

Tesis de Posgrado

Estudio de los productos de fermentación de algunos fermentos butírico-butílicos

Hahn, Vera

1950

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Hahn, Vera. (1950). Estudio de los productos de fermentación de algunos fermentos butírico-butílicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0643_Hahn.pdf

Cita tipo Chicago:

Hahn, Vera. "Estudio de los productos de fermentación de algunos fermentos butírico-butílicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1950.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0643_Hahn.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUIMICA

ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACION
DE ALGUNOS FERMENTOS BUTIRICO - BUTILICOS

T E S I S
presentada para optar al título de
DOCTORA EN QUIMICA
por

V E R A H A H N

Tesis: 673

- 1950 -
Año del Libertador General San Martín

FCFBA

A mis padres y al Doctor Alfredo A. Sordelli,
cuyo apoyo moral y consejos técnicos hicieron
posible la realización de este trabajo, dedi-
co mi tesis.

FOFNA

Agradezco al Ing. Agr. Santos Soriano el haber dirigido en un comienzo mi trabajo y el haberme facilitado la mayor parte de las cepas a estudiar.

Asimismo quiero expresar mi reconocimiento a las numerosas personas que me han sido de ayuda, ya sea con consejos y datos, ya sea con material y drogas, a lo largo de este trabajo. En especial agradezco la colaboración del personal del Taller de Vidrio de esta Facultad, donde han sido construídos los diversos aparatos y objetos que he necesitado.

FOFNA

Definición del grupo de organismos en estudio

Entre las muy numerosas especies del género *Clostridium* descritas en la literatura se encuentran varias que, durante la fermentación de ciertos hidratos de carbono, producen ácido butírico y alcohol butílico, al mismo tiempo que dan ácido acético, alcohol etílico, acetona, alcohol isopropílico, anhídrido carbónico e hidrógeno.

No nos ocuparemos aquí de los clostridios patógenos que también a veces pueden producir algo de ácido butírico y butanol, sino de clostridios no patógenos, con frecuencia presentes en los suelos, capaces de dar esos productos en cantidades apreciables.

Todos los microorganismos que nos interesan tienen una propiedad común: antes de esporular almacenan almidón, por lo cual los clostridios presentan granulaciones azules en su interior al ser teñidos con iodo, o sea dan la llamada reacción de la granulosa.

Existen también plectridios granulosa positivos, pero son poco fermentadores y muy proteolíticos. No los incluimos por eso en el grupo que estudiamos, del que son por otra parte perfectamente diferenciables por su morfología: en efecto tales plectridios presentan bastones muy delgados con una espora muy gruesa en un extremo, mientras que, en los gérmenes que nos ocupan, aún cuando se observan a veces esporas terminales o subterminales, éstas se hallan siempre dentro de un bastón de tipo clostridio.

En resumen se trata de estudiar bastones anaerobios, esporulados, con formas clostridiales, no patógenos, que producen ácido butírico y butanol al fermentar hidratos de carbono y que dan la reacción de la granulosa.

Desde que Pasteur /1/ en 1862 encuentra butanol como producto directo de la fermentación, comienzan a aparecer en la literatura artículos en que se describen, bajo los nombres más heterogéneos, cepas que producen fermentación butírico-butílica. Así encontramos el Bacillus butylicus de Fitz /2/, el Bacillus amylobacter de Van Tieghem /3/, el Clostridium butyricum de Prazmowski /4/, los Bacillus amylobacter I, II y III de Gruber /5/, el Bacille amylozime de Perdrix /6/, el Bacillus butyricus de Botkin /7/, el Bacillus orthobutylicus de Grimbert /8/, el Granulobacter butylicum de Beijerinck /9/, el Amylobacter butylicus de Duclaux /10/, el Granulobacillus saccharobutylicus mobilis non-liquefaciens de Grassberger y Schattenfroh /11/, el Clostridium pasteurianum de Winogradsky /12/, el Bacillus multifermentans tenalbus de Stoddard /13/, el Bacillus venturelli de Tomasi /14/, el Clostridium beijerinckii de Donker /15/, el Clostridium viscifaciens de Sherman y Erb /16/, el Clostridium carbonei de Arnaudi /17/, y otros. Algunas de estas cepas no están bien descritas y varias se han perdido.

En los años que precedieron a la primera guerra mundial surgió la necesidad de obtener caucho sintético por polimerización del butadieno: este último se prepara por cloración y deshalogenación posterior del n-butanol, de donde vino la importancia de conseguir una buena fermentación butílica en la industria. Se realizaron muchos estudios al respecto y en 1912 Weizmann aisló un microorganismo que daba, en la fermentación de diversos almidones, buenos rendimientos en butanol y acetona. El organismo recibió por Speakman /18/ el nombre de Bacillus granulobacter pectino-

vorum, que luego fué cambiado a Clostridium acetobutylicum por McCoy, Fred, Peterson y Hastings /19/.

Con la guerra de 1914 surgió una gran demanda de acetona para explosivos y otros usos militares y después de la guerra se comenzó a usar el butanol en forma de acetato de butilo como disolvente para lacas de automóviles. La acetona es materia prima de varias importantes síntesis orgánicas e interviene en la fabricación de la seda artificial y de materias plásticas. Estos y otros muchos usos de tales solventes explican el gran interés que adquirió la obtención de los mismos por fermentación en la industria y los muchos artículos que se hallan publicados sobre este tema, aparte de una gran cantidad de patentes para la aplicación de las más variadas materias primas y de diversos procesos.

En nuestro estudio nos ocuparemos además de un grupo de microorganismos, también butírico-butílicos, cuya aparición en la literatura está relacionada sin embargo con otra actividad industrial: el enriado del lino. Como tales encontramos el organismo aislado por Friebes y descrito por Winogradsky en 1895 /20/, el Plectridium pectinovorum de Störmer /21/, el Granulobacter pectinovorum de Beijerinck y van Delden /22/, el Pectinobacter amylophilum de Makrinov /23/, el Bacillus felsineus de Carbone y Tombolato /24/, el Bacillus pectinovorum de Henneberg /25/, el Clostridium pectinovorum de Donker /15/, el Bacillus haumani de Soriano /26/. El Clostridium felsineum (Carbone y Tombolato) fué estudiado y descrito correctamente por Sordelli y Soriano /35/; también lo estudiaron Van der Lek /28/, Bergey et al. /29/ y McCoy y McClung /30/. Estos últimos autores describen también el Clostridium roseum, relacionado con los microorganismos anteriores, pero no indican si es enriador o no /31/.

Dada la aplicación práctica de varios organismos del grupo en estudio, la mayor parte de lo que se ha escrito sobre los mismos se refiere a las condiciones óptimas en que ha de realizarse la fermentación, a los diversos sustratos que se pueden emplear, a los requerimientos nutritivos de las bacterias en cuestión, a la manera de fortalecer los cultivos por "heat shocking", etc. Hay además una serie de estudios que tratan de aclarar el mecanismo enzimático de la fermentación en el caso más interesante del organismo acetobutílico. Pero existen relativamente pocos trabajos que se ocupen de la sistemática del grupo. Al principio no estaban aún muy perfeccionados los métodos de cultivo y de estudio de las propiedades bioquímicas de los anaerobios, de modo que no podemos hoy día estar seguros de que todos los cultivos antes citados fueran realmente anaerobios. Este hecho trae consigo ciertas complicaciones para la clasificación de los microorganismos descritos en la literatura. McCoy et al. /19/, en su trabajo sobre el organismo acetobutílico, fueron los que aprovecharon los adelantos en los métodos para anaerobios y probaron varios propios, haciendo un verdadero estudio sistemático de once cepas de distinto origen productoras de solventes, llegando a la conclusión de que todas ellas pertenecían a una misma especie, el Clostridium acetobutylicum (Weizmann).

En 1930 los mismos autores /32/ publicaron un análogo estudio sobre 33 microorganismos butíricos, que dan en la fermentación ácido butírico y acético pero no solventes: ellos dividen al grupo de los que llaman butíricos verdaderos en 3 subgrupos: 1. clostridios que no fermentan el almidón, del tipo del Cl. pasteurianum, 2. clostridios que fermentan el almidón, del tipo del Cl. saccharobutyricum y

3. plectridios que fermentan el almidón, pero tienen mayor actividad proteolítica y menor poder de fermentación que los anteriores.

En 1934 aparece un artículo de Langlykke, Peterson y McCoy /33/, continuación de los estudios citados, llevados a cabo en la Universidad de Wisconsin; el mismo se refiere al análisis cuantitativo de los productos de fermentación obtenidos con un grupo de 51 cultivos, que incluye, a más de los 33 butíricos del trabajo anterior, nuevas cepas butíricas, algunas acetobutílicas, un Cl. felsineum, un Cl. roseum y un Cl. multifermentans. Dado que las fermentaciones no se hacen en un sustrato de harina de maíz, que es el medio más comúnmente usado para estos gérmenes en el laboratorio y en la industria, sino en agua de levadura con glucosa, ya no resulta evidente por los productos de fermentación, según los datos de los autores citados, la división de los microorganismos en productores de ácidos solos y en productores de ácidos más solventes: al contrario, las cepas de verdaderos butíricos dan a menudo mejores rendimientos en solventes que las acetobutílicas y éstas, a su vez, figuran entre los mayores productores de ácidos.

Como demostración completa de que el Cl. acetobutylicum merece ser reconocido como especie aparte (cosa que aún no se había hecho en la edición de 1934 del Manual de Bergoy), McCoy y McClung /34/ publican en 1935 su estudio sobre las pruebas suerológicas realizadas con 22 cepas de Cl. acetobutylicum. Resulta evidente que todas ellas constituyen una sola entidad suerológica y que por otra parte están totalmente separadas de una serie de cepas butíricas elegidas al azar entre las mencionadas en la literatura.

En el mismo año McCoy y McClung publican dos artículos más: en el primero /31/ describen el Clostridium roseum

aislado por Sir F. Andrews y estudiado por ellos comparativamente con el Cl. acetobutylicum y el Cl. felsineum; en el segundo /30/ completan la diferenciación entre estas tres especies con pruebas de aglutinación.

Como resultado de la vasta bibliografía existente, en la edición de 1948 del Manual de Bergey figuran entre las 61 especies del género *Clostridium* 10 especies granulosa positivas, cuyos datos útiles para la clasificación sacados del manual hemos resumido en la tabla 1. Se puede observar que tales datos no son completos y que la clasificación en base a los mismos no es fácil de hacer.

