obtención.....	3
1.2.2. Aplicaciones del gas de síntesis.....	5
1.2.3. Biorrefinerías asociadas a la fermentación de CO	7
1.3. Bacterias acetogénicas. Género <i>Acetobacterium</i>	9
1.3.1. Ruta metabólica de degradación de CO y CO ₂	10
1.3.2. Productos de fermentación del gas de síntesis	11
1.4. Justificación del trabajo experimental	13
2. Objetivos.....	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Materiales	15
3.2. Métodos	17
3.2.1. Procedimiento experimental	17
3.2.2. Métodos analíticos.....	18
3.2.3. Cálculos.....	19
4. Resultados.....	20
4.1. Ensayos de crecimiento con un 20 y 30% de gas de síntesis.....	20
4.1.1. Crecimiento de la biomasa y consumo del sustrato.....	20
4.1.2. Evolución del pH y producción de ácido acético.....	23
4.2. Ensayos de crecimiento con un 30, 40 y 50% de gas de síntesis	25
4.2.1. Crecimiento de la biomasa y consumo del sustrato.....	25
4.2.2. Evolución del pH y producción de ácido acético.....	27



5. Discusión de resultados	28
5.1. Ensayos de crecimiento con un 20 y 30% de gas de síntesis.....	28
5.2. Ensayos de crecimiento con un 30, 40 y 50% de gas de síntesis.....	31
6. Conclusión y trabajo futuro	33
Bibliografía empleada	34
ANEXOS	39
ANEXO I: Curvas de calibrado del TCD Bruker	39
ANEXO II: Curvas de calibrado del HPLC-IC.....	42
ANEXO III: Curvas de calibrado del espectrofotómetro.....	43
ANEXO IV: Resultados del control negativo	44
ANEXO V: <i>Acetobacterium woodii</i> vista al microscopio.....	45



Universidad de Valladolid

Bioconversión de Gas de Síntesis



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

1. Introducción

1.1. Biorrefinerías como alternativa a las industrias actuales

El interés actual por acelerar la transición hacia una economía circular, basada en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEIs) e independiente de los combustibles fósiles, ha hecho que exista un creciente interés por desarrollar una industria donde se fomente la generación de productos químicos de base biológica (European Commission, 2021). Esta idea se ve impulsada con la gran variedad de materiales y formas de energía que pueden obtenerse empleando la biomasa como materia prima, apostándose así por el desarrollo de las biorrefinerías como alternativa a las industrias actuales.

Se considera biorrefinería a la industria basada en la transformación de biomasa en energía y/o en una amplia variedad de productos, donde los impactos ambientales se ven reducidos, constituyendo la base para impulsar una economía respetuosa con el medio ambiente (Lindorfer et al., 2019) (Figura 1). Cuando se habla de biomasa, se hace referencia a la materia orgánica procedente de las plantas y los animales que, atendiendo a su procedencia, puede clasificarse en residuos y productos agrícolas, forestales, industriales, urbanos y procedentes de la acuicultura (Cherubini, 2010).

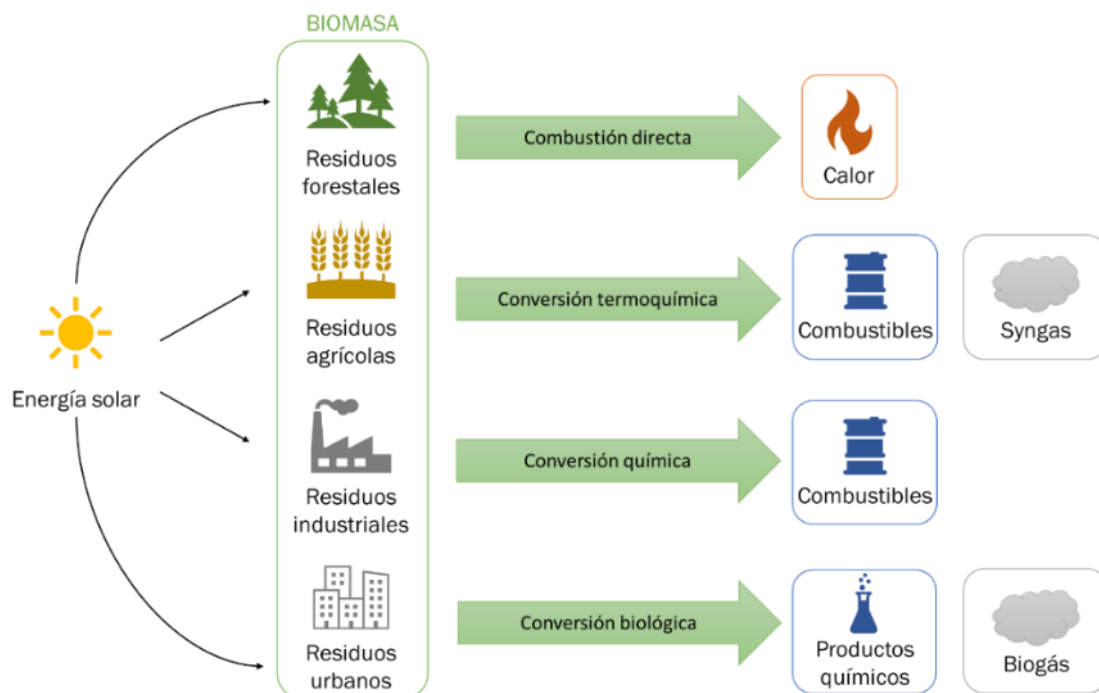
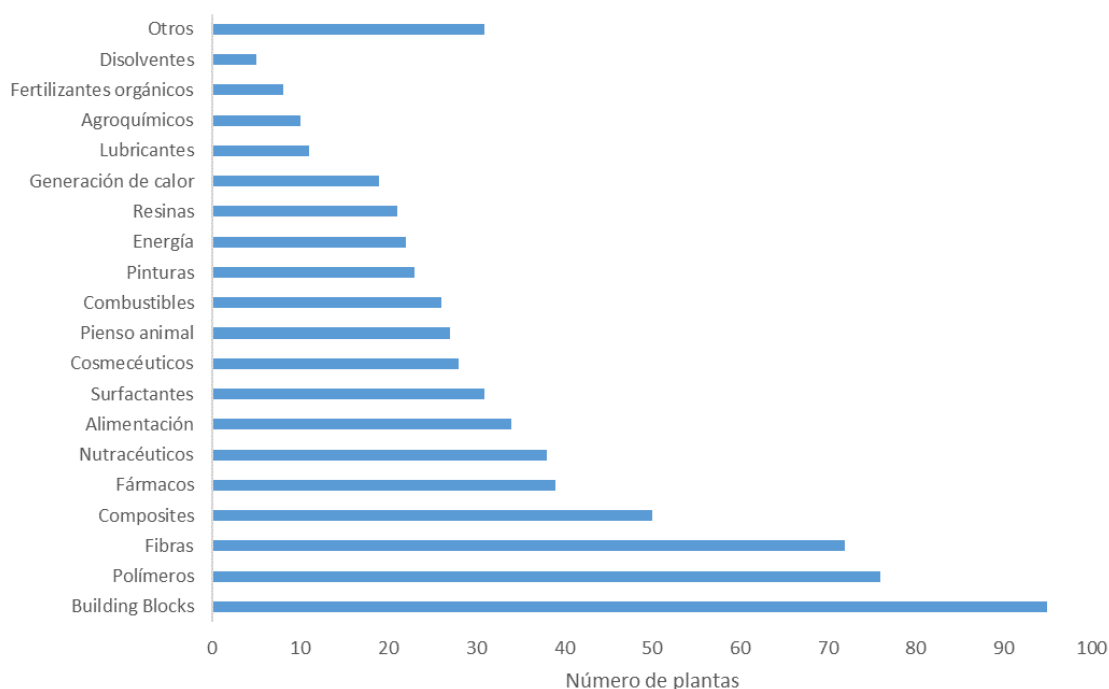


Figura 1. Principales aplicaciones de la biomasa como materia prima

Actualmente existen un total de 298 plantas en Europa que encajan dentro del concepto de biorrefinería, empleando la mayoría de ellas residuos y productos agrícolas como materia prima (Baldoni et al., 2021). De todas ellas, 95 se dedican a la producción de los conocidos como 'building blocks', los productos químicos más comercializados a nivel mundial, destacando también la producción de polímeros (76 plantas) y fibras (72 plantas), como se muestra en la Gráfica 1. Para el sector de producción de materiales y químicos de base biológica se ha estimado, en un escenario óptimo, un incremento en la producción desde las 4,6 millones de toneladas en 2018 hasta las 7,7 millones de toneladas en 2030 (European Commission, 2021).



Gráfica 1. Número de biorrefinerías según su producto final en Europa en 2021 (Baldoni et al., 2021)

A pesar de todas las ventajas que presenta la transición hacia esta forma de producción sostenible, aún existen ciertas limitaciones en su aplicación. Por un lado, debe destacarse el alto coste de producción de los cultivos destinados a la generación de energía, junto con el peso económico asociado a su transporte. Por otro, si no existe una transición en cascada en todos los sectores, se puede llegar a una situación de competencia por el uso de las tierras (Lindorfer et al., 2019). Por todo ello, la evaluación exhaustiva de los aspectos ambientales, económicos y tecnológicos, y la optimización de este tipo de procesos, son imprescindibles para facilitar la transición necesaria hacia una economía circular, libre de recursos fósiles y más comprometida con el cuidado del medio ambiente.

1.2. Gas de síntesis, estado del arte

La transición hacia un sistema de producción más sostenible supone llevar a cabo un cambio en aquellos sectores que, tradicionalmente, se han caracterizado por emplear recursos no renovables en sus procesos. Dentro de este grupo se encuentra la gasificación con la que se genera el gas de síntesis, donde la posibilidad de emplear biomasa como materia prima abre las puertas a conseguir un cambio hacia la sostenibilidad del proceso.

1.2.1. Composición y formas de obtención

El gas de síntesis, también conocido como syngas, es una mezcla gaseosa formada principalmente por CO e hidrógeno (H_2) junto con otros compuestos que aparecen en menor proporción, como dióxido de carbono (CO_2) o metano (CH_4). Se genera, principalmente, por la gasificación de compuestos con un alto contenido en carbono, donde éstos son sometidos a elevadas temperaturas para llevar a cabo una combustión incompleta empleando un agente gasificante que actúa como comburente (Mondal et al., 2011). Como se muestra en la Figura 2, este proceso consta de dos etapas principales, el acondicionamiento de la materia prima mediante su secado y un proceso de pirólisis que, seguido de diversas reacciones, tiene como resultado un residuo sólido y el gas de síntesis. Cabe destacar que el syngas obtenido se caracteriza por presentar impurezas como alquitranes, compuestos de azufre, etc. que, por lo general, deben ser eliminados antes de su uso (Sikarwar et al., 2016)

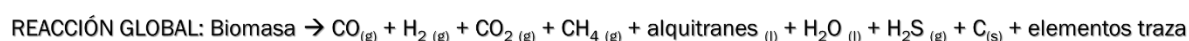
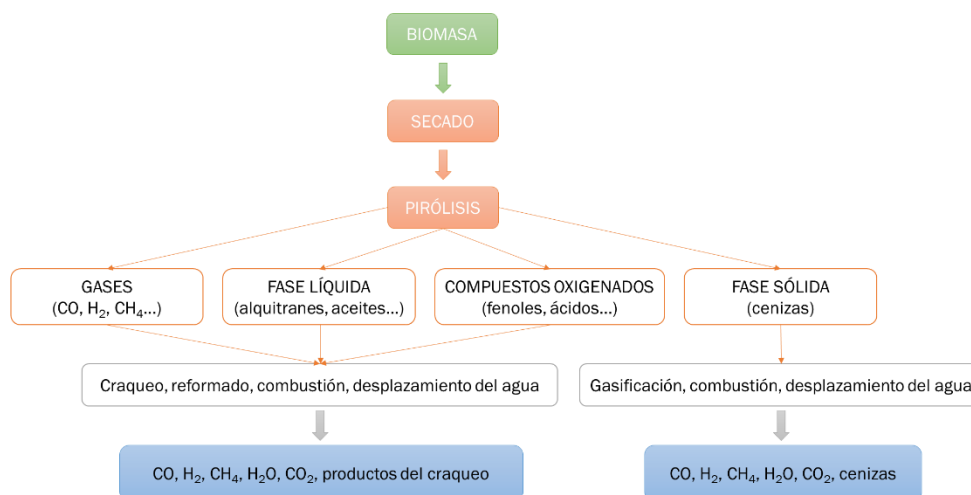


Figura 2. Esquema del proceso de gasificación (Sikarwar et al., 2016)

Existen diversos factores que influyen en la calidad y características del producto final, así como en la eficiencia del proceso. Uno de ellos es la materia prima de partida ya que, como se muestra en la Tabla 1, determinará en gran medida la composición que presentará el gas de síntesis final, así como su producción y los requerimientos energéticos de la etapa de secado (Sikarwar et al., 2017).

Tabla 1. Composición del gas de síntesis en función de la materia prima empleada en la gasificación

	Composición del gas de síntesis (%v/v)				Referencia
	CO	H ₂	CO ₂	CH ₄	
Fango de depuradora	19,5-31,6	5,1-8,1	13,3-16,5	0,9-1,5	Ciliberti et al., 2020
Fango espesado de depuradora	8-14	~13	13-16,7	2-4,2	Judex et al., 2012
Residuos municipales	22-24	8-23	6-15	0-3	Niu et al., 2013
Digestato	10-14	9-12	12-14	3-4	Freda et al., 2019
Petróleo	30-60	25-30	5-15	-	Saroha et al., 2017
Carbón	14,5-36	36-38,3	23-32	5-12,5	Chen et al., 2017

La materia prima de partida puede ser tanto un recurso renovable (biomasa) como no renovable (carbón, petróleo, etc.). A pesar de que la producción de gas de síntesis tradicionalmente se ha basado en el empleo del gas natural, carbón o fracciones derivadas del petróleo como materia prima, existen varias razones por las cuales interesa sustituir estos recursos. El alto contenido en azufre y metales que presentan estos compuestos, así como la tendencia actual hacia el abandono del uso de los combustibles fósiles, son puntos a favor de la obtención de esta mezcla gaseosa a partir de la gasificación de biomasa, con una huella de carbono neutra y un menor requerimiento energético que empleando recursos como el carbón o el petróleo (Mondal et al., 2011). Las 15 nuevas plantas de gasificación a partir de biomasa que se encuentran actualmente en fase de construcción en Europa, sumándose a las 124 ya existentes (Figura 3), demuestran una tendencia hacia este cambio en el tipo de recursos empleados (IEA Bioenergy, s. f.).

