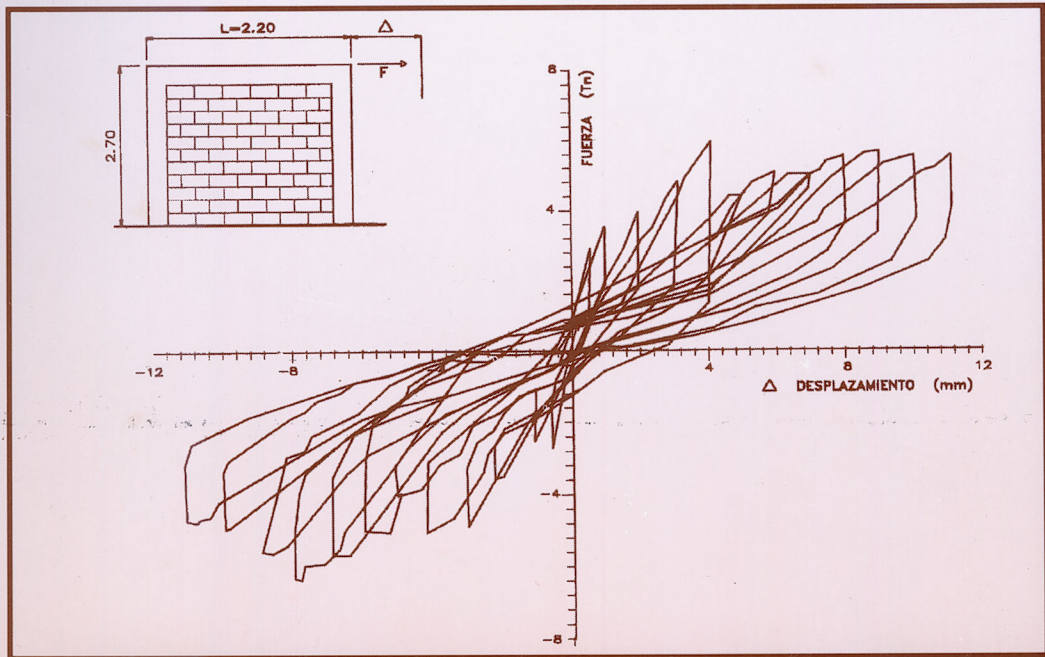


# Ingeniería

Revista de la Universidad de Costa Rica  
ENERO/JUNIO 1995 VOLUMEN 5 N° 1



# "Cinética de la producción de Acetona-Butanol utilizando el *Clostridium acetobutylicum*"

Molina, C.M.  
Hernández, R.J.  
Jiménez, U.F.

## RESUMEN

Se estudió el comportamiento cinético de la fermentación acetobutílica, utilizando el *Clostridium acetobutylicum* NRRL-B594. Se empleó almidón de banana al 2% como sustrato, condiciones de pH inicial de 5,5 y temperatura constante de 36°C. La relación de butanol, acetona y etanol obtenida fue de 9:3:2 al cabo de 96 horas de proceso.

## SUMMARY

We studied the kinetic behaviour of the acetobutyric fermentation with strain NRRL-B594 of *Clostridium acetobutylicum*. We used 2% banana starch as a substrate, initial pH was 5.5, and the temperature was kept constant at 36°C. The proportion of butanol, acetone and ethanol was 9:3:2 after 96 hours.

## INTRODUCCION

Se conoce como fermentación acetobutílica, aquella fermentación en la cual los productos principales son la acetona, el butanol y el etanol. El microorganismo más conocido para esta fermentación es el *Clostridium acetobutylicum* [9].

Este microorganismo es anaerobio estricto [1,2], y tiene la capacidad de metabolizar azúcares, almidones y materias ricas en carbohidratos para producir, principalmente, las sustancias antes mencionadas [11,12,13] y dos metabolitos intermedios como son: los ácidos acético y butírico.

El butanol, como producto de la fermentación, fue descubierto por Schardinger en 1905 [6,8]. Este es utilizado en la fabricación de esmaltes y sus derivados que son empleados en otros procesos industriales, entre ellos, la producción de caucho mediante polimerización de butadieno [8,10]. El butanol compite con el etanol en la formulación de gasohol y como aditivo para el diesel.