Especie	Granulosa	Espora	Novidad	Gram	Pigmento	Ligación Gelatina	Hemólisis	Leche con tornasol	Temperatura óptima °C	Indol	NO ₃ → NO ₂	Formación de NH ₃	Fijación de NH ₃	Entramiento Acetilmetil- carbinol	Fermentación de								Productos de fermentación
															Almidón	Pectina	Celulosa	Glucosa	Lactosa	Mantita	Glicerina	Inulina	
1. Clostridium butyricum	+	central o sub-terminal	+	+	-	-	-	ACR turbul.	37	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ácidos orgánicos, butanol, etanol, acetona, isoprop.		
1a. Clostridium beijerinckii	+	central o sub-terminal	+	±	-	-	-	ACR turbul.	37	-	-												
1b. Clostridium pasteurianum	+	central o sub-terminal	+	±	-	-	-	ACR turbul.	37	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
1c. Clostridium multifementans	+	central o sub-terminal	+	±	-	-	+	ACR turbul.	37	-	+												
5. Clostridium visciifaciens	+	central o sub-terminal	+	-	-	-	-	A	36	-	+	de heptona									butanol, isopropanol, acetona		
11. Clostridium acetobutylicum	+	central o sub-terminal	+	±	-	-	-	ACR	37	-	-	de NO ₂		+	+	+	+	+	+	+	butanol, etanol, acetona, butírico, acético, H ₂ , CO ₂		
49. Clostridium venturelli	+	central o sub-terminal	+	-	rosado	-	-	C	20	-	-										butanol, isobutanol, propanol, acetona, amílico, acético		
50. Clostridium roseum	+	central o sub-terminal	+	±	rojo → púrpura en el aire	+	-	CR turbul.	37	-	-	de NO ₃ y NO ₂									butanol, etanol, acetona, butírico, acético, H ₂ , CO ₂		
52. Clostridium felsineum	+	central o sub-terminal	+	±	anaranjado	+	-	ACR	37	-	-	de NO ₃ y NO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	etanol, butírico, H ₂ , CO ₂		
53. Clostridium carbonei	+	terminal	-	+	rojo	-	-	AC	37	-	-		-	±	±	±	±	±	±	±	etanol, butírico, H ₂ , CO ₂ , CH ₄		

T A B L A 1

Principales datos para la clasificación de los clostridios granulosa positivos (extraídos de Bergey, p. 763-827, ed. 1948)

Objeto del presente trabajo

Los análisis de los productos de fermentación de los anaerobios butírico-butílicos realizados en Wisconsin y citados anteriormente /35/ no sólo no indican una buena clasificación de los microorganismos del grupo en cuestión, sino que invalidan hasta cierto punto la distinción ya existente entre los productores de solventes y los productores de ácidos. En efecto los primeros dan, en el medio de cultivo usado por Langlykke y sus colaboradores, cantidades grandes de ácidos y pocos solventes; por otra parte hay cepas butíricas que dan muchos solventes; en particular, hay cepas tanto del tipo del Cl. pasteurianum como del Cl. saccharobutyricus que producen alcohol isopropílico, mientras que otras de ambos tipos no lo dan. Además, en el agua de levadura con agregado de glucosa que usan esos autores, muchos de los gérmenes fermentan menos del 50 % del azúcar presente, con lo cual la producción de solventes es necesariamente pequeña y los análisis cuantitativos se vuelven menos exactos: es muy posible que, por ejemplo, no se lleguen a apreciar muy pequeñas cantidades de isopropanol en el mosto poco fermentado.

A pesar de todos estos inconvenientes, parece razonable pensar que, análogamente a como se han podido reunir en una sola entidad las varias cepas de organismos acetobutílicos, debieran poderse agrupar en unas pocas especies las muchas cepas de anaerobios butíricos que se conocen.

De ahí que en un comienzo nuestro trabajo tratara de la posibilidad de clasificar a los anaerobios butírico-butílicos, fundada en el análisis cuantitativo de sus productos de fermentación en diversos medios de cultivo y en algunas

propiedades bioquímicas importantes para este grupo de gérmenes.

Se decidió estudiar las siguientes propiedades que, de acuerdo a las citas bibliográficas, parecían permitir alguna diferenciación entre los diversos gérmenes del grupo:

- a. morfología
- b. reacción de la granulosa
- c. licuación de la gelatina
- d. formación de octilmetilcarbinol
- e. enriado
- f. ataque del almidón.

Ademas se debían determinar cuantitativamente:

1. azúcar residual
2. alcohol butílico
3. alcohol etílico
4. acetona
5. alcohol isopropílico
6. pH
7. acidez total
8. ácido butírico
9. ácido acético.

Posteriormente se pudo apreciar que la envergadura de este trabajo sobrepasaba nuestras posibilidades experimentales. Por lo tanto nos limitamos a estudiar los métodos químicos y microbiológicos necesarios y a aplicarlos a unos pocos cultivos representativos entre los anaerobios butírico-butílicos, como un primer intento para lograr un mejor conocimiento de la asociación de las propiedades fermentativas con otras (morfológicas, bioquímicas, etc.), para poderlas emplear luego como base de una mejor diferenciación de las especies del grupo.

Descripción de las cepas estudiadas y su origen

- Cepa "87" procedente de la National Collection of Type Cultures (Lister Inst., London); está rotulada como Clostridium granulobacter pectinovorum Weizman.
- Cepa "181" posiblemente procedente de Delft (?); está rotulada como Clostridium beijerinckii.
- Cepa "179" procedente del Laboratorio de Příbram, Viena; está rotulada como Clostridium butylicum.
- Cepa "180" posiblemente originaria de Delft (?); está rotulada como Clostridium acetobutylicum.
- Cepa "1-1" es el Clostridium felsineum aislado de un preparado de "Felsinozima" obtenido de Italia y estudiado en 1928 por Sordelli y Soriano /35/.
- Cepa "4-2" es un Clostridium felsineum aislado por Soriano de una muestra de lino enriado en el laboratorio, que da colonias anaranjadas en agar /36/.
- Cepa "4-1" es otro Clostridium felsineum aislado por Soriano conjuntamente con el anterior, pero que da colonias blancas en agar /36/.

Las siete cepas anteriores fueron recibidas de la Colección microbiana de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires, por intermedio del Ing. Agr. Santos Soriano.

Además se estudiaron las cepas siguientes:

- Cepa "D" recibida del Dr. A.F. Langlykke; está rotulada como Clostridium acetobutylicum. McCoy y McClung /34/ indican que es el Clostridium acetonigenum (Speakman) Donker, presentado en 1926 por Kluyver a la American Type Culture Collection, en la cual figura bajo el N° 862.
- Cepa "B-8-3" recibida del Instituto de Microbiología Agrícola del Ministerio de Agricultura de la Nación; está rotulada como Clostridium acetobutylicum, cepa W de Wisconsin; McCoy y McClung /34/ indican que se trata del mal llamado Clostridium butyricum Prazmowski, presentado por Weyer en 1926 y existente en la A.T.C.C. bajo el N° 824.

Sin pretender establecer un sistema de clasificación de las bacterias butírico-butílicas y tan sólo para simplificar la compilación de los datos obtenidos en el curso del trabajo y para utilizar de algún modo dichos datos, hemos designado con el nombre de tipos a nombres ya usados en la literatura por otros autores. Así designamos a las cepas 87 y 181 como del tipo del Clostridium pasteurianum y a las cepas 179 y 180 como del tipo del Clostridium saccharobutyricum, por ser cepas que no atacan el almidón las primeras y cepas que lo atacan las segundas.

Nos han guiado en la elección de esos nombres ciertas propiedades encontradas por nosotros que corresponden a algunas ya utilizadas por otros autores para fundamentar la creación del nombre con alcance taxonómico. En nuestro caso esa designación no tiene por el contrario sentido ni intención taxonómicos algunos.

Métodos bacteriológicosa. Estudio de la morfología.

De los extendidos de los cultivos se hicieron coloraciones de Gram según la modificación de Kopeloff y Beerman, usando para decolorar una mezcla de acetona y alcohol etílico por partes iguales (Manual of Methods for Pure Culture Study, IV₄₆:8-10; III₄₃:14).

Los resultados de las observaciones, que fueron hechas sobre cultivos en medio de levadura, se dan a continuación.

Durante las primeras 48 horas hay en todas las cepas bastones Gram positivos más o menos abundantes, los que siempre aparecen más gruesos y derechos que los Gram negativos presentes en el mismo preparado. A veces forman cadenas o filamentos.

Los bastones Gram negativos jóvenes se tiñen con uniformidad por la fucsina, mientras que los viejos son granulados.

Se observa que las cepas 87, 181, 179 y 180 dan bastones Gram negativos gruesos; en las mismas los clostridios no son en general abultados, sino que sólo se notan por la tinción marcadamente bipolar de los bastones, quedando sin teñir la parte central con la espora. Las cepas 1-1, 4-2, 4-1, D y B-8-3 dan por el contrario bastones Gram negativos delgados, de largo variable; en las cepas 1-1 y 4-2 se han observado clostridios Gram negativos con espora subterminal Gram positiva; en las cepas 4-1, D y B-8-3 no se han visto clostridios en las coloraciones de Gram obtenidas de cultivos en medio de levadura.

Simultáneamente a las coloraciones de Gram, se hicieron siempre preparados coloreados por la técnica de Wirtz modi-

ficada por Schaeffer y Fulton dada en el Manual (IV₄₆:13), con objeto de observar la presencia de esporas sueltas. Fué necesario usar esta coloración, porque varias cepas esporulaban poco en el medio de levadura y por la coloración de Gram era difícil hallar las esporas en esos casos.

Se observó que la esporulación ya comenzaba el primer día en las cepas 87, 181, 179 y 180 (aún siendo más escasa en la 87); en las cepas 1-1 y 4-2 se hallaron esporas sueltas al segundo día; en las cepas 4-1, D y B-8-3 no se encontraron tampoco en cultivos de un mes. Estos resultados concuerdan con la observación de formas clostridiales.

b. Reacción de la granulosa.

Los primeros ensayos se hicieron agregando a un preparado sin secar una gota de Lugol, según indica el Manual (III₄₃:16). Sin embargo resultó incómodo este método ya que, si se observaba el preparado debajo de un cubreobjeto, el aumento resultaba insuficiente para observar bien los gránulos azules en los bastones y por otra parte, si se lo quería mirar con el lente de inmersión, había que dejarlo secar sin poderlo calentar para que no se volatilizara el iodo. El proceso era muy lento.

Mucho mejores resultados se obtuvieron por la técnica siguiente: el preparado se extiende y seca calentando suavemente y enseguida se coloca en una caja de Petri donde haya unos cristales de iodo. A los pocos minutos ya los vapores de iodo se han depositado abundantemente sobre el preparado. Entonces se lo observa con el objetivo de inmersión.

Todas las cepas estudiadas en este trabajo han resultado ser granulosa positivas. Sin embargo hubo que repetir a veces la observación, porque no en todos los preparados se podía ver claramente la tinción azul dada por el iodo: esto no pareció deberse a defecto de técnica, sino a la gran escasez de bastones granulosa positivos en algunos de los cultivos.

Se vió que el tipo de reacción difiere según la cepa: en la 87 y 181 los bastones se tiñen de un color azul uniforme, en su totalidad o parcialmente; en la 179 y 180 se hallan gránulos azules en general en los extremos de los bastones; en la 1-1, 4-2 y 4-1 se tiñe sólo un extremo del bastón abultado, quedando la espora subterminal sin teñir

(el bastón parece un cigarro a medio fumar) o bien los bastones algo abultados aparecen llenos de gránulos azules; estos últimos predominan en D y B-8-3.

En general se observa bien la reacción de la granulosa dentro de las primeras 48 horas de desarrollo, aunque a menudo subsiste después, siendo perfectamente visible en las cepas 87 y 181 al cabo de un mes. Estos dos cultivos presentan todavía otra particularidad con respecto a la reacción de la granulosa: el preparado sometido a los vapores de iodo se tiñe todo de azul violeta. Los demás cultivos en las mismas condiciones adquieren un color amarillo parduzco. Volveremos a mencionar esta particularidad al estudiar el ataque del almidón.

c. Licuación de la gelatina.

En base a las indicaciones de McCoy et al. /19/, se usó como medio de cultivo para estas observaciones gelatina glucosada preparada de la siguiente manera:

peptona	5,0 g.
extracto de carne	5,0 g.
glucosa	2,5 g.
gelatina	150 g.
agua destilada	1000 ml.

Se disuelven todos los ingredientes en el agua caliente y se ajusta el medio a pH 7,0; se clarifica con una clara de huevo batida a nieve, a vapor fluyente en el autoclave durante 30 minutos. Luego se filtra en caliente por algodón, se reparte en tubos de 8 x 80 mm. (3 ml. por tubo) y se esteriliza a 110°C durante 30 minutos.

El inoculum consistió en 0,15 ml. de un cultivo de 24 horas en medio de papa-levadura. La incubación se hizo a 37°C, observándose el desarrollo por el desprendimiento de gases. Los tubos se colocaron cada día en la heladera durante unos 30 minutos para poder ver la licuación o no de la gelatina, repitiéndose el ensayo durante un mes en los casos negativos.

Los cultivos que licuaron la gelatina lo hicieron en menos de 3 días. Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Están resumidos en la tabla 2.

T A B L A 2

C e p a		Licuación de la gelatina
tipo	Nº	
Cl. pasteurianum	87	-
	181	-
Cl. saccharobutyricum	179	-
	180	-
Cl. felsineum	1-1	+
	4-2	+
	4-1	+
Cl. acetobutylicum	D	+
	B-8-3	+

d. Formación de acetilmetilcarbinol.