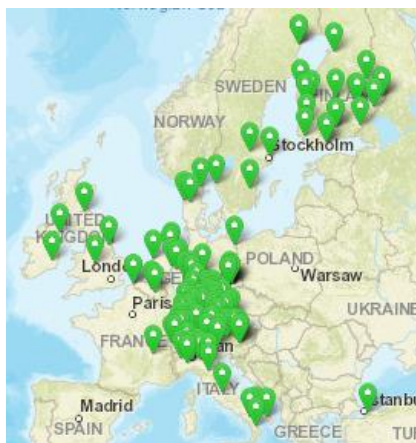
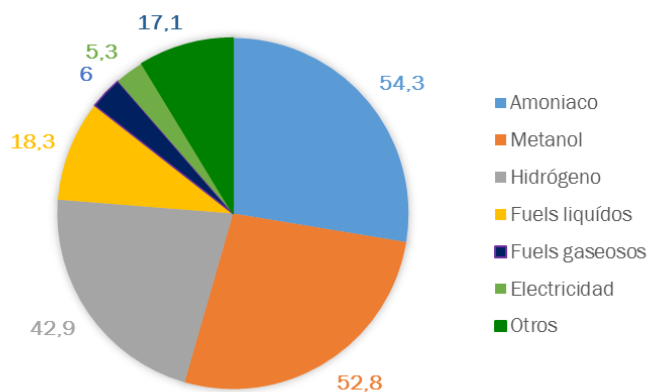


Figura 3. Plantas de gasificación de biomasa activas en Europa (IEA Bioenergy, s. f.)

1.2.2. Aplicaciones del gas de síntesis

Una vez obtenido el syngas, éste puede destinarse a la producción de combustibles, energía y a la síntesis de productos químicos de gran interés. En la Gráfica 2 se observa que la obtención de químicos como metanol o amoníaco es el principal uso que se le da a esta mezcla gaseosa, seguido por la producción de combustibles y, en menor proporción, por la generación de electricidad.



Gráfica 2. Productos derivados del gas de síntesis en 2021, expresados en millones de Nm³/h (Barton, 2021)

Como se muestra en la Figura 4, parte de estos productos se obtienen de forma directa del gas de síntesis, como es el caso del metanol (CH₃OH) o de los combustibles generados mediante el proceso de Fischer-Tropsch, mientras que otros emplean compuestos purificados a partir del mismo, como la producción de amoniaco (NH₃) donde se utiliza el H₂ presente en la mezcla gaseosa. Sin embargo, todos estos procesos se llevan a cabo a elevadas temperaturas y presiones de operación y precisan de un acondicionamiento de la composición del syngas previo a su utilización (GSTC, s. f.; Liew et al., 2016; NETL, s. f.). Estos factores hacen que disminuya la versatilidad del proceso y suponen un aumento de la energía externa que debe suministrarse al mismo. Por ello, existe un gran interés en buscar procesos alternativos donde estas limitaciones se vean solventadas, como puede ser la fermentación biológica de los compuestos de un solo carbono (CO y CO₂).

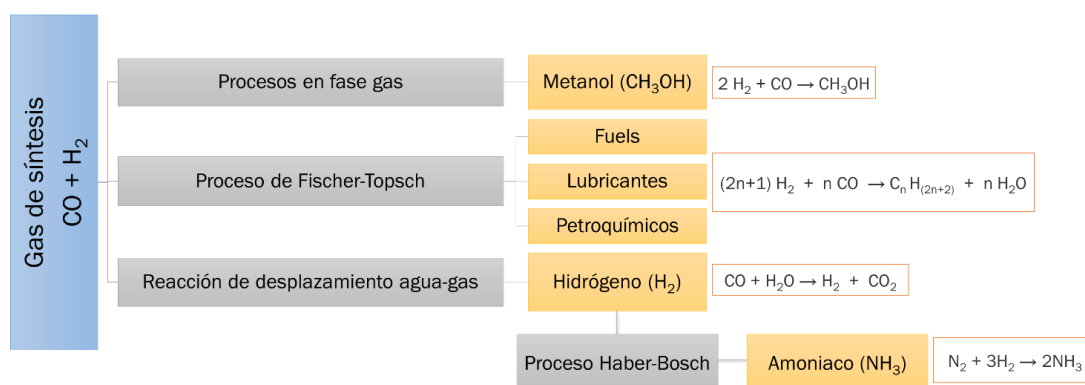


Figura 4. Esquema de los principales productos derivados del gas de síntesis y su proceso de obtención.

1.2.3. Biorrefinerías asociadas a la fermentación de CO

La conversión del syngas en compuestos químicos a través de una fermentación presenta varias ventajas frente a la conversión mediante procesos físico-químicos. Si se compara, por ejemplo, con el proceso de Fischer-Tropsch (Tabla 2) puede comprobarse que las diferencias en las condiciones de operación son más favorables, ya que no se requiere de elevadas presiones ni temperaturas. Sin embargo, la mayor ventaja se encuentra en el catalizador que emplea cada proceso. En el proceso de Fischer-Tropsch se utilizan catalizadores metálicos que requieren de un gas de síntesis con una elevada pureza para evitar su envenenamiento, así como un ratio $H_2:CO$ específico (Basu, 2018). Esto hace necesario que exista una etapa de acondicionamiento del syngas, que actualmente supone un 60-70% del coste de operación de la planta (Daniell et al., 2012). Por el contrario, los microorganismos empleados en las fermentaciones son capaces de tolerar un rango más amplio de concentraciones de H_2 y CO , siendo además menos sensibles ante la presencia de ciertos contaminantes y operando a temperatura y presión ambiente (Molitor et al., 2016).

Tabla 2. Principales diferencias entre el proceso de Fischer-Tropsch y la fermentación del syngas (Molitor et al., 2016)

	Proceso de Fischer Tropsch	Fermentación del syngas
Temperatura	150-300°C	37°C
Presión	30 bar	Atmosférica
Catalizador	Co, Ru o Fe	Microorganismos
Ratio $H_2:CO$	2:1	Variable
Productos	Combustibles y lubricantes	Acético, etanol, lactato...

Este aspecto es de gran importancia, ya que sustituir el proceso de Fischer-Tropsch por una fermentación no sólo supondría abaratar los costes de purificación del gas de síntesis, sino también ampliar las materias primas que pueden ser empleadas en los procesos de gasificación. En este contexto, la obtención del syngas mediante la gasificación de biomasa cobra una gran importancia, ya que la variabilidad en la composición de la mezcla gaseosa que se mostraba en la Tabla 1 no supondría un problema para las bacterias que actúan en la fermentación. Además, aprovechar la biomasa residual en este tipo de procesos es de gran interés, ya que impulsa el abandono de recursos no renovables en un

sector donde el carbón y el gas natural son las materias primas más empleadas (Grim et al., 2019).

Por otro lado, también es importante destacar que la fermentación del gas de síntesis permite la conversión del CO, CO₂ y H₂ principalmente en ácido acético y etanol, pero también posible la producción de otros ácidos orgánicos y alcoholes como el butanodiol o el ácido láctico (Figura 5) (Bae et al., 2022). Todos estos productos son sintetizados de forma natural por bacterias acetogénicas, que son aquellas capaces de emplear el CO y CO₂ en presencia de H₂ como fuente de carbono en ausencia de oxígeno (Molitor et al., 2016). A parte de estos cuatro compuestos que son obtenidos de forma natural en el proceso de fermentación, a través de la modificación de las rutas metabólicas de las bacterias acetogénicas pueden obtenerse otros productos de un mayor valor añadido como butírico, butanol, ácido hexanoico, etc. (Liew et al., 2016).

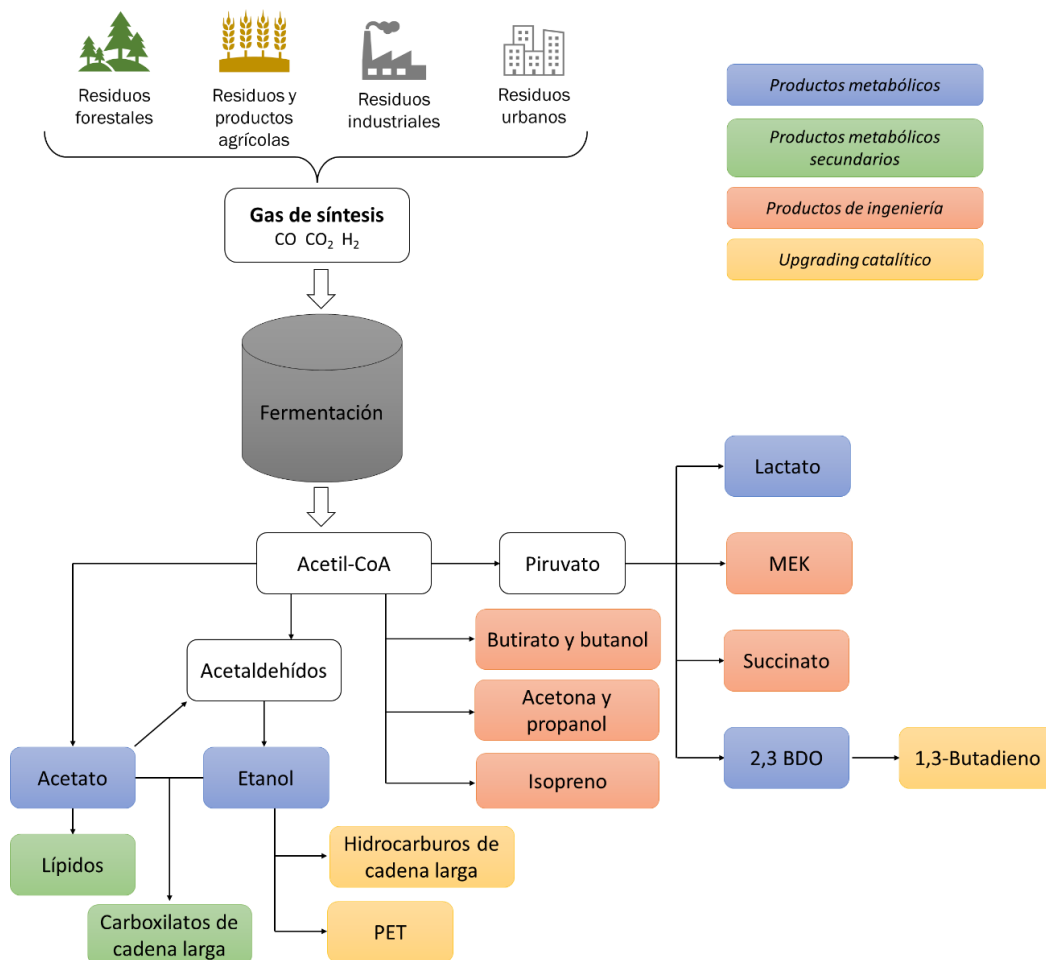


Figura 5. Esquema del proceso de fermentación del gas de síntesis y los productos resultantes (Liew et al., 2016)

Sin embargo, llevar este tipo de fermentación a escala industrial requiere de una optimización del proceso debido a las limitaciones actuales que presenta. Una de las más importantes es la baja solubilidad de compuestos como el CO, CO₂ y H₂ ($9,7 \cdot 10^{-6}$, $3,3 \cdot 10^{-4}$ y $2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$ a 298,15 K, respectivamente (Sander, 2015)), lo que hace necesario favorecer su transferencia a la fase líquida para garantizar la disponibilidad de sustrato para las bacterias responsables del proceso de fermentación (Schiel-Bengelsdorf & Dürre, 2012). Puesto que incrementar el flujo de syngas empleado podría suponer una disminución en la generación de producto respecto al carbono introducido en la alimentación, este problema debe solventarse mediante la selección de un reactor donde la transferencia de materia se vea incrementada, como son las columnas de burbujeo con difusores de burbuja fina (Liew et al., 2016). Por otro lado, la presencia de alquitranes en el gas de síntesis que afectan negativamente a las bacterias y provocan problemas mecánicos de operación. Por ello, es necesaria su eliminación, ya sea mediante su minimización o destrucción en el propio gasificador o mediante un proceso de purificación posterior (Sikarwar et al., 2016). Finalmente, puesto que hasta ahora únicamente se han alcanzado altas productividades de etanol y acético en este tipo de bacterias, es fundamental optimizar las condiciones de operación e incrementar la síntesis de compuestos con un mayor valor de mercado, como el butanol o el ácido hexanoico, de los que aún se reportan bajas concentraciones y selectividades a través de este tipo de fermentación (Baleeiro et al., 2019)

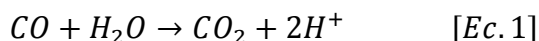
1.3. Bacterias acetogénicas. Género *Acetobacterium*

Entre las diversas especies capaces de emplear el CO y CO₂ como fuente de carbono, las bacterias acetogénicas destacan porque el producto final de su metabolismo no es siempre el ácido acético (Schuchmann & Müller, 2016). El acetil-CoA que se genera en la ruta de Wood-Ljungdahl (WL), que es la que permite la metabolización del CO y CO₂ en presencia de H₂, puede ser empleado tanto para producir acético como para generar productos de fermentación que son de mayor interés, como el etanol o el 2,3- butanodiol (Liew et al., 2016).

Dentro de las bacterias acetogénicas, el género *Acetobacterium* es uno de los más estudiados. Fue descubierto por Balch et al. (1977), quienes lo describieron como una bacteria anaerobia gram positiva capaz de oxidar el H_2 y reducir el CO_2 a ácido acético, al igual que era capaz de fermentar sustratos orgánicos como fructosa o formiato. Concretamente, la cepa que aislaron fue *Acetobacterium woodii*, que se ha convertido en el modelo de estudio metabólico de las bacterias acetogénicas (Bengelsdorf et al., 2018). Aunque el ácido acético sea el producto principal del metabolismo de esta cepa, diversos estudios reportan la producción de otros compuestos que se sintetizan de forma natural como productos del metabolismo, así como otros que pueden sintetizarse mediante ingeniería genética (Liew et al., 2016).