La acetona es muy utilizada como solvente, en la fabricación de seda, cueros artificiales, recubrimientos, pegamentos, etc.

En las fermentaciones industriales, la fuente de carbono que se utilice como sustrato debe proporcionar la máxima producción de biomasa o producto de interés, permitir la mayor velocidad de formación del producto, ser de bajo costo, buena calidad y alta disponibilidad [3].

En el caso de la fermentación acetobutílica, las fuentes de carbono y energía más comunes son: melaza de caña y almidones. La fuente de nitrógeno no parece afectar mucho el rendimiento de la fermentación y los clostridios pueden utilizar proteínas, peptonas o fuentes inorgánicas de nitrógeno para sus requerimientos nutricionales [14]. Cuando se utiliza glucosa en altas concentraciones y a un pH bajo, se obtienen rendimientos muy altos de solventes [4,8,9]. Al utilizar harina de maíz, a concentraciones de 3-10%, los rendimientos han sido buenos.

El *Clostridium acetobutylicum* utiliza el almidón como sustrato, pues posee alfa-amilasas y amiloglucosidasas. Una vez convertido el almidón a glucosa, la ruta metabólica seguida hasta los productos deseados se muestra en la figura 1.

La cinética de este proceso es afectada por la temperatura, pues la bacteria es mesofílica con una temperatura de crecimiento óptima que oscila entre 30 y 40 grados Celsius.

El pH afecta también el proceso. A pH alcalino se producen, principalmente, los ácidos acético y butírico y a pH cercanos a 4.5 se favorece la producción de los solventes de interés [4,5].

La producción de solventes se ve también afectada por la toxicidad misma de los productos de la fermentación. Concentraciones de 6, 8 y 11 g/L de ácido acético, ácido butírico y butanol respectivamente, inhiben el crecimiento del clostridio.

## SECCION EXPERIMENTAL

### Materiales y Métodos

#### a) Microorganismo.

Se utilizó el *Clostridium acetobutylicum* NRRL-B594. El inóculo de los fermentadores fue preparado de la siguiente manera:

1) la bacteria fue sembrada en un caldo de "carne picada" e incubada por 48 horas a 30°C, bajo condiciones de anaerobiosis (Holdeman, L.V. y Moore, W.E.C. Anaerobe Laboratory Manual. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. 1975.)

2) luego, se inoculó un erlenmeyer con 100 mL del medio por utilizar en el fermentador y se incubó a 30°C por 14 horas

3) finalmente, el bioreactor fue inoculado con el 10% del volumen por fermentar.

El medio de cultivo utilizado para las fermentaciones es el que se muestra en el Cuadro 1. La fuente de carbono y energía la constituye el almidón de banano. La harina de banano empleada contiene un 92,9% de carbohidratos, expresados como almidón.

CUADRO 1. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

COMPOSICIÓN	CANTIDAD (g/L)
Harina de banano	20,0
Extracto de levadura	1,0
Triptona	2,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
FeSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,02
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0002
ZnSO <sub>4</sub>	0,015
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5
NaCl	0,015
NaMoO <sub>4</sub>	0,015

pH final = 5,5 ± 0,1

### b) Equipo Experimental

En la figura 2, se muestra un esquema del equipo experimental utilizado durante el desarrollo de este trabajo. El biorreactor (F1) tiene un volumen efectivo de 800 mL y está provisto de los puertos necesarios para el control de temperatura, inoculación, salida de gases y muestreo. El fermentador y los accesorios fueron esterilizados junto con el medio de cultivo.

### c) Métodos de Análisis

1.- Determinación de solventes: Las muestras del caldo de fermentación fueron "centrifugadas" y luego pasadas por filtros de acetato de celulosa de 0,22 mm para eliminar las células. A un mililitro de filtrado se le adicionó 50 mL de ácido propiónico 0,5M, como estándar interno y se reguló el pH a 2,0, con ácido sulfúrico al 50% v/v.

Tres microlitros de la muestra fueron inyectados a un cromatógrafo de gases (Shimadzu CR-3A), equipado con una columna empacada con Chromosorb 101 (80/100).

Se utilizó nitrógeno como gas portador a un flujo de 30 mL/min. la temperatura del inyector fue de 200°C, el horno se mantuvo isotérmico a 185°C y la temperatura del detector fue de 250°C. Los tiempos de retención del acetato, etanol y butanol fueron de 2.517, 3.407 y 6,170 minutos repectivamente.