La presencia de acetilmetilcarbinol en los mostos fermentados se investigó cualitativamente por el método de Barrit /37/, ensayado en comparación con otros métodos por la Sta. Sara E. Goldenberg en este mismo laboratorio. La reacción de Barrit fué incluida como ensayo de rutina a hacerse sobre todos los tubos de cultivos que luego se usaran para el análisis cuantitativo de los productos de fermentación; como se empleaban 20 tubos de Hall con medio de levadura para cada cepa, se pudo observar que entre un tubo y otro de una misma cepa había a veces cierta diferencia de intensidad en la coloración rosada que da el acetilmetilcarbinol, pero nunca hubo duda sobre si una reacción era positiva o negativa. Es posible que esas diferencias de intensidad fueran debidas a la influencia de la anórobiosis en el sistema de óxido-reducción que forma el acetilmetilcarbinol con el 2-3-butanediol; en efecto, si se utiliza el líquido fermentado que queda por encima de la bolita en el tubo de Hall y se agitan repetidamente los tubos al hacer la reacción de Barrit, las diferencias de coloración se atenúan notablemente.

Al aplicar la reacción de Barrit en la fermentación de masa de maíz los resultados fueron más nítidos por ser el medio de cultivo incoloro, pero no hubo diferencias sustanciales con los resultados obtenidos en medio de levadura (ver tabla 3). Esto indica que la producción de acetilmetilcarbinol no depende, en las cepas en estudio, de la utilización de glucosa o almidón como sustrato.

T A B L A 3

C e p a		Formación de acetilmetilcarbinol	
tipo	Nº	en levadura + glucosa	en masa de maíz
Cl. pasteurianum	87	-	-
	181	-	-
Cl. saccharobutyricum	179	-	-
	180	-	-
Cl. felsineum	1-1	+	+
	4-2	+	+
	4-1	+	+
Cl. acetobutylicum	D	+	+
	B-8-3	+	+

e. Enriado.

Para observar la capacidad enriadora de los cultivos se procedió de la siguiente manera: se cortan trozos de lino en rama de unos 3 cm. de largo y se distribuyen 3 o 4 trozos por tubo; se agrega a cada tubo, agitando continuamente, medio de levadura con 0,3 % de creta, hasta que el lino quede totalmente sumergido; se esteriliza a 110°C media hora. Se inoculan los tubos con 0,5 ml. de cultivo de 24 horas en medio de papa-levadura, se asegura la anaerobiosis con 1 ml. de parafina estéril fundida en cada tubo y se incuba a 37°C. A las 48 horas, con ayuda de un ansa se sacan los palitos del líquido y se observa si, raspando suavemente con el ansa, se liberan o no las fibras del lino.

El ensayo, aparentemente burdo, resulta muy bueno en la práctica, ya que la diferencia entre los gérmenes enriadores y los que no lo son es muy notable (Ver tabla 4).

T A B L A 4

C e p a		Enriamiento del lino
tipo	Nº	
Cl. pasteurianum	87	-
	181	-
Cl. saccharobutyricum	179	-
	180	-
Cl. felsineum	1-1	+++
	4-2	+++
	4-1	+++
Cl. acetobutylicum	D	+
	B-8-3	+

f. Ataque del almidón.

Según ya lo mencionamos (pág. 4), se acostumbra dividir a los clostridios butíricos en los de tipo "pasteurianum" incapaces de atacar el almidón y en los de tipo "saccharobutyricum" que lo fermentan.

Sin embargo, de los datos que figuran en el trabajo de McCoy et al. /32/ resulta que, al desarrollar diversas cepas butíricas y una butílica en medio sintético + 1 % de hidrato de carbono, no hay diferencia neta y constante en el ensayo con almidón entre los fermentadores del mismo y los que no lo son, por dar una cierta acidez y levantar los tapones de parafina tanto los unos como los otros. Luego la fermentación de almidón soluble o almidón de maíz agregados a un medio de cultivo no es un buen índice para observar el ataque de este polisacárido. Los autores citados hacen para tal fin otro ensayo, o sea desarrollan los gérmenes butírico-butílicos en masa de maíz: los del tipo "pasteurianum" no modifican el medio, los del tipo "saccharobutyricum" fermentan el almidón y dejan en el fondo del tubo un resto de maíz sin digerir y el organismo acetobutílico deja el residuo de maíz flotando en la parte superior, dando el característico "sombrero".

Hemos preparado masa de maíz al 5 % en tubos de 25 x 300 mm., según se verá en el capítulo correspondiente a los medios de cultivo; en el medio de cultivo terminado se observan en la parte inferior los gránulos de maíz molido y, por encima, un gel blanco. Después de 3 días de desarrollo el aspecto de los cultivos es el siguiente:

- cepa 87 y 181: todo el maíz en el fondo; parte del gel ha sido digerido, quedando un líquido turbio;
- cepa 179 y 180: la mayor parte del maíz en el fondo; el gel ha sido totalmente digerido y queda un líquido límpido;
- cepa 1-1: queda la mitad del maíz, es parduzco y forma "sombbrero"; el gel ha sido totalmente digerido y queda un líquido límpido;
- cepa 4-2 y 4-1: casi todo el maíz en el fondo; el gel ha sido digerido y queda un líquido turbio;
- cepa D y B-8-3: queda menos de la mitad del maíz formando "sombbrero"; el gel ha sido digerido y queda un líquido apenas turbio.

Aunque es posible así diferenciar varios tipos de cultivos por el aspecto de su desarrollo en la masa de maíz, no es muy claro el ataque o no del almidón, ya que todos los cultivos digieren por lo menos la mayor parte del gel. Luego hemos ensayado lo siguiente: hemos usado como medio de cultivo sólo el gel de la masa de maíz, repartido en tubos de ensayo, bajo taponés de parafina. A los 3 días de desarrollo se ensayó la presencia de almidón tanto en la parte líquida como en lo que quedaba del gel, agregando a 1 ml. de cada uno una gota de iodo 0,07 N; en el medio sin sembrar se obtuvo un color azul intenso. Los resultados figuran en la tabla 5.

En base a nuestra observación al hacer la reacción de la granulosa (ver pág. 14) de que los preparados de las cepas 87 y 181 se tiñen de violeta y los demás de amarillo con el iodo, tratamos de ver a qué se debía esa particularidad y si podía servir para aclarar la fermentación del almidón. Por de pronto se vió que en el medio de levadura autolizada, usado como sustrato para luego hacer los prepa-

rados, hay almidón soluble que da un intenso color azul con el iodo. Los resultados obtenidos con las distintas cepas al agregar una gota de iodo a 1 ml. de cultivo están en la tabla 5. Quisimos ver luego si el color azul que daban las cepas 87 y 181 era debido al no ser utilizado el almidón o bien a la gran cantidad de bastones granulosa positivos que se observan en estas cepas y no en las demás. Para eso centrifugamos bien los cultivos 87 y 181 y sobre el líquido límpido y prácticamente libre de bacterias volvimos a hacer la reacción con el iodo: se obtuvo un intenso color azul como en el medio sin sembrar.

De todo lo cual resulta que las cepas 87 y 181 (tipo Cl. pasteurianum) son incapaces de fermentar almidón, mientras que la D y B-8-3 (Cl. acetobutylicum) lo consumen totalmente; entre ambos extremos hay cepas intermedias, la 179 y 180 (tipo Cl. saccharobutyricum) y la 1-1, 4-2 y 4-1 (Cl. felsineum), que, según el medio, utilizan el almidón o lo atacan de modo que da una reacción distinta con el iodo.

T A B L A 5

C e p a		Almidón residual por reacción con iodo		
tipo	Nº	gel de maíz		medio de levadura
		líquido	gel	
Cl. pasteurianum	87	azul	azul	azul
	181	azul	azul	azul
Cl. saccharobutyricum	179	-	violeta	-
	180	-	violeta	-
Cl. felsineum	1-1	-	violeta	-
	4-2	-	violeta	-
	4-1	-	violeta	-
Cl. acetobutylicum	D	-	-	-
	B-8-3	-	-	-

Métodos químicos1. Determinación de azúcar residual.

En nuestro caso se trataba de determinaciones de glucosa, ya que el medio primitivamente elegido para las fermentaciones era el de levadura con 2,5 % de glucosa.

Los métodos basados en la reducción de las sales de Cu^{++} a Cu^+ son más adecuados para el análisis de medios de cultivo por ser más específicos que los que usan ferricianuro (Hagedorn y Jensen /38/).

El reactivo cúprico de Shaffer y Hartmann /39/ fué modificado por Stiles, Peterson y Fred /40/ y aplicado por ellos en su micrométodo. Lo hemos utilizado en nuestro trabajo, a pesar de los varios otros aparecidos posteriormente (Shaffer y Somogyi /41/, Underkofler et al. /42/, Somogyi /43/), por estar ya en uso en nuestro laboratorio y dar datos satisfactorios. Los resultados que hemos obtenido con una solución de glucosa en agua y con el medio de levadura más glucosa figuran en la tabla 6. En ambos casos el contenido real en azúcar fué establecido por pesada de la glucosa a agregar.

Se observa que, siempre que se haya defecado el líquido en examen, el método tiene un error de $\pm 0,05$ mg. de glucosa. También se ve que conviene tomar el máximo de muestra compatible con los límites del método, para así disminuir el error porcentual.

T A B L A 6

Determinaciones de glucosa en soluciones conocidas

Solución usada		Líquido defecado	Na ₂ S ₂ O ₃ 0,005 N gastado	△	Glucosa en la muestra	Glucosa hallada		Error	
tipo	volumen					ng.	g/l		%
	ml.	ml.	ml.	ml.	ng.	ng.	g/l	%	
glucosa en agua 3,14 g/l	10,03	1,01	18,2	3,6	0,639	0,558	2,75	-13	
	10,03	2,02	13,2	8,6	1,272	1,224	3,02	- 4	
	10,03	3,04	8,2	13,6	1,913	1,856	3,04	- 3	
glucosa en medio de levadura 25,0 g/l	1,01	1,01	18,8	3,0	0,510	0,477	23,6	- 6	
	1,01	2,02	14,9	6,9	1,020	0,997	24,4	- 2	
	1,01	3,04	10,6	11,2	1,533	1,547	25,2	+ 1	
			Líquido diluído sin defecar						
	1,01	1,01	19,0	2,8	0,510	0,446	21,8	-13	
	1,01	2,02	15,3	6,5	1,020	0,940	23,0	- 8	
	1,01	3,04	11,5	10,3	1,533	1,446	23,5	- 6	
			Testigo						
			21,8						

2-3. Determinación de alcohol butílico y etílico.

Varios son los métodos cuantitativos que han sido propuestos.

Bogin /44/ y más tarde Bakonyi /45/ separan los solventes totales anhidros y luego determinan la cantidad de agua necesaria para provocar un enturbiamiento: éste es debido al butanol, no miscible con el agua en todas proporciones; el etanol y la acetona retardan el proceso y la cantidad de agua que produce la turbidez resulta proporcional a la cantidad de etanol más acetona presente en los solventes totales. Por lo tanto, conociendo el contenido en acetona, fácil de determinar, y la cantidad de solventes totales, es posible establecer así el contenido en alcohol etílico y luego, por diferencia, el butanol. Existen tablas compiladas con mezclas conocidas de solventes, que facilitan el cálculo; pero el método resulta largo, debiendo partirse de cantidades muy grandes de mosto fermentado (2500 ml.).

Hsi Ch'ou Fang /46/ separa los solventes totales, determina la acetona por iodometría y por otra parte halla el peso específico y el índice de refracción de la mezcla. Luego tiene 2 ecuaciones con 2 incógnitas para calcular el etanol y el butanol. Los resultados no parecen ser excelentes.