1.3.1. Ruta metabólica de degradación de CO y CO_2

Como se ha indicado anteriormente, el CO y CO_2 son metabolizados por las bacterias acetogénicas a través de la ruta de Wood-Ljungdahlii, actuando ambos sustratos como fuente de carbono y energía. Esta ruta se encuentra formada por dos ramas distintas (metilo y carbonilo) cuyo inicio es ligeramente distinto en función del sustrato de partida (Figura 6). Cuando se parte del CO, es necesaria su oxidación a CO_2 como paso previo a la formación de formiato (HCOOH), lo que se lleva a cabo a través de la reacción biológica de desplazamiento del gas del agua (Ec. 1) mediante la actuación de la enzima CO deshidrogenasa (CODH) (Schiel-Bengelsdorf & Dürre, 2012). Por el contrario, cuando el sustrato es CO_2 , debe producirse su reducción a CO en la rama carbonilo a través de la actuación del complejo enzimático CO deshidrogenasa y acetil-CoA sintasa (CODH/ACS) (Schuchmann & Müller, 2014).



En ambos casos, al HCOOH obtenido se acopla a la coenzima tetrahidrofolato (THF) para después producirse una serie de reducciones que tienen como resultado final un grupo metilo (CH_3-), que es transferido a la proteína hierro-azufre (CoFeSP) que actuará como donadora de este grupo (De Tissera et al., 2019). Finalmente, el CH_3- y CO generados se fusionan a la coenzima A (CoA) por la actuación del complejo enzimático CODH/ACS, teniendo como resultado la síntesis del acetil-CoA que será el precursor metabólico de un gran amplio abanico de compuestos.

Por último, cabe destacar que la metabolización del CO₂ requiere de la presencia de H₂ como agente reductor. Esto se debe a que su oxidación permite generar electrones (e⁻) que participan en la ruta WL, siendo necesaria la actuación de la enzima hidrogenasa (H₂asa) (Schuchmann & Müller, 2014).

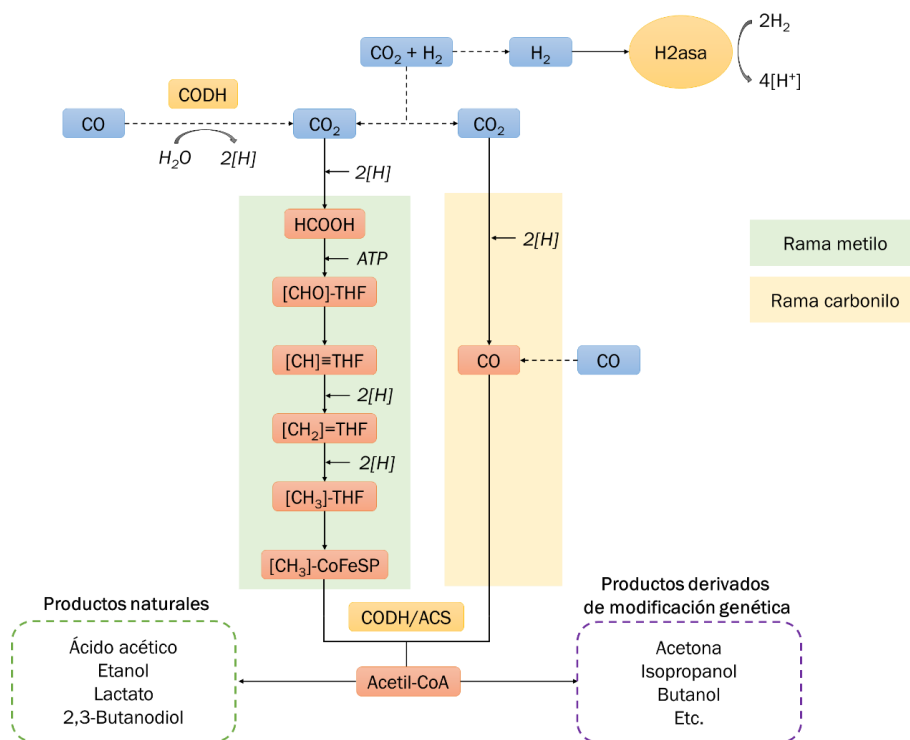


Figura 6. Esquema de la ruta de Wood-Ljungdahl donde se muestran los sustratos empleados (azul), los intermediarios metabólicos (rojo) y las enzimas que participan en el proceso (amarillo) (Bae et al., 2022)

1.3.2. Productos de fermentación del gas de síntesis

Como se ha indicado anteriormente, el producto principal sintetizado en la ruta de WL es el ácido acético, cuya producción se ha reportado en todas las bacterias acetogénicas siendo, en la mayoría, el único producto de fermentación (Daniell et al., 2012). Este compuesto es uno de los más empleados en la industria química debido al gran número de aplicaciones que presenta (productos de limpieza, fertilizantes...), alcanzando una capacidad de producción mundial de 17,9 millones de toneladas en 2018 (Fernandez, 2021). En la actualidad, su síntesis se basa en una carbonilación catalítica del metanol, donde se opera a 180-220°C y 30-40 atm (Yoneda et al., 2001). La posibilidad de trabajar bajo unas condiciones más suaves hace que sea de interés sustituir este proceso

petroquímico tradicional por uno biológico, como es la fermentación del syngas. Por ejemplo, dentro del género *Acetobacterium*, las condiciones de crecimiento óptimas reportadas para la cepa *Acetobacterium woodii* son 30°C y un pH de 6,8 (Liew et al., 2016), valores similares a los observados para otras especies como *A. wieringae* (30°C y pH 7,6) (Braun & Gottschalk, 1982). Para la primera, se ha obtenido una productividad máxima de ácido acético de 7,4 g·L⁻¹·d⁻¹, alcanzada en un proceso en batch donde se empleaba CO₂ como sustrato (Demler & Weuster-Botz, 2011); en este ensayo, la concentración final de acético que se alcanzó fue 44 g·L⁻¹, la máxima reportada. El empleo de gas de síntesis como sustrato para esta misma cepa sólo ha sido publicado en el trabajo de Bertsch & Müller (2015), quienes observaron que, al emplear CO como fuente de carbono y energía, tanto la producción de acético como el crecimiento de *A. woodii* se ven afectados negativamente a elevadas concentraciones. Concretamente, trabajar con un porcentaje superior al 10% de CO hacía que el ratio de producción de acético disminuyera drásticamente respecto al crecimiento en presencia de H₂ y CO₂, al igual que la tasa de crecimiento. Un comportamiento distinto se observa para la cepa *A. wieringae* JM, la cual, según Arantes et al. (2020), es capaz de crecer con un 100% de CO, obteniéndose en el medio de cultivo una concentración final de casi 1,2 g·L⁻¹ de acético.

Otro producto de gran interés sintetizado por las bacterias acetogénicas es el etanol, compuesto que destaca por ser un combustible alternativo a la gasolina (ECHA, s. f.). La producción de este compuesto en *A. woodii* sólo se ha reportado empleando glucosa como fuente de carbono y cuando el medio mineral presentaba concentraciones de fosfato entre 0,2 y 8,4 mM (Buschhorn et al., 1989). Sin embargo, en el caso de la cepa *A. wieringae* JM, Arantes et al. (2020) observaron una cierta producción de etanol empleando un 100% de CO, aunque la concentración no superó los 0,1 g·L⁻¹. Estos valores muestran que no puede esperarse una alta producción de etanol por parte de las especies del género *Acetobacterium*.

A pesar de que la producción de ácido acético y etanol empleando gas de síntesis como sustrato ya se ha probado y estudiado en diversos trabajos, el interés actual en lo relativo a los productos de fermentación del syngas reside en obtener compuestos de mayor valor como son los ácidos grasos de cadena media (AGCM) (Diender et al., 2016). Esto puede conseguirse tanto empleando bacterias que lo producen de forma natural, como mediante la elongación de las cadenas de ácidos de cadena corta (AGCC). Este último proceso se

basa en una β -oxidación inversa, que consiste en la adición de dos carbonos a los AGCC empleando un donador de electrones como el etanol o el lactato, producidos de forma natural por diversas bacterias acetogénicas (Baleeiro et al., 2019). Por otro lado, la combinación de las bacterias acetogénicas con otros organismos capaces de producir los AGCM supondría aprovechar el potencial de generación de los principales productos metabólicos. Por ejemplo, en el caso de las especies del género *Acetobacterium*, su alta producción de acético podría abrir las puertas a la realización de un proceso en combinación con levaduras capaces de transformar este acético, junto con otros ácidos grasos volátiles, en lípidos que pueden ser empleados como biocombustibles (Daniell et al., 2012).

1.4. Justificación del trabajo experimental

La tendencia hacia el abandono de los combustibles fósiles y el impulso hacia una economía circular, libre de residuos, abre las puertas al desarrollo de las biorrefinerías como alternativa a las industrias actuales. Uno de los sectores en los que ya se ha probado este cambio es el de generación de gas de síntesis, empleando biomasa como materia de partida en lugar del gas natural y carbón que se utilizan actualmente. Además, este gas de síntesis puede ser empleado en la producción de compuestos químicos a través de una fermentación llevada a cabo por bacterias acetogénicas, siendo un proceso que aventaja a otros tradicionales al presentar unas condiciones de operación más suaves y permitir operar con un mayor rango de composiciones.

A pesar de que se han estudiado las tasas de crecimiento y los niveles de producción de los compuestos derivados del metabolismo autótrofo de las bacterias acetogénicas empleando H_2 y CO_2 , aún existen pocos trabajos que reporten el comportamiento de ciertos cultivos ante la presencia de CO o con un gas de síntesis cuya composición se asemeje a las obtenidas en los procesos de gasificación de biomasa. Por ello, en este trabajo se estudiará el comportamiento de *A. woodii* en presencia de una mezcla gaseosa sintética que se aproxime a la composición real del syngas que se obtiene por gasificación de la biomasa (35% H_2 , 30%CO, 25% CO_2 y 10% CH_4). Además, se analizará cómo afecta la concentración de CO tanto al crecimiento como a la producción de ácido acético.



2. Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo conocer el comportamiento de la cepa *A. woodii* empleando diferentes diluciones de un syngas sintético, cuya composición se asemeja a la obtenida en los procesos de gasificación de biomasa. Como objetivos específicos se plantearon:

- Determinar la máxima concentración de CO que permite el crecimiento y la producción de ácido acético de *A. woodii*
- Evaluar el crecimiento y la producción de ácido acético de *A. woodii* bajo diferentes diluciones de gas de síntesis (i.e. concentración de CO, CO₂ y H₂)

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

La cepa empleada en este trabajo fue *Acetobacterium woodii* (DSM 1030), adquirida de la colección del Leibniz-Institut DSMZ (Alemania). Para llevar a cabo su cultivo se empleó el medio CP anaerobio, cuya composición se muestra en la Tabla 3. Todas las disoluciones adicionadas tras esterilizar el medio se almacenaban en una atmósfera de N₂ y eran filtradas con un filtro de jeringa de PES de 0,22 µm de diámetro de poro (SFPE-22E-050).

Tabla 3. Composición del medio CP anaerobio

Solución 1 → 15 mL·L⁻¹	
KH ₂ PO ₄	27,2 g·L ⁻¹
Solución 2 → 15 mL·L⁻¹	
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	35,6 g·L ⁻¹
Solución 3A → 12,5 mL·L⁻¹	
NH ₄ Cl	24 g·L ⁻¹
NaCl	24 g·L ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O	8 g·L ⁻¹
Solución 3B	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	11 g·L ⁻¹
Solución 4	
NaHCO ₃	80 g·L ⁻¹
Elementos traza I → 1 mL·L⁻¹	
HCl	1,8 g·L ⁻¹
H ₃ BO ₃	61,8 mg·L ⁻¹
MnCl ₂	61,25 mg·L ⁻¹
FeCl ₂	943,5 mg·L ⁻¹
CoCl ₂	64,5 mg·L ⁻¹
NiCl ₂	12,86 mg·L ⁻¹
ZnCl ₂	67,7 mg·L ⁻¹

CuCl ₂	13,35 mg·L ⁻¹
Elementos traza II → 1 mL·L⁻¹	
<hr/>	
NaOH	400 mg·L ⁻¹
Na ₂ SeO ₃	17,3 mg·L ⁻¹
Na ₂ WO ₄	29,4 mg·L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄	20,5 mg·L ⁻¹
Vitaminas	
<hr/>	
Biotina	20 mg·L ⁻¹
Nicotinamina	200 mg·L ⁻¹
Ácido p-amino benzoico	100 mg·L ⁻¹
Vitamina B1	200 mg·L ⁻¹
Ácido pantoténico	100 mg·L ⁻¹
Piridoxina	500 mg·L ⁻¹
Vitamina B12	100 mg·L ⁻¹
Riboflavin	100 mg·L ⁻¹
Solución 7	
<hr/>	
Na ₂ S·9H ₂ O	240,2 g·L ⁻¹
Solución 8 → 1 mL·L⁻¹	
<hr/>	
Resazurina	0,5 g·L ⁻¹

Por otro lado, para determinar la concentración de ácido acético presente en el medio se empleó como patrón ácido acético glaciar. Este, junto con todas las sales empleadas en la elaboración del medio mineral, se adquirieron en PanReac AppliChem (Barcelona). Los gases empleados para el crecimiento del cultivo fueron N₂ (≥99,9%) y syngas sintético (25%CO₂, 30%CO, 10%CH₄ y 35%H₂), de Abelló Linde S.A. (Barcelona).

3.2. Métodos

3.2.1. Procedimiento experimental

- **Preparación del medio CP anaerobio**

Para preparar el medio CP anaerobio (Tabla 3) primero se disolvían las soluciones 1, 2, 3A, 8 y elementos traza I y II en agua destilada tipo I, junto con $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extracto de levadura. Empleando HCl 37%v/v, el pH del medio era ajustado a un valor próximo a 4 y, posteriormente, la mezcla era llevada a ebullición en un Erlenmeyer durante menos de 20 s. Tras enfriar la disolución en un baño con hielo, burbujeando nitrógeno, ésta se distribuía en las botellas y, una vez cerradas, se procedía a intercambiar el espacio de cabezas por la mezcla de gases deseada, presurizando las botellas hasta los 1,2 bar. Tras ser autoclavadas (121°C , 20 min) se dejaban enfriar a temperatura ambiente para después adicionar la solución de calcio y vitaminas (10 mL solución 3B y 1 mL solución vitaminas, 1%v/v) y la solución reductora (50 mL solución 4, 1 mL solución 7 y 0,5 g de cisteína, 5%v/v).