2.- Determinación de glucosa residual: La glucosa residual se determinó por el método de glucosa

oxidasa, según instrucciones de la compañía Ticolab.

## RESULTADOS

En la figura 3, se muestran las curvas de variación de sustrato y pH. Durante las primeras 24h, el pH desciende de 5,5 a 4,5, debido a que es durante este tiempo (fase acidogénica) que se producen los ácidos acético y butírico tal y como se muestra en la figura 1.

Luego, se observa una segunda etapa donde el pH aumenta paulatinamente y se inicia la fase solventogénica, en la que parte de los ácidos son transformados en acetona, etanol y butanol.

Por otro lado, la concentración de sustrato presenta un descenso muy marcado durante las primeras 24-30h. En esta etapa, el cultivo está en fase de crecimiento logarítmico y se llega, tanto al máximo de producción de masa celular, como de los productos ácidos.

A partir de las 30h, la tasa de consumo de sustrato disminuye sensiblemente, el cultivo se encuentra en fase estacionaria y la tasa de crecimiento es prácticamente cero. Es en esta segunda etapa que la producción de solventes llega a un máximo.

La producción de solventes se puede observar en la figura 4. La fase solventogénica se inicia aproximadamente a las 24-30h y finaliza a las 96h. En este momento, la relación de solventes es de 4,5:1,5:1 valores muy semejantes a los ya reportados en la literatura [13].