Stahly, Osburn y Werkman /47/ oxidan los productos volátiles neutros con $K_2Cr_2O_7$ y H_3PO_4 ; luego aplican el método de partición entre el agua y el éter dietílico a los ácidos butírico y acético formados. El método presenta el inconveniente de la inflamabilidad del éter.

Christensen y Fulmer /48/ tratan con $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4 y determinan el poder oxidante de la mezcla, antes y después de la oxidación, agregando KI y valorando el iodo liberado con $Na_2S_2O_3$. Aún conociendo el contenido de acetona, hay

así una sola ecuación para dos incógnitas etanol y butanol. Entonces los autores obtienen la segunda ecuación, ya sea oxidando en otras condiciones la mezcla, o bien extrayendo previamente el butanol con cloroformo. El método no prevé la presencia posible de alcohol isopropílico.

Mouratoff /49/ determina el alcohol butílico por el metano que se desprende al tratarlo con reactivo de Grignard, pero el método es engorroso y sólo da uno de los dos alcoholes que se trata de determinar.

Nosotros hemos adaptado el método de Johnson /50/, que presenta la ventaja de su sencillez y la de necesitar sólo pequeñas cantidades de mosto fermentado. El método consiste en lo siguiente: los solventes neutros se destilan, luego se oxidan los alcoholes butílico y etílico a ácidos y finalmente se destilan dos fracciones sucesivas y en ambas se determina la acidez.

Este método se basa en los estudios de Duclaux /51/, según los cuales los ácidos butírico y acético formados destilan cada uno siempre en la misma proporción en la primera y segunda fracción, sea cual fuere la cantidad absoluta y sin que el uno interfiera en la destilación del otro. Por lo tanto se pueden hallar dos ecuaciones para calcular las cantidades de butanol y etanol contenidas en una solución, una vez que se han encontrado los respectivos coeficientes por oxidación y destilación de soluciones conocidas de cada alcohol.

Reactivos:

1. Solución oxidante: se mezclan volúmenes iguales de

$K_2Cr_2O_7$	3 N	(149,1 g/l)
y H_2SO_4	10 N	(719 ml. H_2O + 281 ml. H_2SO_4 96%)

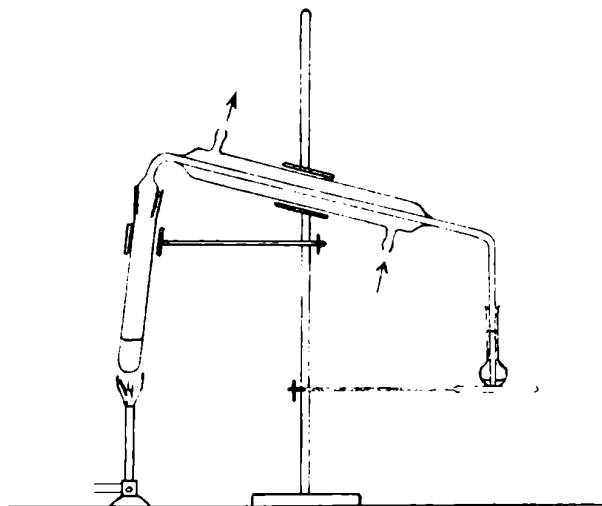
 preparados con agua libre de CO_2 .

2. Solución alcalina: $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N

Se disuelven aprox. 10 g. $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua destilada hervida, se agita bien y se deja sedimentar dos días el BaCO_3 ; luego con sifón se pasa el líquido límpido sobrenadante a un frasco donde se ha hecho pasar aire u oxígeno libres de CO_2 durante una hora.

3. Indicador: rojo de fenol al 0,02 ‰

Se disuelven 100 mg. fenolsulfonftaleína con 2,85 ml. NaOH 0,1 N y se lleva a 500 ml. con agua destilada.

4. Solución ácida patrón: ftalato ácido de potasio 0,01 N (2,041 g/l). Se conserva en vidrio Pyrex durante algún tiempo. Con esta solución (10 ml. por vez) se estandariza el $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N.Aparatos:1. Para la destilación de los solventes neutros:

El tubo de vidrio Pyrex de 38 x 200 mm. está conectado con el refrigerante de Liebig de 15 cm. de largo por un cierre esmerilado. El matracito en que se recibe el destilado está calibrado para contener 10 ml.

2. Para la destilación de los ácidos:

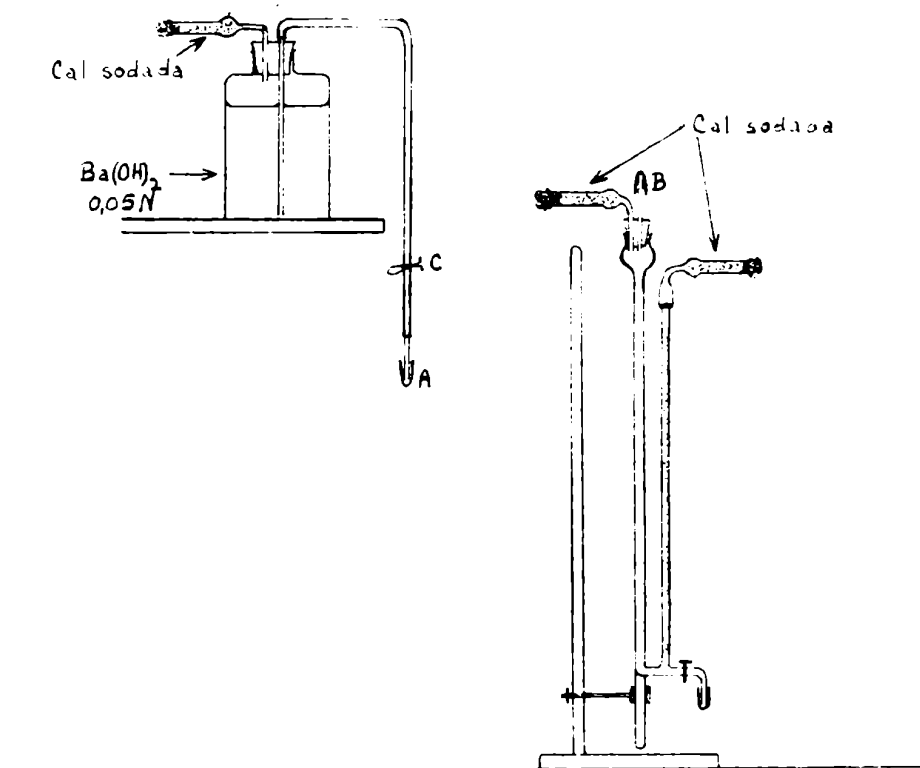
El aparato es análogo al anterior, pero el refrigerante tiene el extremo cortado en bisel y éste apoya sobre el borde del matracito de 10 ml. de capacidad.

En el artículo de Johnson se describe un dispositivo para conseguir una calefacción constante del tubo de destilación: está constituido por un micromechero y por un sistema de regulación del gas que llega al mismo. Hemos observado sin embargo que se destila mucho mejor calentando simplemente con un mechero de Bunsen con llama no muy grande ni muy fuerte. En efecto el micromechero calienta sólo una pequeña zona del tubo de destilación, la cual se sobrecalienta con respecto al resto y provoca frecuentes sobresaltos en la destilación; si envés se usa la llama de un mechero común, se calienta todo el fondo del tubo y la destilación es mucho más regular.

3. Microbureta: graduada al 0,02 ml., contiene en total 2 ml. y ha sido calibrada, obteniéndose los siguientes datos:

Intervalo leído	0,00 - 1,00 ml.	0,00 - 2,00 ml.
Volumen real a 20°C	1,005 ml.	2,011 ml.
Corrección	+ 0,005 ml.	+ 0,011 ml.
Error	+ 0,5 %	+ 0,5 %

Para evitar que el $\text{Ba}(\text{OH})_2$ absorba CO_2 del aire, se ha hecho la instalación representada en la página siguiente. Para cargar la microbureta, se quitan los capuchones de goma y se conecta A con B, se mantiene baja la microbureta y se abre la llave C.



Procedimiento:

En el aparato para destilar los solventes neutros se coloca la muestra con 5 - 15 mg. de alcoholes (en general es necesario hacer un ensayo previo de orientación). Se añade una pizca de piedra pómez molida, se alcaliniza y diluye a unos 20 - 21 ml. con agua sin CO_2 .

En el matracito se pone 1 ml. de agua sin CO_2 para que el tubo de desprendimiento esté sumergido y se destila hasta la marca del matraz, bajándolo de modo que, al destilar la última porción, el extremo del tubo no esté más sumergido en el líquido.

Por otra parte se prepara el tubo del aparato de oxidación y de destilación de los ácidos con 10 ml. de mezcla oxidante y piedra pómez. Se añaden los 10 ml. de destilado

y se enjuaga el matracito con 5 ml. de agua sin CO_2 en dos porciones. Se cierra bien con un tapón de goma que se ajusta con alambre y se procede a la oxidación de los alcoholes colocando el tubo a baño maría hirviendo durante 5 minutos exactos. Se lo enfría luego bajo canilla, se abre y conecta al refrigerante. Se destilan dos fracciones sucesivas de 10 ml. en dos matrascitos. Cada una se pasa a un erlenmeyer de 25 ml. enjuagando el respectivo matraz con 5 ml. de agua sin CO_2 en dos porciones, y se titulan ambas fracciones con el $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N en presencia de 3 gotas del indicador, que vira a un rosado permanente en el punto final. Se hace un testigo: en nuestras experiencias el mismo siempre gastó una cantidad despreciable de álcali (menos de 0,03 ml.).

Como en las fermentaciones siempre hay que determinar no sólo butanol y etanol, sino también acetona e isopropanol, los cuales deben separarse análogamente de los ácidos existentes en el mosto fermentado, conviene entonces hacer la primera destilación con una cantidad mayor del mismo. En nuestras experiencias destilamos siempre 20 ml. de mosto, recibiendo el destilado en un matraz aforado de 50 ml. con unos ml. de agua sin CO_2 en el fondo.

Al principio tuvimos dificultades por la enorme espuma que da el mosto fermentado cuando se lo calienta en medio alcalino. Se ensayó la defecación previa del método de Stiles, Peterson y Fred /40/ para azúcares y la defecación con $\text{ZnSO}_4 + \text{Ba}(\text{OH})_2$, pero los resultados no fueron concordantes. Mucho mejor encontramos finalmente que era centrifugar el mosto, añadirle unos cristales de ZnSO_4 y MgSO_4 , piedra pómez, NaOH hasta viraje del rojo de fenol y destilar calentando suavemente el tubo de destilación en casi toda su extensión, con lo cual se consigue romper la espuma. Al destilado se añade el agua de lavado del refrigerante y se lo lleva a volumen. De allí se toman porciones ade-

cuadas para ser oxidadas en la determinación de butanol y etanol por una parte, en la de isopropanol por otra, y finalmente para la determinación directa de acetona.

Cálculos para estandarizar el método:

Al hacer las determinaciones con cada uno de los dos alcoholes por separado se observa que, dentro de ciertos límites de concentración en la muestra, el gasto de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ por cada milígramo de cada uno de los dos alcoholes es siempre el mismo en cada una de las dos fracciones.

Ya que en general en la fermentación acetobutílica debiera obtenerse más butanol que etanol, se preparó por pesada

- a. una solución con 245,1 mg. de butanol en 100 ml.
- b. una solución con 52,8 mg. de etanol en 100 ml.

Se trabajó primero con cada solución por separado y no se hizo la destilación previa, sino que directamente se procedió a oxidar al alcohol. Se agregaron a la mezcla oxidante cantidades adecuadas de cada solución con pipetas de doble enrase calibradas, diluyendo luego, si era necesario, con la correspondiente cantidad de agua sin CO_2 para tener un volumen total de 25 ml.

El gasto de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ en la primera y segunda fracción destiladas se corrigió por el factor del $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N y por el error de la microbureta.

Las experiencias realizadas con butanol están resumidas en la tabla 7, las con etanol en la tabla 8.