- **Ensayos de crecimiento con un 20 y 30% de syngas**

El inóculo empleado procedía de un cultivo de *A. woodii* crecido en una botella serológica de 120 mL con 50 mL del medio CP anaerobio que presentaba $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa, bajo una atmósfera 100%N₂. Esta botella fue incubada a 200 rpm y 30°C (Thermo Fisher Scientific Inc., EE. UU.) durante tres días.

Una vez se alcanzó una alta densidad de cultivo, se procedió a inocular con 1 mL las botellas serológicas de 120 mL, que contenían 50 mL de medio CP y diferentes diluciones del syngas. Concretamente, se trabajó con una atmósfera del 20% y 30% de syngas empleando N₂ para la dilución. Todos los ensayos se realizaron en duplicado. Además, se contó con una botella de control negativo para descartar contaminación del cultivo durante el ensayo, que contenía 50 mL de medio CP anaerobio en las condiciones más favorables para la proliferación de microorganismos ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa y $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extracto de levadura en el medio mineral y N₂ en la fase gas). Durante el experimento, tras pasar las

primeras 24h sin agitación, todas las botellas se encontraban a $28\pm 2^\circ\text{C}$ con una agitación de 200 rpm.

Al inicio del ensayo se realizó una caracterización inicial del espacio de cabezas, pH, densidad óptica a 650 nm (OD_{650}) y concentración de acético, que serían los parámetros que se medirían en la experimentación. Para la toma de muestras líquidas y gaseosas, se trabajó siempre a la llama, quemando el septum de las botellas para evitar su contaminación. La frecuencia de medida se modificó a lo largo del ensayo en función de los resultados obtenidos, extrayéndose muestra líquida cada 3-4 días hasta observarse una cierta turbidez en las botellas, pasando entonces a monitorizar con mayor frecuencia.

- **Ensayos de crecimiento con un 30, 40 y 50% de syngas**

Una vez obtenido un cultivo crecido al emplear una atmósfera con un 20% de gas de síntesis, se inocularon con 1 mL de este cultivo botellas serológicas de 120 mL con 50 mL de medio CP anaerobio y diluciones más altas de syngas; concretamente se trabajó, por duplicado, con un 30, 40 y 50% de gas de síntesis en la fase gas, empleando de nuevo N_2 como gas inerte.

Este ensayo se realizó de forma equivalente al anterior, incubando las botellas las primeras 24h sin agitación para después pasar a una agitación de 200 rpm a $28\pm 2^\circ\text{C}$ hasta el final del experimento. Los parámetros que se monitorearon fueron el crecimiento de la biomasa, pH, producción de ácido acético y consumo de CO , CO_2 y H_2 , siendo la frecuencia de medida cada 2-3 días en el caso de la fase gas y de una vez por semana en el caso del medio de cultivo.

3.2.2. Métodos analíticos

El consumo de CO_2 , CO y H_2 se siguió a través de cromatografía de gases mediante el cromatógrafo Bruker 430 GC-TCD (Bruker Corporation, Palo Alto, EE. UU.). Este contaba con un detector de conductividad térmica (TCD) y con las columnas CP-PoraBOND Q (25m x 0,53 mm x 10 μm) y CP-Molsieve 5Å (15m x 0,53 mm x 15 μm), adquiridas en Agilent (Santa Clara, EE. UU.). Respecto a las características del método de medida empleado, se operaba con una temperatura de 150°C , 45°C y 200°C en inyector, horno y detector,

respectivamente, y fue helio (He) el gas empleado como fase móvil a una velocidad de 13,7 mL·min⁻¹. Para la toma de las muestras gaseosas se utilizó una jeringa de gases de 250 µL (Hamilton Company, NV, EE. UU.), despresurizando antes de la inyección y esterilizando la aguja con la llama entre cada toma de muestra. Las curvas de calibración para los compuestos evaluados se encuentran en el Anexo I.

Respecto al análisis del medio de cultivo, el seguimiento del pH se realizó con el pH-metro Basic 20 pH (Crison, España), mientras que el crecimiento de la biomasa se monitoreó midiendo la densidad óptica a 650 nm (OD₆₅₀) de 1 mL del medio de cultivo con el espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Alemania). La relación entre la concentración de biomasa y la OD₆₅₀ para la cepa empleada se determinó en pasados experimentos, y aparece reflejada en la Gráfica A9. Por otro lado, la concentración de ácido acético se midió por cromatografía líquida empleando el HPLC Waters 432 (Waters Corporation, EE.UU.) tomando 1 mL de muestra del caldo de cultivo. El equipo contaba con un detector de conductividad UV-VIS (2998 PDA Detector) e IR (2414 RI Detector) y llevaba acoplada la columna de carbohidratos HyperREZ XP H+ (Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.). El método de medida empleado mantenía la columna a 75°C y empleaba como eluyente ácido sulfúrico (H₂SO₄) con una concentración de 25 mM y un flujo de 0,7 ml/min. Previo a la medida de las muestras éstas eran filtradas con filtros de 0,22 µm. Las curvas de calibración para los compuestos medidos aparecen en el Anexo II.

3.2.3. Cálculos

Conocidas las concentraciones de ácido acético y sustrato al inicio y final de la fase de crecimiento exponencial, es posible calcular el rendimiento de la biomasa según la Ec. 2:

$$Y_{PS} = \frac{[P] - [P]_0}{[S]_0 - [S]} \quad [Ec. 2]$$

Donde [P] y [P]₀ hacen referencia a la concentración de producto final e inicial (g·L⁻¹), respectivamente, y [S] y [S]₀ hacen referencia a la concentración de sustrato final e inicial (g·L⁻¹), respectivamente.

4. Resultados

4.1. Ensayos de crecimiento con un 20 y 30% de gas de síntesis

A partir de un cultivo de *A. woodii* crecido en fructosa ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) se inocularon al 2% botellas serológicas que contenían 50 mL de medio CP anaerobio y dos diluciones de gas de síntesis, aproximadamente del 20 y 30%, que corresponde a una concentración del $5,18\pm 0,44$ y $9,69\pm 0,19\%$ de CO, respectivamente. Bajo estas dos condiciones se procedió a evaluar el crecimiento de la cepa, junto con la producción de ácido acético.

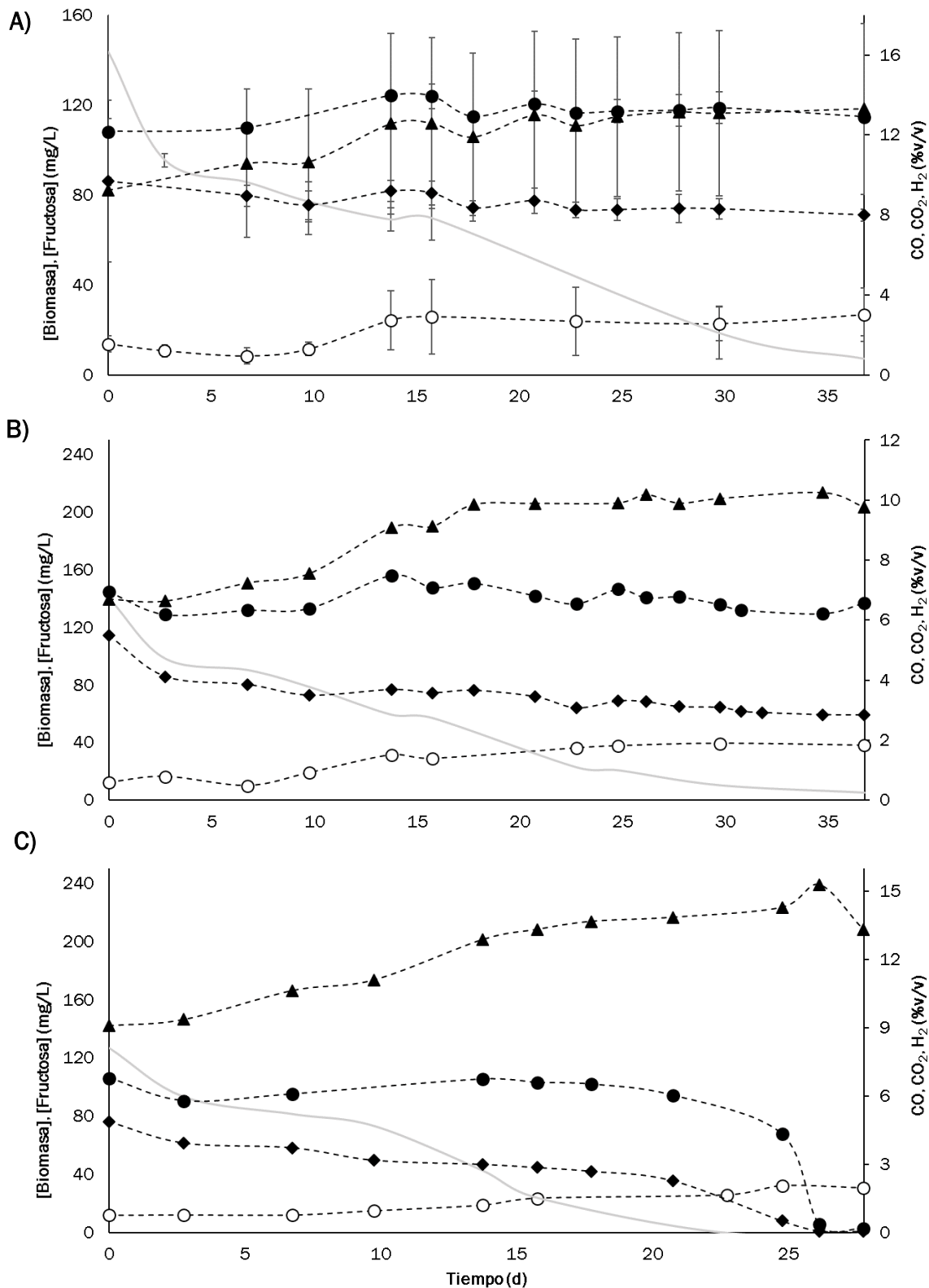
4.1.1. Crecimiento de la biomasa y consumo del sustrato

En el caso de las botellas que contenían un 30% de gas de síntesis, no se observó consumo representativo de ninguno de los compuestos presentes en la fase gas (Gráfica 3A). Durante los 37 días de duración del experimento se observa una ligera disminución en la concentración de CO, pasando de un $9,69\pm 0,19\%$ inicial a un $7,99\pm 0,30\%$ en el último día de operación. De forma simultánea se produjo un incremento en la concentración de CO₂ desde el $9,24\pm 3,60\%$ al inicio del ensayo hasta un $13,32\pm 4,27\%$ al final del mismo, mientras que el H₂ se mantuvo en un valor constante ($13,16\pm 0,41\%$). Respecto a la concentración de biomasa, sólo se registró un ligero aumento en su valor entre los días 10 y 15 de operación, pasándose de $11,48\pm 2,96$ a $25,83\pm 16,53 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Por otro lado, a lo largo del experimento se consume la fructosa presente en el medio de cultivo, cuya concentración disminuye unos $73,83 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en los primeros 16 días del ensayo.

En el caso de las botellas que presentaban un 20% de syngas, cada duplicado evolucionó de forma diferente a pesar de partir con unas condiciones iniciales similares. Por un lado, en una de las botellas se observó un comportamiento parecido al que se dio en los duplicados con un 30% de syngas, sin que se consumiera el CO en su totalidad (Gráfica 3B). Puede comprobarse que la concentración de este compuesto fue disminuyendo gradualmente, pasando de un 5,49% de CO inicial a un 2,84% al final del ensayo. De forma simultánea iba aumentando el CO₂, de un 6,70% inicial a un 9,76% en el último día del experimento. Por el contrario, el H₂ se mantuvo en un valor prácticamente constante durante todo el ensayo ($6,70\pm 0,38\%$). Respecto al crecimiento de la biomasa, entre los días 7 y 14 se observó un aumento representativo en la concentración de ésta, de $10,15$ a $31,44 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomasa. Este incremento se produce a la par que se consume la

fructosa presente en el medio, disminuyendo de $139,91 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ al inicio hasta los $26,62 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 30 de operación. La concentración de biomasa siguió en aumento, finalizándose el experimento con $38,09 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomasa.

Por otro lado, en el otro duplicado con un 20% de gas de síntesis sí que se observa un crecimiento de la biomasa asociado al consumo de CO (Gráfica 3C). Tras una disminución gradual del CO durante los primeros 21 días de experimento, una vez se alcanzó un 2,28% de CO puede comprobarse que éste se consume rápidamente en los cinco días posteriores, finalizándose el experimento con apenas un 0,06% de CO. La evolución del H₂ en estos últimos días fue similar a la de CO, de forma que, tras mantenerse en un valor estable durante los primeros 21 días ($6,37 \pm 0,39 \text{ \%v/v}$), éste se consume de forma paralela al CO finalizando el ensayo con un 0,19%. Respecto al CO₂, su concentración fue en aumento desde un 9,09 %v/v inicial a un 15,29 %v/v en el día 26. Sin embargo, la concentración de CO₂ disminuye entre los días 26 y 28, finalizándose el ensayo con un 13,32 %v/v de CO₂. Respecto a la evolución de la biomasa, se puede observar que la concentración va aumentando progresivamente a lo largo del experimento, registrándose un incremento superior en dos momentos específicos del experimento. Uno de ellos se produce entre los días 14 y 16, donde se pasó de $18,89$ a $23,64 \text{ mg biomasa}\cdot\text{L}^{-1}$. Esto se produce de forma simultánea al consumo de fructosa, que disminuye de $127,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ al inicio a $24,19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 16. El otro incremento en la pendiente de la curva de concentración de biomasa se produjo entre los días 23 y 25, coincidiendo con el inicio del consumo de CO y H₂, y supuso alcanzar una concentración de $32,20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.