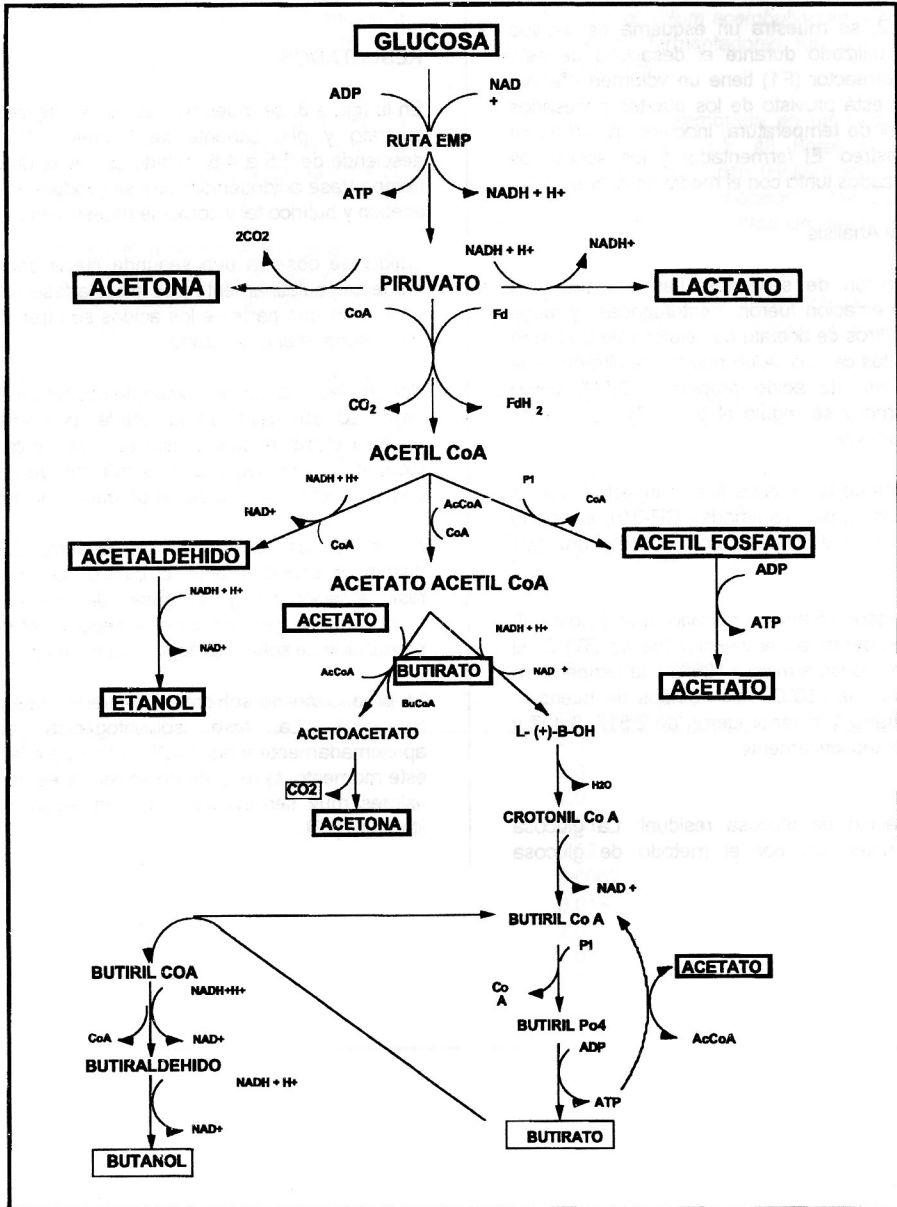


FIGURA 1: RUTA METABOLICA EMPLEADA POR EL CL. ACETOBUTYLICUM PARA PRODUCIR ACETONA BUTANOL



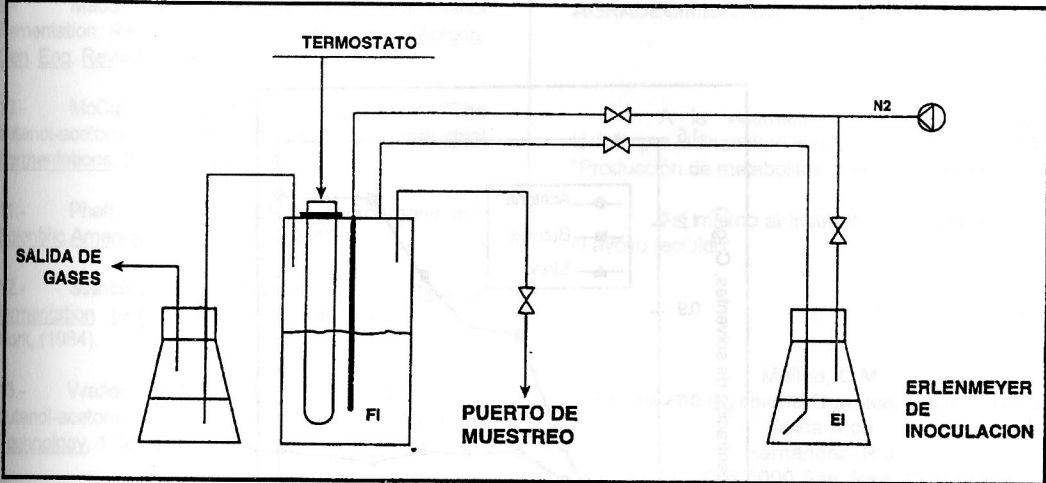


FIGURA 2: SISTEMA DE FERMENTACION EMPLEADO

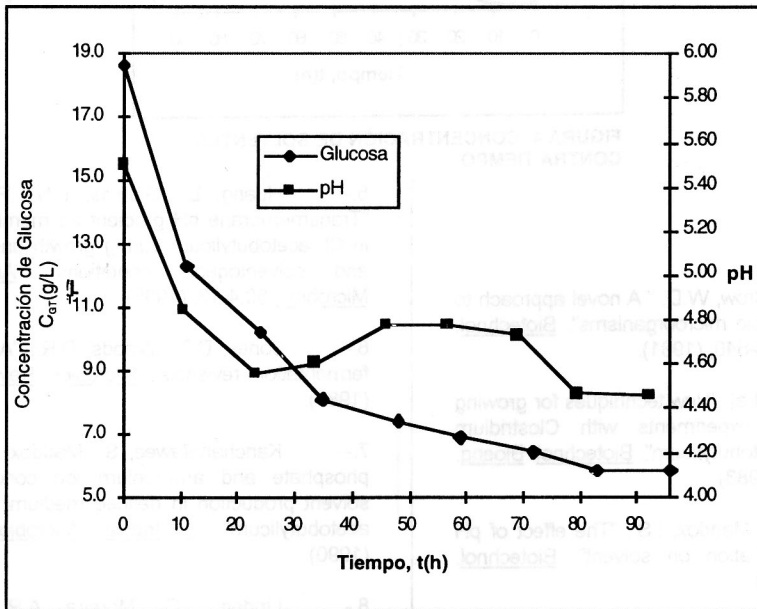


FIGURA 3: CINÉTICA DE VARIACIÓN DE LA GLUCOSA

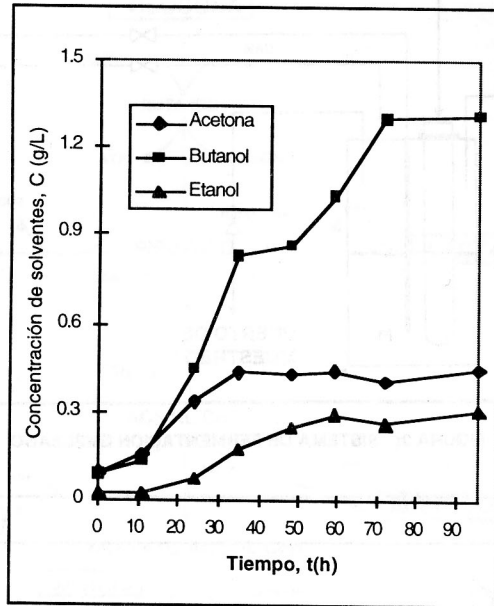


FIGURA 4: CONCENTRACIÓN DE SOLVENTES CONTRA TIEMPO

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adler, H.I., Crow, W.D. "A novel approach to the growth of anaerobic microorganisms". Biotechnol. Bioeng. Symp. 11:533-540, (1981).
- 2.- Adler, H.I., et al. "New techniques for growing anaerobic bacteria: experiments with *Clostridium butyricum* and *Cl. acetobutylicum*". Biotechnol. Bioeng. Symp. 13:153-161, (1983).
- 3.- Ennis, B.M., Maddox, I.S., "The effect of pH and lactose concentration on solvent". Biotechnol. Bioeng., 29:3-8 (1987).
- 4.- Haggstrom, L., "Acetone-Butanol fermentation and its variants". Biotechnol. Adv., 3:13-28, (1985).
- 5.- Huang, L., Gibbins, L.N., Forberg, C.W., "Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Cl. acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions". Appl. Environ. Microbiol., 50:4-13, (1985).
- 6.- Jones, D.T., Woods, D.R., "Acetone-butanol fermentation revisited". Microbiol. Rev., 50:484-524, (1986).
- 7.- Kanchanatawee, S., Maddox, J.S. "Effect of phosphate and ammonium ion concentrations on solvent production in defined medium by *Clostridium acetobutylicum*". J. Indust. Microbiol., 5:277-282, (1990).