En el caso del butanol se observa que el gasto de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N, o sea la acidez formada por cada milígramo de alcohol, es bastante constante, menos con cantidades pequeñas de alcohol, donde el error es relativamente grande. Si se toman en cuenta por lo tanto sólo los valores corres-

T A B L A 7
Experiencias realizadas con solución butílica
(245,1 mg. butanol/100 ml.)

Solución butílica usada	Butanol en la muestra	Factor del Ba(OH) ₂ 0,05 N	Primera fracción			Segunda fracción		
			Ba(OH) ₂ gastado	Ba(OH) ₂ 0,05 N	Gasto de Ba(OH) ₂ 0,05 N por mg. de bu- tanol presente	Ba(OH) ₂ gastado	Ba(OH) ₂ 0,05 N	Gasto de Ba(OH) ₂ 0,05 N por mg. de bu- tanol presente
ml.	mg.		ml.	ml.	ml./mg.	ml.	ml.	ml./mg.
1,01	2,48	0,933	0,54	0,507	0,204	0,23	0,216	0,087
1,01	2,48	0,924	0,56	0,520	0,209	0,23	0,214	0,086
1,01	2,48	0,924	0,56	0,520	0,209	0,23	0,214	0,086
2,02	4,96	0,924	1,06	0,984	0,198	0,43	0,399	0,080
2,02	4,96	0,924	1,06	0,984	0,198	0,41	0,381	0,077
3,04	7,44	0,924	1,62	1,505	0,202	0,58	0,539	0,072
3,04	7,44	0,924	1,66	1,542	0,207	0,62	0,576	0,077
3,04	7,44	0,924	1,63	1,514	0,203	0,62	0,576	0,077
4,05	9,92	0,912	2,18	1,998	0,201	0,83	0,761	0,076
4,05	9,92	0,912	2,15	1,970	0,198	0,83	0,761	0,076
5,07	12,45	0,924	2,67	2,480	0,199	1,00	0,929	0,075
5,07	12,45	0,924	2,61	2,424	0,195	1,07	0,994	0,080

T A B L A 8

Experiencias realizadas con solución etílica
(47,6 mg. etanol/100 ml. en las 11 primeras experiencias,
52,8 mg. etanol/100 ml. en las últimas cuatro)

Solución etílica usada	Etanol en la muestra	Factor del $Ba(OH)_2$ 0,05 N	Primera fracción			Segunda fracción		
			$Ba(OH)_2$ gastado	$Ba(OH)_2$ 0,05 N	Gasto de $Ba(OH)_2$ 0,05 N por mg. de e- tanol presente	$Ba(OH)_2$ gastado	$Ba(OH)_2$ 0,05 N	Gasto de $Ba(OH)_2$ 0,05 N por mg. de e- tanol presente
ml.	mg.		ml.	ml.	ml./mg.	ml.	ml.	ml./mg.
1,01	0,48	0,924	0,12	0,111	0,232	0,15	0,159	0,290
1,01	0,48	0,924	0,12	0,111	0,232	0,14	0,150	0,270
2,02	0,96	0,924	0,22	0,204	0,212	0,25	0,232	0,242
2,02	0,96	0,924	0,21	0,195	0,203	0,25	0,232	0,242
3,04	1,45	0,924	0,29	0,269	0,185	0,37	0,344	0,237
3,04	1,45	0,924	0,28	0,260	0,179	0,38	0,353	0,243
4,05	1,95	0,924	0,39	0,362	0,188	0,48	0,446	0,231
4,05	1,95	0,924	0,40	0,371	0,192	0,50	0,464	0,241
4,05	1,95	0,924	0,39	0,362	0,188	0,49	0,455	0,236
5,07	2,41	0,924	0,47	0,436	0,181	0,57	0,529	0,220
5,07	2,41	0,924	0,45	0,418	0,174	0,57	0,529	0,220
10,03	5,50	0,924	0,97	0,901	0,170	1,22	1,133	0,214
10,03	5,50	0,924	0,99	0,919	0,174	1,22	1,133	0,214
10,03	5,50	0,924	0,94	0,873	0,165	1,19	1,105	0,209
10,03	5,50	0,924	0,92	0,901	0,160	1,24	1,152	0,217

pondientes a 5 - 12,5 mg. de butanol en la muestra, resulta un promedio de

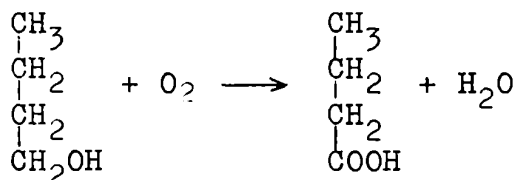
0,200 ml/mg. en la primera fracción
y 0,077 ml/mg. en la segunda fracción.

En total por cada milígramo de butanol se gastan 0,277 ml. de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N, que son equivalentes a

$$\frac{0,277 \text{ ml.} \times 88 \text{ g.} \times 0,05}{1000 \text{ ml.}} = \frac{1,22 \text{ mg. ácido butírico}}{1000 \text{ ml.}}$$

ya que el peso molecular del mismo es 88.

Ahora bien, si se produce cuantitativamente la reacción de oxidación



y todo el ácido butírico pasa al destilado, debe ocurrir que 74 g. de butanol den 88 g. de ácido butírico.

Luego de 1 mg. de butanol se deben obtener

1,19 mg. ácido butírico.

El error por exceso del 2,5 % puede ser debido a que una pequeña fracción del butanol llega a oxidarse hasta ácido acético y CO_2 .

Al trabajar con la solución etílica no se observa ya tanta constancia en la acidez de las 2 fracciones destiladas. Hay una disminución no muy regular de la acidez por milígramo de etanol al aumentar la cantidad de etanol en la muestra. Como se ha trabajado aquí con cantidades 5 veces menores que las usadas de butanol, es posible que por eso el error relativo sea mayor. Por lo tanto se han tomado en consideración sólo los datos obtenidos al destilar 5 mg. de etanol. Entonces resulta un promedio de

0,170 ml/mg. en la primera fracción
y 0,213 ml/mg. en la segunda fracción.

En total son 0,383 ml. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N por milígramo de etanol, lo que equivale a

$$\frac{0,383 \text{ ml.} \times 60 \text{ g.} \times 0,05}{1000 \text{ ml.}} = \underline{1,15 \text{ mg. ácido acético.}}$$

Si es cuantitativa la reacción



y todo el acético destila, se tiene que 46 g. de etanol dan 60 g. de ácido acético.

Luego de 1 mg. de etanol se deben obtener

$$\underline{1,30 \text{ mg. ácido acético.}}$$

En este caso el error es por defecto y es del 11,5 %; es probable que sea debido a que en los 5 ml. que quedan sin destilar hay todavía algo del ácido acético formado.

Si tenemos ahora una mezcla de butanol, etanol y agua con B mg. de butanol y E mg. de etanol y la sometemos a la oxidación y destilación, debe haber en la primera fracción una acidez total, expresada en ml. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N,

$$I = 0,200 \text{ ml/mg.} \times B \text{ mg.} + 0,170 \text{ ml/mg.} \times E \text{ mg.}$$

y en la segunda fracción:

$$II = 0,077 \text{ ml/mg.} \times B \text{ mg.} + 0,213 \text{ ml/mg.} \times E \text{ mg.}$$

Tenemos así un sistema de dos ecuaciones para calcular las dos incógnitas B y E. Resulta:

$B = 7,22 \times I - 5,77 \times II$
$\bar{E} = 6,78 \times II - 2,61 \times I$

Para ver cuál es la exactitud del método, se hicieron algunas experiencias con soluciones de butanol y etanol. Los datos obtenidos figuran en la tabla 9.

Se observa que no se puede trabajar con exactitud cuando hay menos de 5 mg. de butanol y 1 mg. de etanol en la muestra, porque con cantidades menores el error es enorme.

Si en la muestra hay entre 6 y 15 mg. de alcoholes totales, el método de Johnson es perfectamente utilizable en el análisis de productos de fermentación, ya que, si bien el error relativo en la determinación de alcohol etílico es grande todavía, hay que recordar que se trata de cantidades muy pequeñas de etanol y que por otra parte el análisis de los solventes totales no será por eso afectado, ya que la suma de alcohol butílico y etílico se determina con una aproximación bastante grande.

Puesto que, al realizar las fermentaciones, es necesario separar los productos volátiles neutros para el análisis por medio de una destilación, hemos tratado de determinar si de esta manera hay alguna pérdida apreciable de etanol y butanol. Para eso se ha trabajado con cada uno de los dos alcoholes por separado y se ha seguido todo el procedimiento del método, incluyendo ahora la destilación previa a la oxidación del alcohol. Los datos figuran en la tabla 7-A y 8-A. Se observa que los errores no son mayores que los obtenidos sin la destilación previa, siempre que se trabaje con 6 a 15 mg. de alcoholes en la muestra.

T A B L A 9

Experiencias realizadas con mezclas conocidas de
butanol, etanol y agua

Butanol en la muestra	Etanol en la muestra	Alcohol- les totales en la muestra	Factor del Ba(OH) ₂ 0,05 N	1a. fracción		2a. fracción		Butanol		Etanol		Alcoholes totales	
				ml.	ml.	ml.	ml.	mg.	%	mg.	%	mg.	%
2,48	0,53	3,01	0,924	0,63	0,585	0,37	0,344	2,24	- 9,7	0,80	+ 51	5,04	+ 1,0
2,48	0,53	3,01	0,924	0,63	0,585	0,35	0,525	2,35	- 5,2	0,68	+ 28	3,03	+ 0,7
4,96	0,96	5,92	0,924	1,23	1,142	0,61	0,567	4,97	+ 0,2	0,86	- 10	5,83	- 1,5
4,96	0,96	5,92	0,924	1,23	1,142	0,61	0,567	4,97	+ 0,2	0,36	- 10	5,83	- 1,5
7,44	1,45	8,89	0,912	1,90	1,741	0,94	0,861	7,60	+ 2,1	1,29	- 11	8,89	0
7,44	1,45	8,89	0,912	1,90	1,741	0,95	0,852	7,65	+ 2,8	1,25	- 15	8,88	- 0,1
9,92	1,93	11,85	0,912	2,52	2,309	1,29	1,182	9,85	- 0,7	1,99	+ 3	11,84	- 0,1
12,08	2,36	14,76	0,931	3,09	2,891	1,57	1,469	12,40	+ 2,6	2,41	- 10	14,81	+ 0,5
12,08	2,36	14,76	0,931	3,09	2,891	1,64	1,534	12,02	- 0,5	2,65	+ 6	14,67	+ 0,7

T A B L A 7A

Experiencias con solución butílica (313,0 mg. butanol/100 ml.)
incluyendo la destilación previa

Solución butílica usada ml.	Butanol en la muestra mg.	Factor del Ba(OH) ₂ 0,05 N	Primera fracción			Segunda fracción			Error %
			Ba(OH) ₂ gastado ml.	Ba(OH) ₂ 0,05 N ml.	Butanol hallado mg.	Ba(OH) ₂ gastado ml.	Ba(OH) ₂ 0,05 N ml.	Butanol hallado mg.	
2,02	6,33	0,835	1,48	1,243	6,22	0,56	0,470	6,11	- 3,5
2,02	6,33	0,835	1,47	1,234	6,17	0,57	0,479	6,22	- 1,7
4,05	12,66	0,835	3,00	2,519	12,60	1,16	0,974	12,65	- 0,1

39

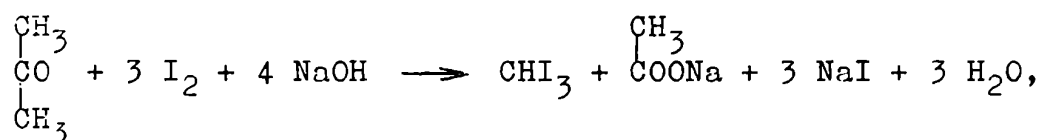
T A B L A 8A

Experiencias con solución etílica (47,6 mg. etanol/100 ml.)
incluyendo la destilación previa

Solución etílica usada ml.	Etanol en la muestra mg.	Factor del Ba(OH) ₂ 0,05 N	Primera fracción			Segunda fracción			Error %
			Ba(OH) ₂ gastado ml.	Ba(OH) ₂ 0,05 N ml.	Etanol hallado mg.	Ba(OH) ₂ gastado ml.	Ba(OH) ₂ 0,05 N ml.	Etanol hallado mg.	
2,02	0,96	0,835	0,20	0,168	0,99	0,27	0,227	1,07	+ 11
10,05	4,77	0,835	0,93	0,781	4,59	1,20	1,008	4,73	- 0,8
10,03	4,77	0,835	0,93	0,781	4,59	1,19	0,999	4,69	- 1,7

4-5. Determinación de acetona e isopropanol.