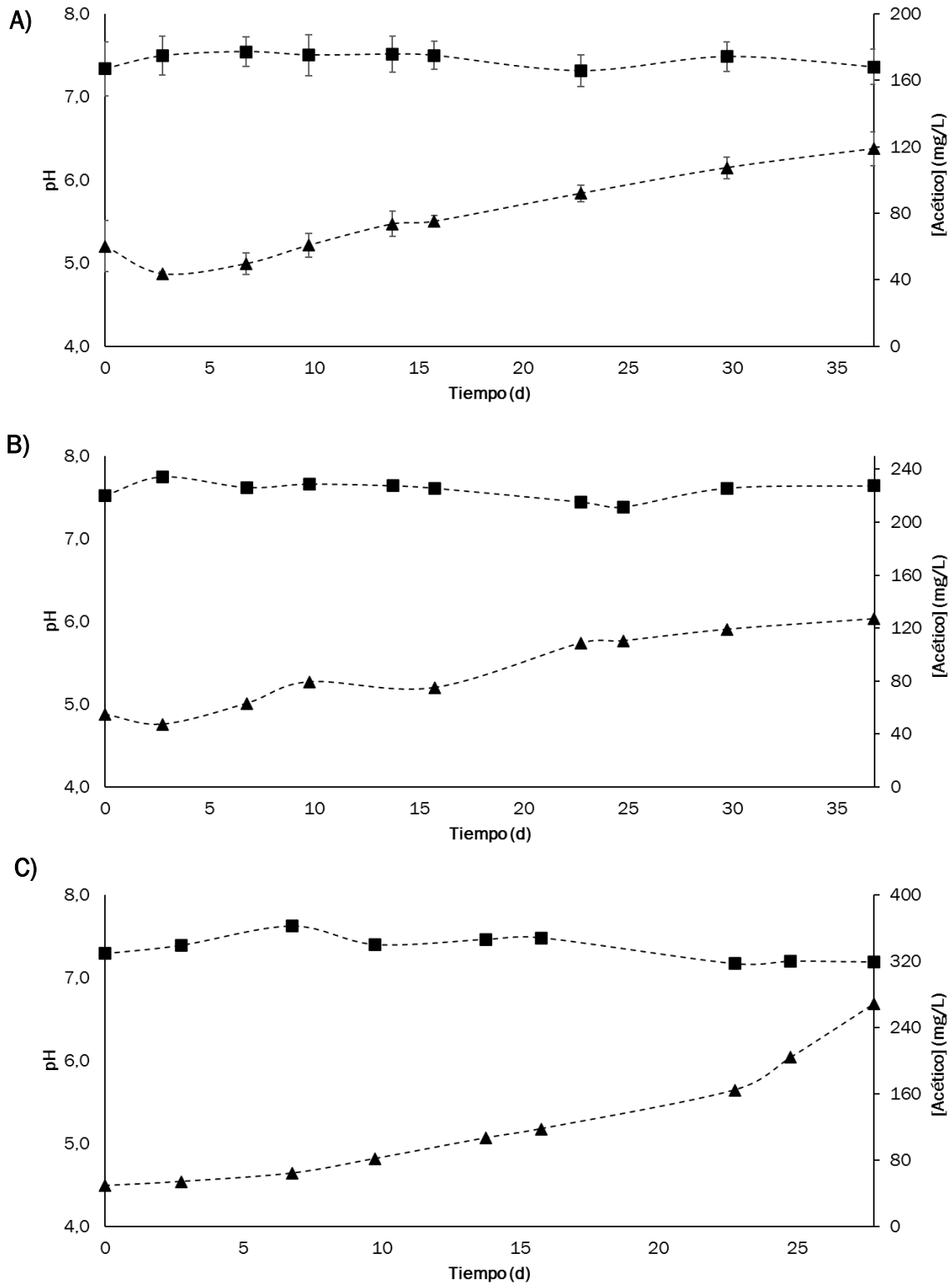
Gráfica 3. Evolución temporal de la concentración de CO (◆), CO₂ (▲) e H₂ (●) en la fase gas, la concentración de biomasa (○) y la concentración de fructosa (línea gris) bajo una atmósfera de un 30% (A) y 20% (B/C) de gas de síntesis

4.1.2. Evolución del pH y producción de ácido acético

Sin llegarse a observar un crecimiento significativo de *A. woodii* al operar con un 30% de syngas, si se da una cierta producción de ácido acético (Gráfica 4A). Tras iniciarse el experimento con una concentración de este ácido de $60,27 \pm 15,50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, su valor se fue incrementando a lo largo del ensayo, que finalizó con $118,83 \pm 10,31 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Por el contrario, el pH se mantuvo estable durante todo el experimento ($7,45 \pm 0,22$).

En el caso de las botellas con un 20% de syngas, en aquella donde no se produjo crecimiento de la cepa tampoco se observó un cambio en el pH, aunque sí se produce un aumento de la concentración de ácido acético (Gráfica 4B). El primero de estos dos parámetros se mantuvo en un valor estable de $7,59 \pm 0,11$, mientras que la concentración de acético fue aumentando ligeramente desde los $54,91 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ iniciales hasta alcanzarse $127,06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el último día de operación.

En la botella con un 20% de syngas donde sí se produjo un crecimiento de *A. woodii* se observa una variación de ambos parámetros (Gráfica 4C). Desde el inicio del ensayo se produjo un aumento en la concentración de ácido acético con dos tendencias distintas. Por un lado, entre el inicio del ensayo y el día 16 de operación se observa un incremento progresivo en la concentración de este compuesto hasta los $117,66 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, manteniéndose el pH en $7,44 \pm 0,11$ durante este periodo de tiempo. Por otro lado, este último parámetro disminuyó su valor hasta mantenerse en $7,19 \pm 0,02$ en la última semana de experimentación, observándose además una producción de ácido acético que permitió alcanzar una concentración final de este compuesto de $268,16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.



Gráfica 4. Evolución temporal del pH (■) y de la concentración de ácido acético (▲) bajo una atmósfera de un 30% (A) y 20% (B/C) de gas de síntesis

4.2. Ensayos de crecimiento con un 30, 40 y 50% de gas de síntesis

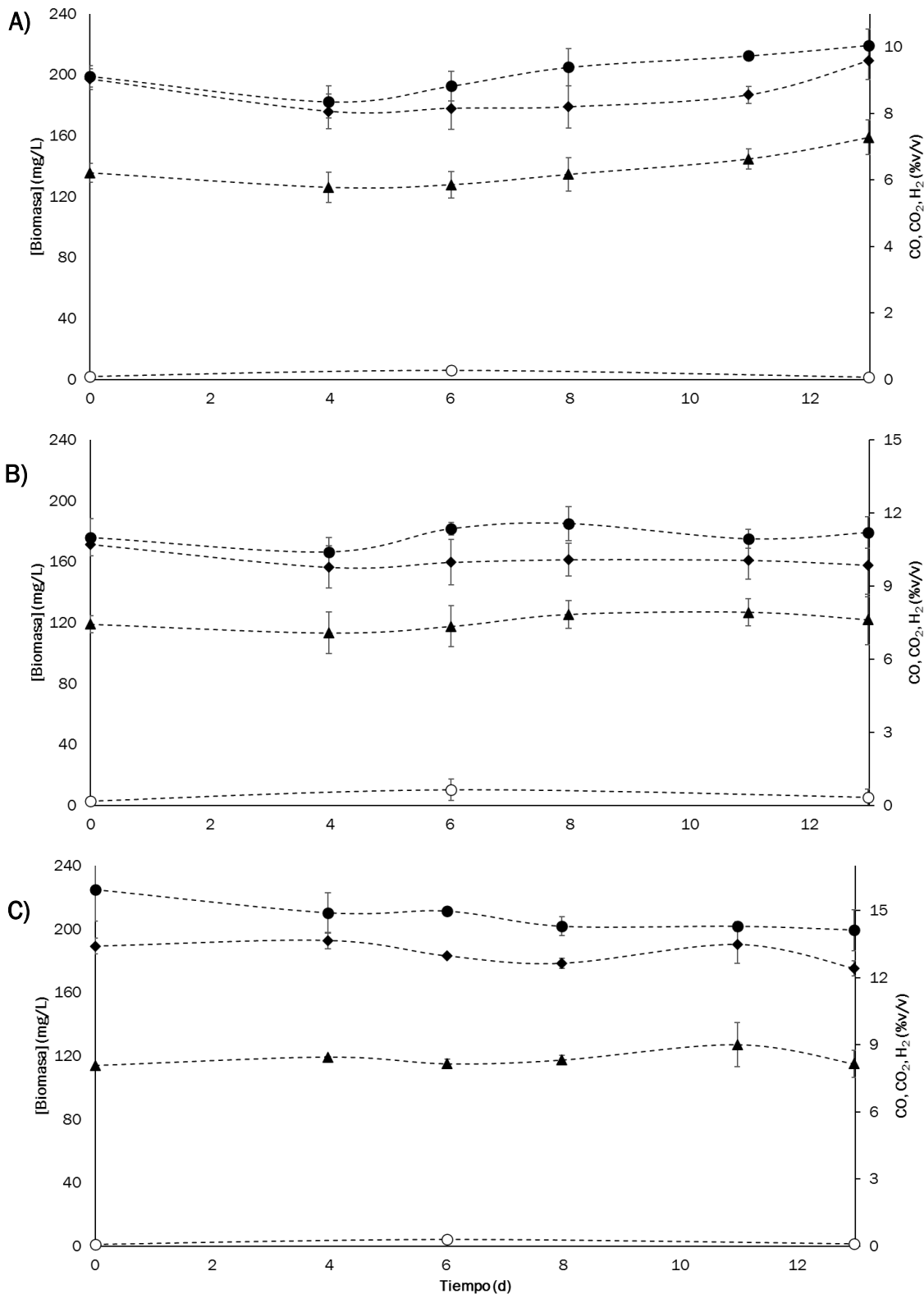
El cultivo de *A. woodii* crecido con un 20% de syngas en el experimento anterior se empleó como inóculo para ensayos con un mayor porcentaje de gas de síntesis. Concretamente, se monitoreó por duplicado la evolución de esta cepa bajo una atmósfera de aproximadamente un 30, 40 y 50% de syngas, que fue equivalente a trabajar con un $9,04\pm 0,31$, $10,70\pm 0,01$ y $13,40\pm 0,35\%$ de CO, respectivamente.

4.2.1. Crecimiento de la biomasa y consumo del sustrato

Durante los trece días en los que se realizó este ensayo no llegó a producirse un consumo significativo del CO, CO₂ y H₂ en ninguno de los casos estudiados. Por un lado, en los duplicados con un 30% de syngas (Gráfica 5A) puede observarse una disminución en la concentración de los tres compuestos durante los primeros seis días de operación, pero esta tendencia se ve revertida los días posteriores, incrementándose las concentraciones. Esto supuso que el ensayo concluyera con un $9,59\pm 0,56\%$, $7,28\pm 0,52\%$ y $10,05\pm 0,48\%$ de CO, CO₂ y H₂ respectivamente, valores superiores a las concentraciones observadas al inicio ($9,04\pm 0,31\%$ CO, $6,22\pm 0,29\%$ CO₂ y $9,12\pm 0,32\%$ H₂). Respecto a la producción de biomasa, sólo se observó un incremento en su concentración en el sexto día de operación, alcanzándose los $1,88\pm 0,13$ mg biomasa·L⁻¹, disminuyendo su valor en el último día de experimentación hasta los $1,41$ mg·L⁻¹.

Por otro lado, en los duplicados con un 40% de syngas (Gráfica 5B) el comportamiento es distinto al observado en el caso anterior, puesto que el CO, CO₂ y H₂ se mantuvieron en un valor estable durante todo el ensayo ($10,08\pm 0,33\%$, $11,07\pm 0,40\%$ y $7,54\pm 0,31\%$, respectivamente). Respecto a la concentración de biomasa, se produjo un aumento de $2,57$ mg·L⁻¹ respecto a la concentración inicial ($2,74\pm 1,61$ mg·L⁻¹).

Por último, en el experimento con un 50% de gas de síntesis (Gráfica 5C) se observó un comportamiento similar al mencionado en el caso anterior. Todos los componentes en la fase gas se mantuvieron en un valor estable ($13,09\pm 0,50\%$ CO, $8,36\pm 0,34\%$ CO₂ y $14,75\pm 0,67\%$ H₂) y la concentración de biomasa sólo se vio incrementada en $0,38$ mg·L⁻¹ respecto al valor inicial ($1,03\pm 0,27$ mg·L⁻¹).



Gráfica 5. Evolución temporal de la concentración de CO (●), CO₂ (◆) y H₂ (▲) en la fase gas y la concentración de biomasa (○) bajo una atmósfera de un 30% (A), 40% (B) y 50% (C) de gas de síntesis

4.2.2. Evolución del pH y producción de ácido acético

Al igual que no se observó un consumo de CO, CO₂ y H₂, tampoco se produjo una producción de ácido acético bajo las tres condiciones estudiadas. Como se muestra en la Tabla 4, la concentración de este compuesto apenas varió durante el ensayo, manteniéndose en un valor promedio de 11,60±2,79, 10,26±3,37 y 10,07±0,76 mg·L⁻¹ bajo un 30, 40 y 50% de syngas, respectivamente. En esta misma tabla también puede comprobarse que prácticamente no se produjo variación del pH. A pesar de que en el día 6 se produjo un ligero descenso en el valor de este parámetro en los tres casos estudiados, los últimos valores observados son prácticamente iguales a los iniciales.

Tabla 4. Evolución del pH y de la concentración de ácido acético en el ensayo donde se operó con un 30, 40 y 50% de gas de síntesis

	30% de syngas		40% de syngas		50% de syngas	
	pH	[Acético] (mg·L ⁻¹)	pH	[Acético] (mg·L ⁻¹)	pH	[Acético] (mg·L ⁻¹)
Inicio	7,61±0,01	14,82±0,67	7,57±0,02	13,69±0,40	7,53±0,06	10,87±0,82
Día 6	7,51±0,04	9,44±0,71	7,44±0,04	6,96±2,00	7,47±0,13	9,96±0,22
Día 13	7,67±0,01	10,05±1,49	7,58±0,14	10,14±1,05	7,50±0,10	9,37±0,00

5. Discusión de resultados

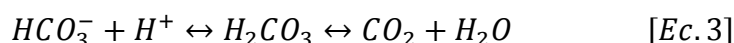
En los ensayos realizados para la asignatura de Orientación Investigadora para el Trabajo Fin de Máster se observó que la cepa *A. woodii* no era capaz de crecer bajo una atmósfera formada por un 100% del syngas sintético empleado. Posiblemente esto se debiera a que la concentración de CO presente en el gas de síntesis (30%) resultaba tóxica para la cepa, por lo que en este trabajo se ha buscado determinar cuál es la máxima concentración de CO con la que *A. woodii* puede desarrollarse.