- 8.- Linden, J.C., Moreira, A.R., Lenz, T.G., "Acetone and Butanol", Comprehensive Biotechnology, 3:915-931, (1985).

- 9.- Maddox, I.S., "The acetone-butanol-ethanol fermentation: Recent progress in technology", Biotech. Gen. Eng. Review, 7:189-220, (1989).
- 10.- McCutchan, W.N., Hickey, R.J., "The butanol-acetone fermentations", Industrial Fermentations, 2:347-388, (1954).
- 11.- Phaff, H.J., "Industrial Microorganisms", Scientific American, 245:67-69, (1981).
- 12.- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Principles of fermentation technology. Pergamon Press, Nueva York, (1984).
- 13.- Walton, M.T., Marin, J.L. "Production of butanol-acetone by fermentation". Microbial Technology, 1:187-209, (1979).
- 14.- Welsh, F.W., Williams, R.E., Veliky, I.A., "A note on the effect of source on growth of on solvent production by *Clostridium acetobutylicum*". J. Appl. Bacteriol., 61:413-419, (1986).

#### AGRADECIMIENTOS:

A la vicerrectoría de Investigación de la U.C.R. por el financiamiento en el proyecto 325-93-201 "Producción de metabolitos mediante fermentación".

Así mismo al Instituto de Investigaciones por el apoyo recibido.

Molina, C.M.  
Escuela de Ingeniería Química, Universidad de  
Costa Rica.  
Hernández, R.J.  
Apdo. 7604-1000 San José, Costa Rica.  
Jiménez-Ulate, F.  
Facultad de Microbiología, Universidad de Costa  
Rica.