Una revisión de los métodos más comunes para determinar acetona se halla en el artículo de Green /52/. De ahí resulta como el mejor el método de Messinger /53/ modificado luego por Goodwin /54/, que consiste en tratar la solución acetónica con iodo en medio alcalino, dejar en reposo para que sea completa la formación del iodoformo, liberar el exceso de iodo con ácido y valorarlo luego con tiosulfato de sodio en presencia de almidón: hay que hacer un testigo para conocer el iodo total. De la diferencia, o sea del iodo gastado para la formación de iodoformo se calcula el contenido en acetona ya que, según la reacción



1 mol de acetona (58,08 g.) gasta 6 átomos de iodo y por lo tanto 1 ml. de iodo 0,1 N corresponde a

$$\frac{58.080 \text{ ng.} \times 0,1}{6 \times 1000} = 0,968 \text{ ng. acetona.}$$

Para determinar el alcohol isopropílico existe el método de Allgeier y Tatum, mencionado en el trabajo de Langlykke et al. /33/: según el mismo se oxida el isopropanol a acetona con la mezcla oxidante de Johnson y luego ésta se valora por el método de Messinger, pero en microescala. En detalle, se procede de la siguiente manera: en un tubo de vidrio Pyrex de 38 x 200 mm. se coloca la muestra con 10 ml. de mezcla oxidante y agua destilada hasta tener exactamente 25 ml. de volumen total, se añaden unos trozos de vidrio para regularizar la ebullición. Se tapa bien y fija el tapón con alambre, se coloca a baño maría hirviendo

durante 3 minutos, se enfría bajo canilla y se conecta a un refrigerante cuyo extremo está sumergido en 15 ml. de NaOH N colocados en un erlenmeyer de 125 ml. de tapón esmerilado. Se destila la mitad del líquido. Al destilado se agregan 5 ml. de iodo 0,2 N con una pipeta, se cierra y deja 5 - 10 minutos para que se complete la reacción. Luego se acidifica con 20 ml. de H_2SO_4 N y se titula el exceso de iodo con $Na_2S_2O_3$ 0,1 N de una microbureta.

Por otra parte se hace un ensayo en blanco; según los autores, del isopropanol original se determina así el 85 %, de la acetona el 96 %.

Nosotros hemos tratado de usar este método que trabaja con pequeñas cantidades de muestra tanto para la determinación del isopropanol como para la de la acetona. Al principio los errores de las determinaciones eran inadmisibles debido a las siguientes causas:

- a. la microbureta, cuya graduación se suponía suficientemente exacta, resultó tener graves errores de calibración y tuvo que ser nuevamente calibrada; otro tanto ocurrió con las pipetas de doble aforo;
- b. 15 ml. de NaOH N constituyen un exceso de álcali absolutamente innecesario;
- c. al agregarse luego 20 ml. de H_2SO_4 N, queda en la solución un exceso de 5 ml. de H_2SO_4 : según Goodwin /54/, ya en el macrométodo no debe haber un exceso mayor que 1 ml.; de otra manera se gasta más tiosulfato y por lo tanto se obtiene un error por defecto en las determinaciones;
- d. al conectar el tubo de destilación al refrigerante mediante un tapón de goma, queda luego de la destilación mucho líquido de condensación entre la pared del tubo y el tapón y sobre la base del tapón mismo: se comprobó, al enjuagar con agua destilada esta parte del aparato, que ese líquido contenía abundante acetona y daba buena precipita-

ción de iodoformo; es necesario trabajar con un aparato de vidrio con cierre esmerilado, desalojar el líquido condensado en la parte superior del tubo de destilación con llama directa y enjuagar finalmente todo el condensador para reunir en su totalidad la acetona destilada.

Resumiendo el método, tal como fué usado por nosotros para determinar acetona y alcohol isopropílico en pequeñas cantidades, es el siguiente:

Reactivos:

1. solución oxidante de Johnson

2. NaOH 0,5 N

3. H₂SO₄ N

4. Na₂S₂O₃ 0,1 N

se disuelven 25 g. Na₂S₂O₃.5H₂O en agua destilada hervida y enfriada y se lleva a un litro. Se añade 0,1 g. de Na₂CO₃ como conservante. La solución debe dejarse estabilizar unas dos semanas.

5. indicador de almidón

2 g. de almidón soluble se deslíen en un mortero con un poco de agua y se mezclan con 10 mg. HgI₂ (conservador). Luego se vierte esta suspensión poco a poco sobre un litro de agua destilada hirviendo. Se sigue la ebullición hasta tener un líquido límpido y luego se deja enfriar. Se usan 5 ml. por cada 100 ml. de solución a titular.

6. iodo 0,07 N

8,9 g. de iodo se pesan rápidamente y pasan a un erlenmeyer de 250 ml. con 28 g. KI libre de iodato y 25 ml. de agua destilada. Se agita hasta disolución total y luego se lleva a un litro en un matraz aforado. Se guarda en un frasco de tapón esmerilado al abrigo de la luz. Para saber si el KI tiene o no iodato, se disuelve 1 g.

de KI en 25 ml. de agua, se le añaden 6 ml. de H_2SO_4 N y 2 ml. de indicador: en ausencia de iodato la solución no se colorea de azul enseguida.

7. KIO_3 0,1 N

se pesan exactamente 3,5669 g. KIO_3 y se lleva a un litro con agua destilada. Esta solución se usa como solución patrón para estandarizar el $Na_2S_2O_3$ 0,1 N, lo cual se hace de la siguiente manera: 5 ml. KIO_3 0,1 N se diluyen con 10 ml. de agua destilada, se añaden 0,2 g. KI libre de iodato y 1 ml. H_2SO_4 N. Se valora con el $Na_2S_2O_3$ de la microbureta, añadiendo hacia el final 1 ml. de almidón.

Aparatos:

1. Aparato de destilación: como el aparato 1 del método de Johnson. El destilado es recibido en erlenmeyer de 125 ml. de tapón esmerilado.
2. Microbureta: graduada al 0,01 ml., contiene en total 5 ml.; su calibración dió los datos siguientes:

Intervalo leído	Volumen real a 20°C	Corrección	Error
ml.	ml.	ml.	%
0,00 - 1,00	1,040	+ 0,040	+ 4,0
0,00 - 2,00	2,107	+ 0,107	+ 5,3
0,00 - 3,00	3,155	+ 0,155	+ 5,1
0,00 - 4,00	4,122	+ 0,122	+ 3,1
0,00 - 5,00	5,226	+ 0,226	+ 4,5

Procedimiento:A. Valoración de acetona:

Si se trata de determinar solamente acetona, se destila en medio alcalino en el aparato 1 del método de Johnson un volumen de mosto que contenga no más de 5 mg. de acetona y se usa como muestra el destilado más el agua de lavado. Si enés se determinan todos los solventes del mosto fermentado, se utiliza como muestra una porción del destilado de solventes llevado a volumen.

La muestra se coloca en un erlenmeyer de 125 ml. de tapón esmerilado, junto con 10 ml. de NaOH 0,5 N. Con pipeta de doble enrase se añaden 10 ml. de iodo 0,07 N agitando continuamente. Se deja en reposo 15 minutos, luego se libera el exceso de iodo con 5,5 ml. de H_2SO_4 N y se lo valora con el $Na_2S_2O_3$ 0,1 N de la microbureta.

Se hace un testigo. La diferencia entre el gasto del testigo y el de la muestra, expresada en ml. de iodo o de $Na_2S_2O_3$ 0,1 N, da el contenido en acetona de la muestra, ya que

1 ml. I_2 0,1 N equivale a 0,968 mg. acetona.

B. Valoración de isopropanol + acetona:

La muestra se prepara por destilación como en el caso de la acetona. Se la coloca en el tubo de destilación del aparato 1, con 10 ml. de solución oxidante y agua destilada hasta tener un volumen de 25 ml. Se añade piedra pómez, se tapa y fija el tapón con alambre, se oxida 3 minutos a baño maría hirviendo, se enfría bajo canilla y se destila, recibiendo el destilado bajo 10 ml. de NaOH 0,5 N. Se destila algo más que la mitad del líquido, desalojando con llama suave directa lo que se condensa en la parte superior del tubo. Se enjuaga el refrigerante con unos 5 - 10 ml. de a-

gua destilada, añadiendo este líquido de lavado al destilado, que se ha recibido en un erlenmeyer de 125 ml. Luego se sigue como en la valoración de acetona.

Del gasto total de tiosulfato se resta el correspondiente a la acetona, que ya se conoce. El resto da el contenido en isopropanol, ya que

1 ml. I_2 0,1 N reacciona con 1,0015 mg. isopropanol.

El método se ha ensayado con soluciones de acetona y alcohol isopropílico y los datos obtenidos figuran en las tablas 10 y 11. Se observa una exactitud del 2 %, que es aceptable al trabajar con cantidades tan pequeñas.

6. Determinación de pH.

Se hizo por mediciones potenciométricas con electrodo de vidrio, el que se controlaba antes de la medición con buffer de pH 4,0.

7. Determinación de la acidez total.

Según las indicaciones del Manual ($VI_{42}:7$), 5 ml. de mosto fermentado se colocan en un erlenmeyer de 25 ml., se llevan hasta ebullición para eliminar el CO_2 y se enfrían. Se agregan unas gotas de fenolftalcína y se titula con NaOH N/20 exacto colocado en una microbureta, de 10 ml. de capacidad. El NaOH N/20 exacto se prepara por dilución conveniente del NaOH 0,5 N cuyo factor se conoce.

T A B L A 10

Experiencias realizadas con solución de acetona
(43,59 mg. acetona/100 ml. solución)

Solución aceto- nica usada ml.	acetona en la muestra mg.	Factor del Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N	Na ₂ S ₂ O ₃ gastado por el testigo (T)		Na ₂ S ₂ O ₃ gastado por la solución (S)		Iodo gastado en la reacción		Acetona hallada mg.	Error %
			ml.	ml.	ml.	ml.	T - S	0,1 N		
1,01	0,44	1,006	6,750	7,070	6,340	6,620	0,450	0,455	0,44	0
1,01	0,44	1,006	6,750	7,070	6,340	6,620	0,450	0,455	0,44	0
1,01	0,44	1,006	6,750	7,070	6,355	6,635	0,435	0,440	0,43	- 2,0
10,03	4,35	1,006	6,750	7,070	2,400	2,525	4,545	4,570	4,42	+ 1,6
10,03	4,35	1,006	6,750	7,070	2,370	2,495	4,575	4,600	4,45	+ 2,3
10,03	4,35	1,006	6,750	7,070	2,390	2,515	4,555	4,580	4,43	+ 1,8
10,03	4,35	1,006	6,750	7,070	2,400	2,525	4,545	4,570	4,42	+ 1,6
10,03	4,35	1,006	6,750	7,070	2,500	2,630	4,400	4,465	4,32	- 0,7
10,03	4,35	1,006	6,755	7,075	2,430	2,560	4,515	4,540	4,39	+ 0,9
10,03	4,35	1,006	6,755	7,075	2,430	2,560	4,515	4,540	4,39	+ 0,9
10,03	4,35	1,006	6,755	7,075	2,530	2,660	4,415	4,440	4,30	- 1,1
10,03	4,35	1,006	6,755	7,075	2,520	2,650	4,425	4,450	4,31	- 0,9
10,03	4,35	1,012	6,715	7,030	2,445	2,570	4,460	4,515	4,37	+ 0,5
10,03	4,35	1,012	6,715	7,030	2,455	2,585	4,445	4,500	4,30	+ 0,2

T A B L A 11

Experiencias realizadas con solución isopropílica
(43,99 mg. isopropanol/100 ml. solución)

Solución isopropílica usada ml.	Isopro- panol en la muestra mg.	Factor del Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N	Na ₂ S ₂ O ₃ gastado por el testigo (T)		Na ₂ S ₂ O ₃ gastado por la solución (S)		Todo gastado en la reacción T - S ml.	Isopro- panol hallado mg.	Error %
			ml.	ml.	ml.	ml.			
10,03	4,41	1,006	6,755	7,075	2,500	2,630	4,445	4,48	+ 1,6
10,03	4,41	1,006	6,755	7,075	2,490	2,620	4,455	4,49	+ 1,8
10,03	4,41	1,012	6,715	7,030	2,565	2,700	4,330	4,39	- 0,5
10,03	4,41	1,012	6,610	6,920	2,500	2,630	4,290	4,35	- 1,4
10,03	4,41	1,012	6,610	6,920	2,460	2,590	4,330	4,39	- 0,5
10,03	4,41	1,012	6,610	6,920	2,530	2,660	4,260	4,32	- 2,0

8-9. Determinación de ácido butírico y acético.