5.1. Ensayos de crecimiento con un 20 y 30% de gas de síntesis

En este primer ensayo se probaron dos diluciones distintas de gas de síntesis (20 y 30%) para conocer cómo se comportaba la cepa ante bajas concentraciones de CO. De las cuatro botellas con las que se contaba en el experimento, puesto que cada condición de operación se monitoreaba por duplicado, sólo en una de ellas, con un 20% de syngas, se llegó a observar un consumo prácticamente total del CO y H₂, junto con una ligera disminución de CO₂ al final del experimento.

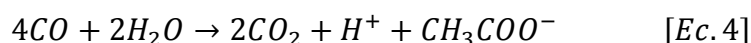
En esta botella se observaron dos fases de crecimiento claramente diferenciadas y que parecían venir marcadas por la concentración de CO presente en la fase gas. La primera de ellas se dio entre el inicio del ensayo y el día 21 de operación, y puede ser considerada la fase lag del crecimiento en syngas. En este periodo de tiempo se observó una disminución progresiva de la concentración de CO a la par que aumentaba el CO₂, manteniéndose el H₂ en un valor constante. Además, se produjo un cierto incremento en la concentración de biomasa hasta los 23,64 mg·L⁻¹ entre los días 14 y 16, aunque seguramente esto se deba al consumo de la fructosa que se encontraba en el caldo de cultivo. La presencia de esta fuente de carbono orgánica se debía a que el cultivo de partida contenía fructosa en el medio mineral en el momento en el que se inocularon las botellas con gas de síntesis, por lo que éstas presentan una cantidad de fructosa proporcional a la introducida en 1 mL de inóculo. Además, seguramente también debido al consumo de la fructosa, se observó una cierta producción de ácido acético, lo que supuso que su concentración en el medio de cultivo se incrementara hasta los 117,66 mg·L⁻¹ sin que el pH se viera afectado, puesto que este se mantuvo en un valor estable de 7,44±0,11 durante esta primera etapa.

Para el incremento de CO₂ observado en esta primera etapa, que fue de un 4,77%, existen tres posibles razones. La principal seguramente fuera la generación de CO₂ debido a las reacciones que se dan en el propio medio mineral, sin que se encuentre relacionado con el crecimiento de la cepa. Gracias a la monitorización de un control negativo pudo comprobarse que, a lo largo del ensayo, se produce un 3% de CO₂ debido, probablemente, a la actuación del sistema tampón carbonato-bicarbonato (Ec. 3). Puede descartarse que el CO₂ generado en esta botella de control viniera dado por una posible contaminación, puesto que la OD₆₅₀ se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento (Gráfica A10).



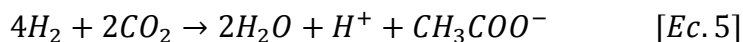
Teniendo en cuenta esta aproximación, puede suponerse que el CO₂ generado debido a reacciones metabólicas era de, aproximadamente, un 1,72%. Por un lado, en ensayos anteriores donde se empleó fructosa como fuente de carbono, se comprobó que existía una producción de CO₂ bajo estas condiciones de crecimiento que resultaba en un rendimiento de generación de 0,52 mol CO₂ · mol⁻¹ fructosa. Por lo tanto, la fructosa consumida a lo largo del experimento, aproximadamente 0,025 mmol, pudo suponer la generación de un 0,43% de CO₂.

Por otro lado, la metabolización del CO también conlleva la producción de CO₂ junto con la de ácido acético (Ec. 4). Según la relación estequiométrica, por cada dos moles de CO consumidos se genera un mol de CO₂, lo que resulta en la producción de un 0,99% de CO₂.



Una vez la concentración de CO disminuyó hasta un 2,28% (día 21) se observa un comportamiento distinto al anterior, pudiendo considerarse que el cultivo entra en la fase de crecimiento exponencial. En esta segunda etapa el consumo de CO se ve acelerado, al igual que sucede con el de H₂. Asociado posiblemente a la metabolización de estos compuestos, puede observarse que entre los días 23 y 25 se produce un incremento en la concentración de biomasa, que supuso finalizar el experimento con una concentración de biomasa de 30,68 mg·L⁻¹, aproximadamente 2,5 veces superior al valor inicial.

Además, una vez el CO es consumido prácticamente en su totalidad, puede comprobarse que existe un cierto consumo de CO₂. Esto se debe a que la cepa es capaz de metabolizar en CO₂ en presencia de H₂, siendo el ácido acético el resultado de esta reacción (Ec. 5).



Este comportamiento de la cepa *A. woodii* bajo la presencia de CO, donde se observan dos fases del crecimiento claramente diferenciadas, se asemeja lo reportado por Bertsch & Müller (2015). En su estudio también comprobaron que la fase lag del crecimiento se prolonga hasta que la concentración de CO se reduce al 3%, concluyendo que la presencia de CO en concentraciones superiores a ese valor inhibe el consumo de H₂, lo que podría verse corroborado con nuestro ensayo.

Durante la última etapa se observa una producción de ácido acético que alcanza una concentración de 268,16 mgL⁻¹ en el medio de cultivo, equivalente a 0,10 mmol, lo que se tradujo en una disminución del pH hasta un valor de 7,20. Esta concentración es muy inferior a la reportada para otra cepa del género *Acetobacterium* como es *A. wieringae*, donde Arantes et al. (2020) alcanzaron hasta 1500 mgL⁻¹ de este compuesto en una atmósfera de syngas. Sin embargo, la composición del gas de síntesis empleado por estos autores (60% CO y 10% CO₂), en la que un 70% correspondía a la fuente de carbono a diferencia del 55% que presenta nuestra mezcla gaseosa, podría predecir una menor producción de acético. Además, en ensayos realizados con *A. woodii* empleando una atmósfera que contenía ≈10%CO₂ la concentración alcanzada fue de 895,11 mgL⁻¹ de acético, valor superior a pesar de que la cantidad de carbono disponible fuera menor (resultados no mostrados en este estudio). Sin embargo, cabe destacar que en este último caso todo el CO₂ presente en la fase gas (10%) fue consumido, mientras que en los ensayos con gas de síntesis sólo se consumió el 5% de CO y apenas un 1% de CO₂, lo que explicaría la baja concentración de ácido acético alcanzada.

Respecto a la generación de ácido acético, es importante tener en cuenta que ésta viene dada tanto por el consumo de fructosa como de los compuestos presentes en la fase gas. Puesto que en experimentos anteriores se comprobó que el rendimiento de generación de ácido acético era de 2,41 mol acético·mol⁻¹ fructosa, puede considerarse que el consumo de este sustrato orgánico supuso la generación de 0,02 mmol de ácido acético. Por lo tanto, los 0,08 mmol restantes pueden asociarse al consumo de CO, CO₂ y H₂. Puesto que a lo largo del ensayo se consumieron 0,13 mmol de CO y 0,02 mmol de CO₂, el rendimiento de generación de acético (Ec. 2) asociado al consumo de estos dos sustratos es de 0,54 mol acético·mol⁻¹ CO+CO₂.

La gran influencia que tiene la concentración de CO en la fase gas puede confirmarse con el resto de los resultados obtenidos. Por un lado, otros compuestos presentes en el gas de síntesis empleado como el CH₄ no parece que influyeran en el crecimiento, puesto que su concentración se mantuvo constante en todos los experimentos. Por otro lado, en el caso la botella que contenía también un 20% de syngas, puede observarse que la concentración de CO que presentaba al inicio del ensayo (5,49%) era ligeramente superior a la de su duplicado (4,87%). Esta diferencia ha podido ser determinante para que no se llegue a alcanzar la fase de crecimiento exponencial en los días que duró el experimento. Por ello, en la botella con un 20% de syngas que presentaba una concentración de CO superior sólo se observó una disminución gradual de este compuesto, correspondiéndose con la primera fase del crecimiento que se observó en su duplicado. Este mismo comportamiento se observó en las botellas con un 30% de gas de síntesis, donde sólo se produce un lento consumo del CO junto con un ligero aumento del CO₂, manteniéndose el H₂ constante prácticamente durante todo el ensayo. Además, es importante indicar que, para estos últimos casos comentados donde no se alcanza la fase de crecimiento exponencial, los incrementos en la concentración de biomasa y en la producción de ácido acético observados se encuentran asociados al consumo de la fructosa residual presente en el medio, ya que se producen simultáneamente.

5.2. Ensayos de crecimiento con un 30, 40 y 50% de gas de síntesis

Una vez se comprobó que la cepa *A. woodii* era capaz de emplear el CO como una fuente de carbono adicional al CO₂, se procedió a incrementar la concentración de este compuesto en la fase gas. A pesar de que se empleó como inóculo un cultivo ya adaptado a la presencia de CO, en ninguno de los tres casos estudiados (30, 40 y 50% de syngas) se observó el crecimiento de la cepa. Sorprendentemente, sólo en los duplicados con un 50% de syngas se intuye, en el último día de ensayo, una cierta tendencia hacia el consumo de CO. Sin embargo, no se observa incremento de la concentración de biomasa ni en la concentración de ácido acético asociada a este consumo. Por esta razón es necesario descartar que la disminución de CO observada se deba a un error experimental. Finalmente, destacar que la ausencia de crecimiento de la cepa bajo estas concentraciones de CO posiblemente se deba a que se precise de más tiempo de incubación. En el ensayo anterior la fase lag fue de 15 días, por lo que es bastante probable



que el cultivo aún se encuentre en esta etapa de adaptación al medio. Además, el hecho de que la concentración inicial de biomasa que presentaban estas botellas ($1,88 \pm 0,86$ mg·L⁻¹) fuera 7 veces inferior a la del ensayo anterior ($13,22$ mg·L⁻¹) constituye una razón de peso para que esta fase lag sea mucho más larga que la observada en primer experimento.

6. Conclusión y trabajo futuro

En este trabajo se ha demostrado que la cepa *A. woodii* es capaz de crecer empleando una mezcla de syngas sintético similar a la generada en los procesos de gasificación de biomasa (35% H₂, 30%CO, 25%CO₂ y 10%CH₄). Sin embargo, al igual que lo observado en trabajos previos, la concentración de CO es determinante para el desarrollo de la cepa. En este sentido, sólo se produjo un crecimiento de la cepa asociado al consumo de CO, CO₂ y H₂ en el primer ensayo, cuando se trabajó con un 20% de syngas; es decir, cuando la concentración de CO no superaba el 5%. Bajo estas condiciones se dio un crecimiento bifásico, con una primera fase lag del crecimiento de larga duración y una segunda etapa donde se incrementa la producción de ácido acético. La adaptación a concentraciones superiores a un 5% de CO (30, 40 y 50% de syngas) no pudo comprobarse debido a la baja concentración de biomasa inicial y los pocos días de operación (ensayo aún en curso), que impidieron alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Es por ello que, de cara a futuros ensayos, sería interesante repetir este último experimento empleando una cantidad de inóculo mayor y así poder optimizar las condiciones de crecimiento de *A. woodii* con el gas de síntesis empleado, tratando de reducir la fase lag de crecimiento y adaptando a la cepa a concentraciones superiores de CO.

Bibliografía empleada

- Arantes, A. L., Moreira, J. P. C., Diender, M., Parshina, S. N., Stams, A. J. M., Alves, M. M., Alves, J. I., & Sousa, D. Z. (2020). Enrichment of Anaerobic Syngas-Converting Communities and Isolation of a Novel Carboxydophilic Acetobacterium wieringae Strain JM. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00058>
- Bae, J., Song, Y., Lee, H., Shin, J., Jin, S., Kang, S., & Cho, B. K. (2022). Valorization of C1 gases to value-added chemicals using acetogenic biocatalysts. En *Chemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131325>
- Balch, W. E., schoberth, S., Tanner, R. S., & Wolfe, R. S. (1977). Acetobacterium, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-27-4-355>
- Baldoni, E., Reumerman, P., Parisi, C., González Hermoso, H., Vikla, K., Vos, J., & M'barek, R. (2021). *Chemical and material biorefineries in the EU*. European Commission, Joint Research Centre (JRC). <http://data.europa.eu/89h/24e98d11-ef06-4233-8f69-1e123938e891>
- Baleeiro, F. C. F., Kleinstuber, S., Neumann, A., & Sträuber, H. (2019). Syngas-aided anaerobic fermentation for medium-chain carboxylate and alcohol production: the case for microbial communities. En *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10086-9>
- Barton, I. (2021). *GSTC Global Syngas Database*. <https://globalsyngas.org/wp-content/conference-presentations/2021/2021-D2-A2-425-Ian-Barton.pdf>
- Basu, P. (2018). Production of synthetic fuels and chemicals from biomass. En *Biomass Gasification, Pyrolysis and Torrefaction: Practical Design and Theory*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812992-0.00012-1>
- Bengelsdorf, F. R., Beck, M. H., Erz, C., Hoffmeister, S., Karl, M. M., Riegler, P., Wirth, S., Poehlein, A., Weuster-Botz, D., & Dürre, P. (2018). Bacterial Anaerobic Synthesis Gas (Syngas) and CO₂ + H₂ Fermentation. En *Advances in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.01.002>