En la bibliografía se encuentran para este tipo de análisis varias clases de métodos. Algunos se basan en la destilación por arrastre de los ácidos grasos volátiles y su valoración en el destilado (Duclaux /51/, Virtanen y Pulkki /55/), otros aprovechan su diferente constante de partición en diversos éteres como el isopropílico, etílico, isoamílico (Werkman, Osburn y Wood /56/). También hay un método colorimétrico de Allgeier, Peterson y Fred /57/, según el cual los ácidos se destilan y tratan con cloroformo para extraer el butírico: éste, en presencia de $\text{CuCl}_2 + \text{HCl}$, da un color azul debido al butirato de cobre, que se compara con el color de una serie de tubos standard. El ácido acético se determina por diferencia.

Este método colorimétrico es bastante largo y necesita buena cantidad de mosto para la destilación. Los métodos de extracción con éteres son inconvenientes por la inflamabilidad de los mismos y porque hay que manejar cantidades grandes de mosto fermentado y de líquido destilado.

En cuanto a los métodos de destilación originales, también usan volúmenes grandes, pero nosotros hemos observado, al estudiar el método de Johnson /50/, que en el mismo el butanol y etanol son oxidados a ácidos butírico y acético y que éstos son determinados simplemente por destilación de dos fracciones sucesivas, cuya acidez se titula. Nos pareció que debía ser posible analizar de la misma manera una solución de tales ácidos, por supuesto sin oxidación previa.

Hemos preparado, con ácido butírico normal Merck, una solución acuosa con unos 200 mg. en 100 ml.; el contenido exacto en ácido se ha determinado por valoración con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N. Otro tanto se ha hecho con ácido acético Merck. Los datos de la valoración son los que se detallan en la tabla 12.

T A B L A 12

	Solución butírica		Solución acética	
	primera experiencia	segunda experiencia	primera experiencia	segunda experiencia
Cantidad de solución usada	4,93 ml.	4,95 ml.	5,07 ml.	5,07 ml.
Ba(OH) ₂ gastado	2,16 ml.	2,16 ml.	3,92 ml.	3,95 ml.
Promedio de ambas experiencias	2,16 ml.		3,925 ml.	
Factor del Ba(OH) ₂ 0,05 N	0,937		0,937	
Ba(OH) ₂ 0,05 N	2,034 ml.		3,696 ml.	
Peso molecular del ácido	88,10		60,05	
Acido en la muestra	2,034 x 88,10 x 0,05 = = 8,96 mg.		3,696 x 60,06 x 0,05 = = 11,10 mg.	
Acido contenido en 100 ml. de solución	182 mg. %		219 mg. %	

Luego se ha destilado cada solución ácida por separado para hallar el gasto de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N por milígramo de cada ácido en la primera y en la segunda fracción. Los datos obtenidos están en la tabla 13.

En promedio resulta que se gasta, en $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N, para el ácido butírico

0,146 ml/ng. en la primera fracción

y 0,069 ml/ng. en la segunda fracción,

y para el ácido acético

0,095 ml/ng. en la primera fracción

y 0,127 ml/ng. en la segunda fracción.

Para el análisis de mezclas de ambos ácidos se tienen entonces las dos ecuaciones siguientes:

$$\text{I} = 0,146 \text{ ml/ng.} \times b \text{ ng.} + 0,095 \text{ ml/ng.} \times a \text{ ng.}$$

$$\text{II} = 0,069 \text{ ml/ng.} \times b \text{ ng.} + 0,127 \text{ ml/ng.} \times a \text{ ng.}$$

en que I y II son los ml. de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,05 N gastados en la neutralización de la primera y segunda fracción respectivamente; "a" y "b" son los miligramos de ácido acético y butírico en la muestra.

De las dos ecuaciones resulta:

b	$=$	$10,67$	\times	I	$-$	$7,98$	\times	II
a	$=$	$12,26$	\times	II	$-$	$5,80$	\times	I

Los datos obtenidos con soluciones de ambos ácidos en conjunto están expuestos en la tabla 14.

T A B L A 13

Experiencias realizadas con solución butírica
(182 mg. ácido butírico/100 ml.)

Solución butírica usada ml.	A. butí- rico en la muestra mg.	Factor del Ba(OH) ₂ 0,05 N	Primera fracción		Segunda fracción	
			Ba(OH) ₂ gastado 0,05 N ml.	Ba(OH) ₂ 0,05 por mg. de á. butírico ml/mg.	NBa(OH) ₂ 0,05 N gastado ml.	Ba(OH) ₂ 0,05 N por mg. de á. butírico ml/mg.
5,07	9,23	0,937	1,43	1,347	0,68	0,640
5,07	9,23	0,937	1,42	1,337	0,68	0,640
5,07	9,23	0,937	1,42	1,337	0,68	0,640
10,03	18,25	0,937	2,82	2,656	1,33	1,252
10,03	18,25	0,937	2,84	2,674	1,33	1,252

Experiencias realizadas con solución acética
(219 mg. ácido acético/100 ml.)

Solución acética usada ml.	ácido acético en la muestra mg.	Factor del Ba(CH) ₂	Primera fracción		Segunda fracción	
			Ba(OH) ₂ gastado 0,05 N ml.	Ba(OH) ₂ 0,05 por mg. de á. acético ml/mg.	NBa(OH) ₂ 0,05 N gastado ml.	Ba(OH) ₂ 0,05 N por mg. de á. acético ml/mg.
5,07	11,10	0,983	1,08	1,067	1,45	1,422
5,07	11,10	0,983	1,07	1,057	1,41	1,403
5,07	11,10	0,983	1,09	1,077	1,45	1,422
10,03	21,96	0,937	2,20	2,072	2,96	2,797
10,03	21,96	0,937	2,19	2,062	2,96	2,787

T A B L A 14

Experiencias realizadas con mezclas conocidas de ácido butírico, acético y agua

ácido butírico en la muestra en mg.	ácido acético en la muestra en mg.	Acidos totales en la muestra en mg.	Factor del $Ba(OH)_2$ 0,05 N	1a. fracción		2a. fracción		ácido butírico en la muestra en mg.	ácido acético en la muestra en mg.	Acidos totales en la muestra en mg.	error en %
				ml. $Ba(OH)_2$ gastado	ml. $Ba(OH)_2$ gastado	ml. $Ba(OH)_2$ gastado	ml. $Ba(OH)_2$ gastado				
8,96	11,10	20,06	0,937	2,51	2,364	2,13	2,006	9,21	10,08	19,29	0,1
8,96	11,10	20,06	0,937	2,51	2,364	2,12	1,996	9,29	10,76	19,95	0,0
1,84	22,21	4,05	0,937	0,52	0,490	0,43	0,405	1,99	2,13	4,12	1,7
1,84	2,21	4,05	0,937	0,51	0,480	0,43	0,405	1,89	2,19	4,08	0,7
9,63	1,22	10,85	0,835	1,80	1,511	0,96	0,806	9,69	1,12	10,81	0,4
9,63	1,22	10,85	0,835	1,81	1,520	0,95	0,798	9,84	0,97	10,81	0,4
9,37	2,45	11,82	0,860	1,89	1,634	1,11	0,960	9,77	2,29	12,06	2,0
9,37	2,45	11,82	0,860	1,88	1,626	1,11	0,960	9,68	2,34	12,02	1,7
19,06	6,13	25,19	0,851	3,94	3,571	2,42	2,070	19,45	5,83	25,28	0,4
1,92	6,13	8,05	0,860	0,98	0,847	1,06	0,917	1,72	6,32	8,04	0,1
1,92	6,13	8,05	0,860	0,99	0,856	1,03	0,891	2,02	5,96	7,98	0,9
3,84	12,26	16,12	0,851	1,97	1,690	2,05	1,754	4,03	11,70	15,73	2,4

Medios de cultivo empleados en las fermentacionesExtracto de levadura de doble concentración.

Para que nuestros datos pudieran ser comparados con los de los autores de Wisconsin /33/, se eligió como primer medio de cultivo para realizar las fermentaciones el extracto de levadura de doble concentración con 2,5 % de glucosa.

Ya Orla-Jensen /59/ menciona la necesidad de la autólisis en la preparación de un buen extracto de levadura; el mismo indica que 24 horas a 50°C alcanzan para que se cumpla el proceso. Según las indicaciones del Ing. Agr. Santos Soriano, conviene más autolizar 48 horas (aunque se obtenga así una mayor acidez y rotura de las proteínas) y luego calentar el medio con clara de huevo, porque se consigue de esta manera una mejor clarificación y filtración. La preparación del extracto de levadura se detalla a continuación.

500 g. de levadura fresca de panadería se disgregan y, en un matraz de dos litros, se dejan 48 horas a 45-50°C para que se efectúe la autólisis, agitando la masa varias veces en ese intervalo. Una vez autolizada, la levadura se deslíe en agua a razón de 200 g/l. Se agrega una clara de huevo batida a nieve por litro, repartiendo los 6 litros de medio en 4 matraces de dos litros. Se lleva 20 minutos a 120°C, con lo cual se consigue la primera clarificación. Se decanta y pasa por una gasa el líquido y una vez tibio se le vuelve a agregar una clara batida por litro, esterilizando de nuevo 20 minutos a 120°C en matraces grandes no del todo llenos. Se obtiene así una buena coagulación y la separación de un líquido perfectamente límpido. Se lo decanta y pasa por papel de filtro, se arregla el pH a 7,0, se agregan 25 g/l. de glucosa, se reparte y esteriliza 30 minutos a 110°C.

Del volumen inicial de 6 litros se consiguen de 3 a 4 litros de medio de cultivo terminado.

Las fermentaciones con extracto de levadura como sustrato se hicieron en tubos de Hall /60/, con unos 60 ml. de medio por tubo.

El mismo extracto de levadura de doble concentración se usó además en otros momentos de este trabajo, según ya se vió en la parte bacteriológica.

Medio de papa-levadura.

Como medio de cultivo en que hacer desarrollar los gérmenes esporulados sobre tierra, o sea para obtener los llamados "starters" con que inocular luego los tubos de medio de levadura, se ha utilizado el medio de papa-levadura, por no convenir para tal objeto un medio totalmente líquido.

200 g. de papa cortada en cubitos se hierven 10 minutos con 500 ml. de extracto de levadura más 500 ml. de agua. Se separa el líquido y los cubitos se reparten en tubos de ensayo (5-6 cubitos por tubo). Al líquido se añade 0,3 % de creta; luego, agitando bien, se lo reparte en los tubos. Se esteriliza 30 minutos a 110°C.

Masa de maíz.