- Bertsch, J., & Müller, V. (2015). CO metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01772-15>
- Braun, M., & Gottschalk, G. (1982). *Acetobacterium wieringae* sp. nov., a new species producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Zentralblatt für Bakteriologie. Allgemeine Angewandte und Okologische Microbiologie Abt.1 Orig.C Hyg.* [https://doi.org/10.1016/S0721-9571\(82\)80017-3](https://doi.org/10.1016/S0721-9571(82)80017-3)
- Buschhorn, H., Durre, P., & Gottschalk, G. (1989). Production and utilization of ethanol by the homoacetogen *Acetobacterium woodii*. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.55.7.1835-1840.1989>
- Chen, Z., Dun, Q., Shi, Y., Lai, D., Zhou, Y., Gao, S., & Xu, G. (2017). High quality syngas production from catalytic coal gasification using disposable Ca(OH)₂ catalyst. *Chemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.025>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Ciliberti, C., Biundo, A., Albergo, R., Agrimi, G., Braccio, G., de Bari, I., & Pisano, I. (2020). Syngas derived from lignocellulosic biomass gasification as an alternative resource for innovative bioprocesses. *En Processes*. <https://doi.org/10.3390/pr8121567>
- Daniell, J., Köpke, M., & Simpson, S. D. (2012). Commercial biomass syngas fermentation. *En Energies*. <https://doi.org/10.3390/en5125372>
- De Tissera, S., Köpke, M., Simpson, S. D., Humphreys, C., Minton, N. P., & Dürre, P. (2019). Syngas biorefinery and syngas utilization. *En Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. https://doi.org/10.1007/10_2017_5
- Demler, M., & Weuster-Botz, D. (2011). Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*. *En Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1002/bit.22935>
- Diender, M., Stams, A. J. M., & Sousa, D. Z. (2016). Production of medium-chain fatty acids and higher alcohols by a synthetic co-culture grown on carbon monoxide or syngas. *Biotechnology for Biofuels*. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0495-0>



- ECHA. (s. f.). *Ethanol*. Recuperado 23 de abril de 2022, de https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.000.526?_disssubsinfo_WAR_disssubsinfoportlet_backURL=https%3A%2F%2Fecha.europa.eu%2Fes%2Fhome%3Fp_p_id%3Ddisssimplesearchhomepage_WAR_dissearchportlet%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3D
- European Commission. (2021). *EU Biorefinery Outlook to 2030*. <https://op.europa.eu/es/publication-detail/-/publication/7223cd2e-bf5b-11eb-a925-01aa75ed71a1>
- Fernandez, L. (2021). *Production capacity of acetic acid worldwide in 2018 and 2023*. <https://www.statista.com/statistics/1063215/acetic-acid-production-capacity-globally/#:~:text=In 2018%2C the global production,metric tons of acetic acid.>
- Freda, C., Nanna, F., Villone, A., Barisano, D., Brandani, S., & Cornacchia, G. (2019). Air gasification of digestate and its co-gasification with residual biomass in a pilot scale rotary kiln. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s40095-019-0310-3>
- Grim, R. G., To, A. T., Farberow, C. A., Hensley, J. E., Ruddy, D. A., & Schaidle, J. A. (2019). Growing the Bioeconomy through Catalysis: A Review of Recent Advancements in the Production of Fuels and Chemicals from Syngas-Derived Oxygenates. *ACS Catalysis*. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b03945>
- GSTC. (s. f.). *Global Syngas*. <https://globalsyngas.org/>
- IEA Bioenergy. (s. f.). *Biomass Gasification*. Recuperado 3 de mayo de 2022, de <http://www.ieatask33.org/>
- Judex, J. W., Gaiffi, M., & Burgbacher, H. C. (2012). Gasification of dried sewage sludge: Status of the demonstration and the pilot plant. *Waste Management*. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.12.023>
- Liew, F. M., Martin, M. E., Tappel, R. C., Heijstra, B. D., Mihalcea, C., & Köpke, M. (2016). Gas Fermentation-A flexible platform for commercial scale production of low-carbon-fuels and chemicals from waste and renewable feedstocks. En *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00694>



- Lindorfer, J., Lettner, M., Hesser, F., Fazeni, K., Rosenfeld, D., Annevelink, B., & Mandl, M. (2019). Technical, economic and environmental assessment of biorefinery concepts. En *IEA Bioenergy task 42*.
- Molitor, B., Richter, H., Martin, M. E., Jensen, R. O., Juminaga, A., Mihalcea, C., & Angenent, L. T. (2016). Carbon recovery by fermentation of CO-rich off gases - Turning steel mills into biorefineries. En *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.094>
- Mondal, P., Dang, G. S., & Garg, M. O. (2011). Syngas production through gasification and cleanup for downstream applications - Recent developments. En *Fuel Processing Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2011.03.021>
- NETL. (s. f.). *National Energy Technology Laboratory*. Recuperado 14 de marzo de 2022, de <https://netl.doe.gov/>
- Niu, M., Huang, Y., Jin, B., & Wang, X. (2013). Simulation of syngas production from municipal solid waste gasification in a bubbling fluidized bed using aspen plus. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1021/ie400026b>
- Sander, R. (2015). Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmospheric Chemistry and Physics*. <https://doi.org/10.5194/acp-15-4399-2015>
- Saroha, S., Mondal, P., & Tandon, D. (2017). Downstream Processing of Heavier Petroleum Fractions. En *Sustainable Utilization of Natural Resources*. <https://doi.org/10.1201/9781315153292-3>
- Schiel-Bengelsdorf, B., & Dürre, P. (2012). Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. En *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.043>
- Schuchmann, K., & Müller, V. (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: A model for energy conservation in acetogenic bacteria. En *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3365>
- Schuchmann, K., & Müller, V. (2016). Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00882-16>



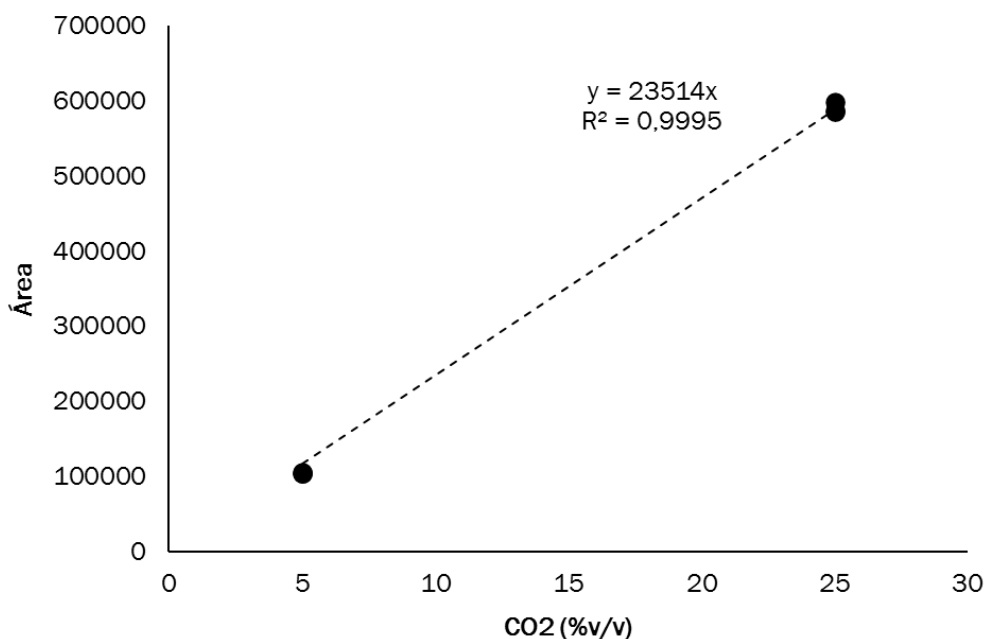
Sikarwar, V. S., & Zhao, M. (2017). Biomass Gasification. En *Encyclopedia of Sustainable Technologies*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10533-0>

Sikarwar, V. S., Zhao, M., Clough, P., Yao, J., Zhong, X., Memon, M. Z., Shah, N., Anthony, E. J., & Fennell, P. S. (2016). An overview of advances in biomass gasification. En *Energy and Environmental Science*. <https://doi.org/10.1039/c6ee00935b>

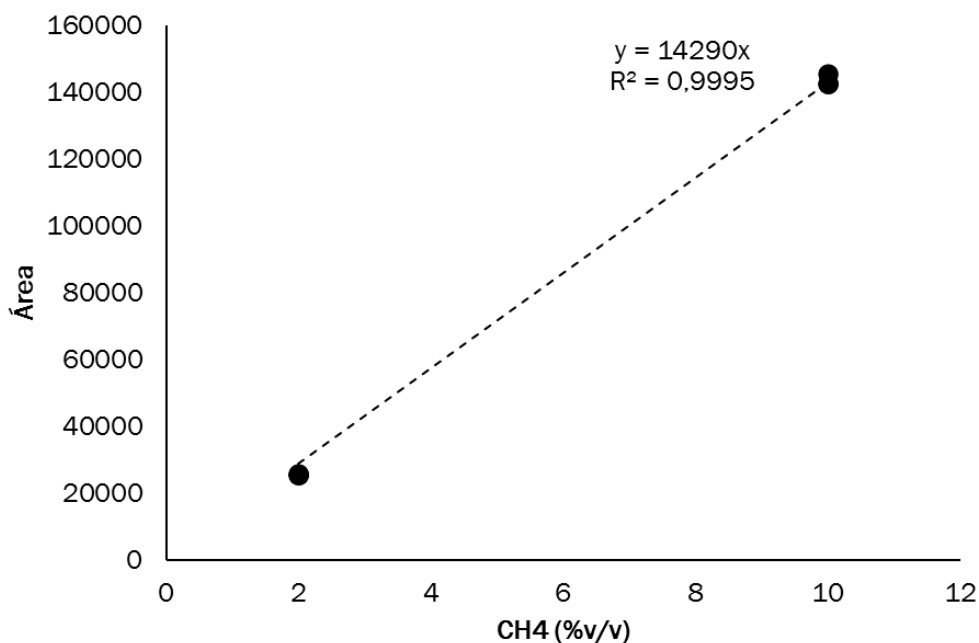
Yoneda, N., Kusano, S., Yasui, M., Pujado, P., & Wilcher, S. (2001). Recent advances in processes and catalysts for the production of acetic acid. *Applied Catalysis A: General*. [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(01\)00800-6](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(01)00800-6)

ANEXOS

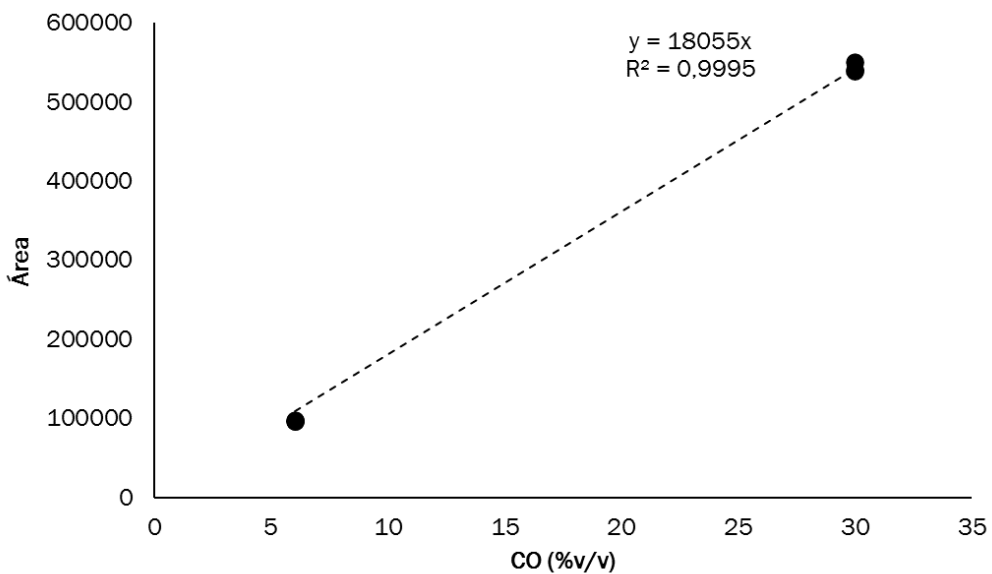
ANEXO I: Curvas de calibrado del TCD Bruker



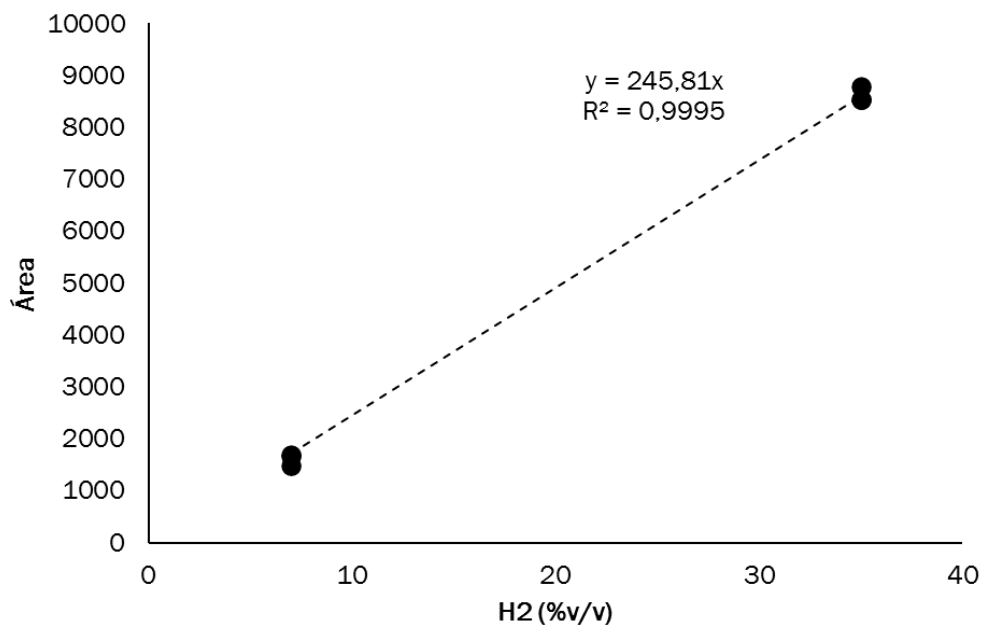
Gráfica A1. Curva de calibrado para el CO₂



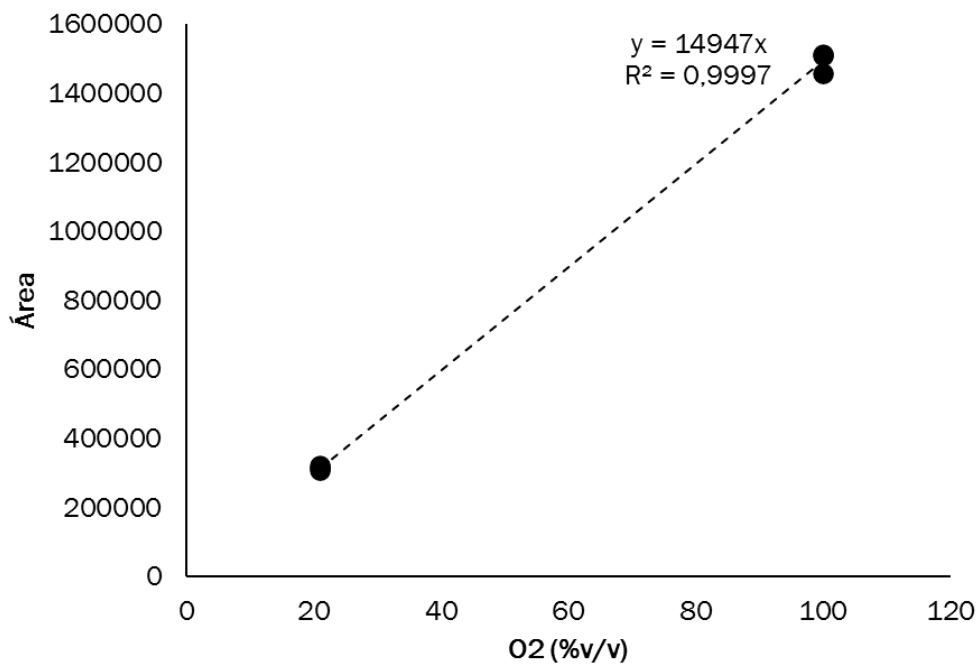
Gráfica A2. Curva de calibrado para el CH₄



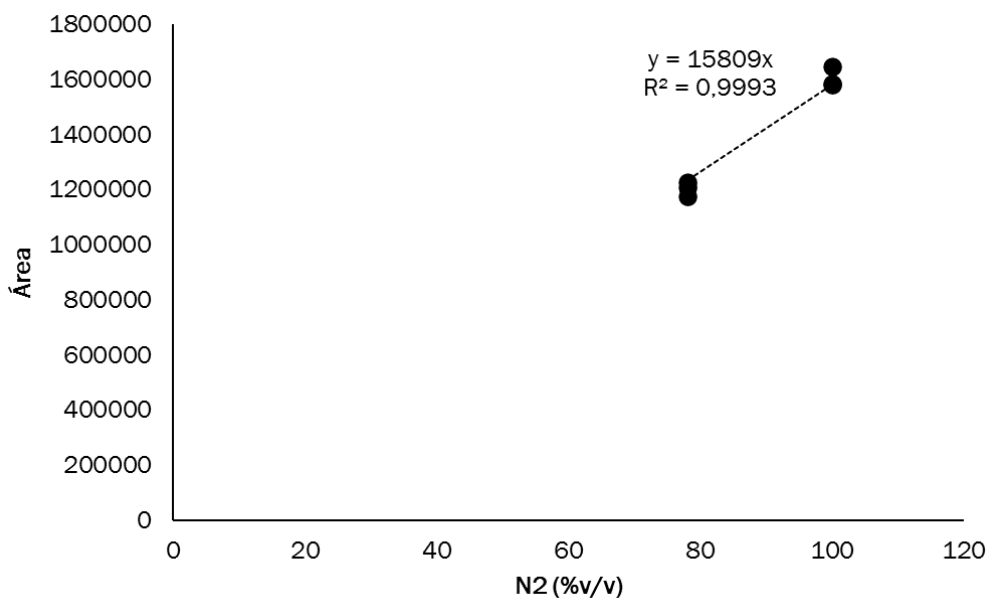
Gráfica A3. Curva de calibrado para el CO



Gráfica A4. Curva de calibrado para el H₂

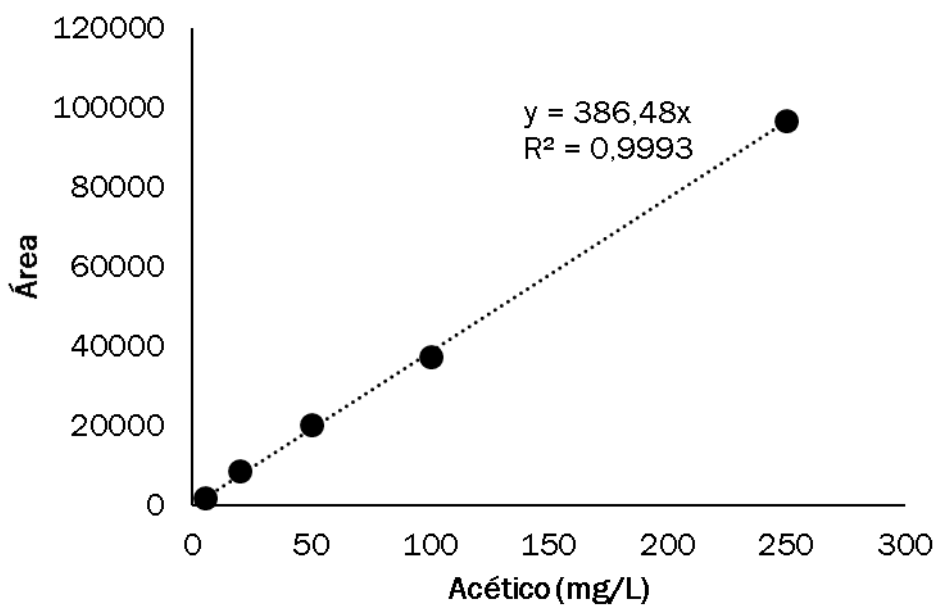


Gráfica A5. Curva de calibrado para el O₂

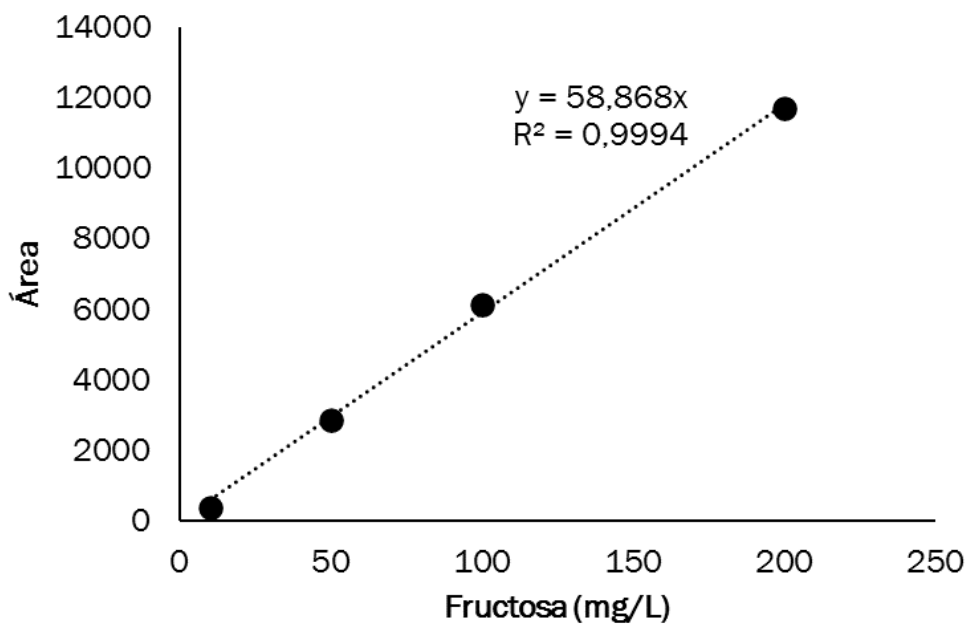


Gráfica A6. Curva de calibrado para el N₂

ANEXO II: Curvas de calibrado del HPLC-IC

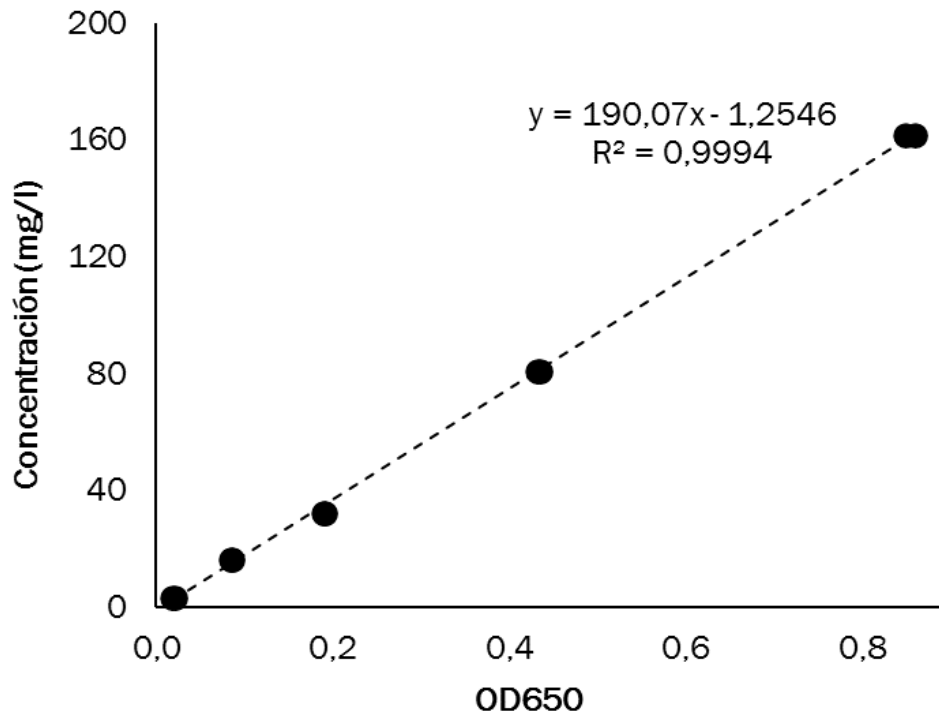


Gráfica A7. Curva de calibrado para el ácido acético en UV-VIS a 214 nm



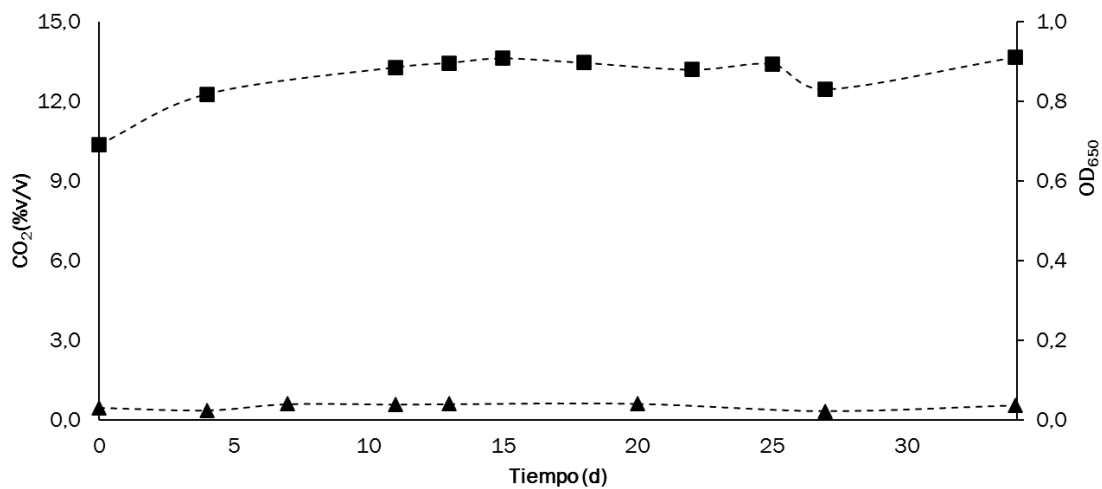
Gráfica A8. Curva de calibrado para la fructosa en IR

ANEXO III: Curvas de calibrado del espectrofotómetro



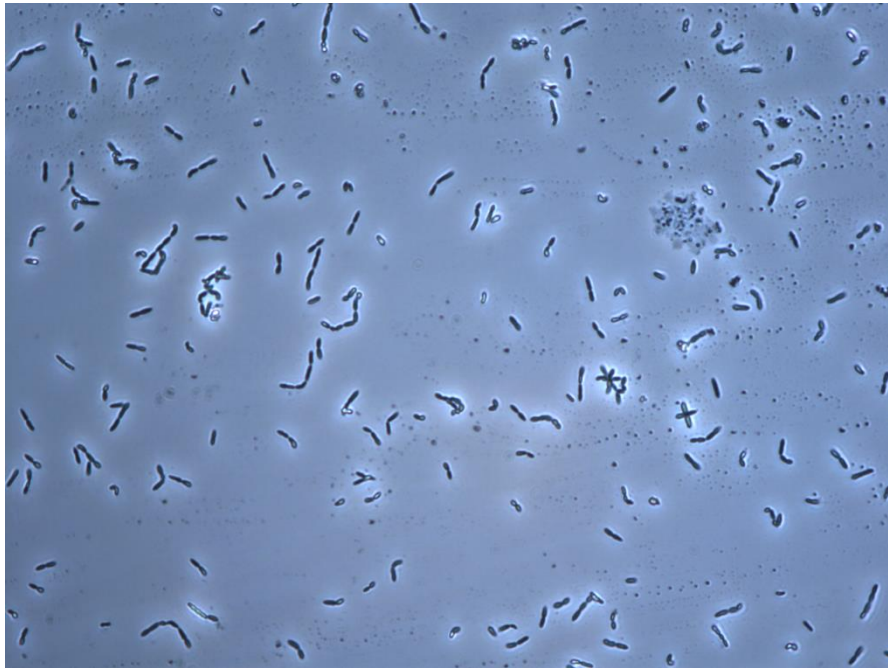
Gráfica A9. Curva de calibrado de la concentración de sólidos

ANEXO IV: Resultados del control negativo



Gráfica A10. Evolución de la concentración de CO₂ (■) y de la OD₆₅₀ (▲) en la botella de control negativo del primer ensayo

ANEXO V: *Acetobacterium woodii* vista al microscopio



Gráfica A11. Imagen de *Acetobacterium woodii* empleando microscopía de contraste de fases con el objetivo 40x