Las fermentaciones se realizaron también en masa de maíz, para lo cual se muele el maíz, sin llegar a tener un polvo fino; se coloca al 5 % en agua y se hierve 15 minutos en un vaso de precipitación, agitando a menudo. Se repone el agua evaporada, se separa el engrudo de almidón formado, se reparte el maíz en los tubos y luego se añade el líquido separado. Finalmente se esteriliza 20 minutos a 120°C.

Las fermentaciones con masa de maíz se realizaron en tubos grandes de 25 x 300 mm. con 50 ml. de medio de culti-

vo por tubo. Para los "starters" se repartió masa de maíz en tubos de ensayo, que se sembraron con los cultivos esporulados sobre tierra.

Para asegurar la anaerobiosis, todos los medios de cultivo, al momento de ser usados, se ponían a baño maría hirviendo durante 10 a 30 minutos, según el tamaño de los tubos, y luego se enfriaban para poder ser inoculados. Además a los tubos de ensayo comunes, una vez sembrados, se agregaba 1 ml. de parafina estéril fundida.

Técnica de las fermentaciones

Como los gérmenes en estudio pierden fácilmente su vigor por sucesivos trasplantes, fué necesario esporularlos sobre tierra antes de comenzar las fermentaciones. Para eso se preparó tierra molida, se repartieron 2 g. por tubo y se esterilizó una hora a 120°C. Los cultivos recibidos, después de controlar la ausencia de contaminantes aerobios, fueron sembrados en medio de papa-levadura. A las 48 horas de desarrollados, se pasó de cada uno 1 ml. del líquido turbio a un tubo con tierra, que luego se dejó secar varios días a 37°C.

Se vió luego que algunos gérmenes no daban así buenos cultivos esporulados en tierra: de ellos fué necesario inocular unos 10 ml. de medio de levadura: a las 48 horas de desarrollados los tubos, se centrifugó estérilmente su contenido, se separó el líquido límpido y sólo el sedimento blando se mezcló con la tierra estéril.

Al principio hubo que determinar el momento adecuado para hacer los análisis en el mosto fermentado. Para eso se inocularon, a partir de un mismo tubo en pleno desarrollo, unos 7 tubos con 10 ml. de medio de levadura por tubo. Esto se hizo con cada uno de los gérmenes. Cada día se abría un tubo de cada germen y se determinaba el azúcar residual. Los datos que se obtuvieron fueron aproximados, por las inevitables diferencias entre un tubo y otro, pero se pudo ver que a partir del cuarto día el contenido en glucosa comenzaba a mantenerse prácticamente constante para cada germen. Luego, en todas las fermentaciones hechas con objeto de analizar los productos formados, se adoptó el tiempo de 4 días como período de incubación.

Al comenzar nuestro trabajo, dejábamos fermentar un solo tubo de Hall con extracto de levadura por vez, ya que

todas las determinaciones analíticas que debíamos hacer con el mosto fermentado en el mismo día no nos permitían hacer más tubos al mismo tiempo. Los resultados que obtuvimos de distintos tubos fermentados por un mismo germen en distintas oportunidades fueron tan discordantes, que no pudimos sacar más que una conclusión: había que eliminar esas enormes diferencias entre tubo y tubo. Se trató de conseguirlo sembrando el cultivo esporulado en tierra a un tubo de papa-levadura, a las 48 horas de desarrollado pasteurizarlo 5 minutos a 80°C, luego inocular con este material un tubo con 10 ml. de medio de levadura y recién con este cultivo bien desarrollado inocular el tubo de Hall. Los resultados no llegaron a ser muy buenos, pero demostraron que, si se comparaban sólo aquellos datos que correspondían a los tubos en que había menos glucosa residual, las cantidades de los varios productos de fermentación en los distintos tubos eran bastante análogas.

Entonces se vió la necesidad de obtener datos promedios directamente y por lo tanto se decidió fermentar por vez diez tubos de Hall, analizar luego en cada uno la glucosa residual y la acidez producida y, en base a tales datos, mezclar los contenidos de los tubos análogos, analizando luego, en cuanto a los productos de fermentación, las dos o tres mezclas resultantes. Cada serie de diez tubos debía repetirse por lo menos dos veces, para ver si de esta manera los resultados eran concordantes.

En detalle, la técnica seguida se da a continuación.

A. Fermentaciones en medio de levadura + glucosa.

Primer "starter".

Del cultivo esporulado en tierra se pasa, con un ansa enroscada en forma de cestillo, un poco de tierra a dos tubos con medio de papa-levadura; se los incuba a 37°C y de-

ben comenzar a fermentar dentro de las 36 horas. Si esto no ocurre, hay que preparar un cultivo esporulado de mayor actividad.

Segundo "starter".

Una vez que los dos tubos del primer starter están fermentando 24 horas, se elige uno de ellos, se lo pasteuriza 5 minutos y se enfría rápidamente. Dos tubos de Hall se inoculan cada uno con 2,5 ml. del cultivo pasteurizado y se incuban.

Fermentación.

A las 48 horas los tubos del segundo starter deben estar bien fermentados. Se elige uno de ellos: se le saca el líquido por encima de la bolita de vidrio y se le quita ésta mediante una cucharita de vidrio estéril. Se homogeneiza bien el cultivo (esto es importante para el 1-1 y 4-2 que dan un desarrollo mucoso) y se inoculan 5 tubos de Hall cada uno con 3 ml. del segundo "starter". El resto se pasteuriza 5 minutos, se enfría bajo canilla y se usa para inocular otros 5 tubos de Hall. Los 10 tubos se incuban 4 días a 37°C.

La temperatura de pasteurización fué en general de 70-75°C, pero tuvo que ser disminuída a 50-55°C para los cultivos 4-1, D y B-8-3, cuya resistencia a las temperaturas elevadas es muy escasa, debido a su difícil esporulación.

Análisis.

Al terminar el cuarto día, se saca de cada tubo el líquido de cierre y se usa 1 ml. del mismo para la reacción del acetilmetilcarbinol. Del mosto fermentado en anaerobiosis se extrae de cada tubo, con sendas pipetas estériles, la cantidad necesaria para el análisis de glucosa residual y acidez.

Los tubos, con el resto del mosto fermentado, se guardan en la heladera y, una vez conocido el resultado del

análisis previo, se mezclan volúmenes iguales de los mostos análogos, siempre manteniendo separados los que provienen del "starter" pasteurizado o no.

En cada mezcla se determina el pH, luego se la centrifuga: una porción de la misma (de 2 a 5 ml.) sirve para determinar ácido butírico y acético; otra porción (20 ml.) se destila en medio alcalino y el destilado se usa para determinar solventes de acuerdo a los métodos dados anteriormente.

B. Fermentaciones en masa de maíz al 5 %.

Con el cultivo esporulado en tierra se inocula un tubo de ensayo con masa de maíz ("starter"). A las 48 horas, con una pipeta de 10 ml. de punta bien abierta, se inoculan 3 tubos grandes de masa de maíz, cada uno con 3 ml. de la masa fermentada del "starter". Después de 4 días de incubación a 37°C, se saca de cada tubo el líquido sobrenadante; se analiza en cada uno la acidez y se hace la reacción de Barritt. Si la acidez es aproximadamente la misma en los 3 tubos, se mezclan partes iguales de los respectivos líquidos y se hacen las determinaciones de ácidos y solventes como en el caso de las fermentaciones en extracto de levadura. En este caso no es necesario centrifugar, porque se forma poca espuma.

Resultados de las fermentaciones

A. En medio de levadura + glucosa.

En la tabla 15 figuran los resultados de las fermentaciones llevadas a cabo en el medio de levadura, ya sea con el segundo "starter" pasteurizado o no.

Existe una mayor concordancia entre los datos obtenidos sin la pasteurización: ello puede ser debido a que el medio de levadura, totalmente líquido, no es muy favorable a la esporulación; luego, al morir por el calentamiento las formas vegetativas, quedarían muy pocos núcleos para comenzar enseguida una buena fermentación.

Consideremos entonces los promedios de los resultados obtenidos sin pasteurizar el segundo "starter", los que están en la tabla 16.

Con respecto a la capacidad de consumir glucosa, se observa que todos los microorganismos fermentan por lo menos el 45 %; es interesante ver que un Cl. acetobutylicum, el E-8-3, es capaz de consumir la mayor parte de la glucosa presente (promedio 82 %), mientras que, según el trabajo de Langlykke y colaboradores /33/, los acetobutílicos fermentan alrededor del 50 % de la glucosa. Dichos autores no especifican la preparación del medio de levadura que utilizan, pero, a juzgar por los resultados, parecería que el medio de cultivo fuera distinto al nuestro y es posible que ellos no autolizaran la levadura.

En cuanto al pH, después de 4 días de incubación, no difiere grandemente de un germen a otro: varía entre 4,2 y 6,0 en todo el grupo estudiado, pero en un mismo organismo hay fácilmente variaciones de hasta 0,5 unidades entre una experiencia y otra. En forma de curvas de pH hechas a lo largo de una fermentación en gran escala los datos de pH

T A B L A 15

Fermentaciones en medio de levadura

C e p a	Nº	°C	Glucosa		pH	Acidez: NaOH N/20 por 5 ml. cultivo	Acidos		S o l v e n t e s				
			Residual	Fermentada			butírico	acético	butanol	acetona	etanol	iso- propanol	
Tipo			g/l.	g/l. %		ml.	g/l.	g/l.	g/l.	g/l.	g/l.	g/l.	g/l.
Clostridium pasteurianum	87	-	11,0	14,0	56	4,8	5,09	5,53	0,50	1,60	0,17	0,17	0
		-	13,0	12,0	48	4,6	4,65	4,60	0,60	1,24	0,05	0,25	0
		-	9,3	15,7	65	4,6	5,31	4,37	1,67	1,92	0,04	0,54	0
	-	12,0	13,0	52	4,7	5,48	4,80	1,00	1,55	0,19	0,24	0	
	-	13,5	11,5	46	4,6	4,50	5,27	0,10	0,48	0,02	0,17	0	
	-	17,4	7,6	30	4,8	4,43	4,53	0,67	0,48	0,05	0,32	0	
	-	10,5	14,5	58	4,7	5,37	5,00	1,67	1,17	0,04	0,47	0	
	-	13,1	11,9	48	4,7	4,38	4,50	1,07	1,16	0,04	0,37	0	
	-	9,6	15,4	61	4,9	4,69	4,30	1,15	2,09	0,29	0,51	0	
	-	10,2	14,8	59	5,0	4,42	5,97	1,03	2,49	0,28	0,42	0	
Clostridium acetobutylicum	D	30-35	9,2	10,0	70	4,7	4,52	4,70	1,37	2,50	0,27	0,27	0
		50-55	9,9	15,1	60	4,4	9,32	3,61	2,83	1,19	0,26	1,27	0
		-	13,3	11,7	47	4,5	8,82	5,10	2,20	0,53	0,04	1,10	0
	-	12,5	12,5	50	4,2	9,33	5,48	2,54	0,35	0,16	1,30	0	
	50-55	12,7	12,3	49	4,5	8,45	3,07	2,42	0,34	0,05	0,96	0	
	50-55	12,1	12,9	52	4,2	9,54	3,68	2,40	0,22	0,13	1,12	0	
	-	8,5	17,7	71	4,4	9,42	4,17	2,17	0,73	0,30	1,25	0	
	-	4,2	20,8	83	4,4	8,30	5,32	1,90	1,83	0,89	0,90	0	
	-	0	25	100	4,6	5,97	1,97	1,95	3,98	0,87	0,81	0	
	-	2,0	23,0	92	4,8	6,55	2,41	2,87	2,97	0,96	1,00	0	
B-8-5	-	7,7	17,5	69	4,5	8,30	3,90	2,19	1,51	0,50	1,01	0	
	50-55	8,2	17,8	71	4,3	9,91	4,13	2,45	0,63	0,25	0,99	0	
	50-55	0	25	100	4,7	5,70	1,85	2,18	3,80	1,06	0,83	0	
	50-55	2,2	22,8	91	4,6	6,75	2,98	2,11	5,04	1,21	1,07	0	
50-55	5,6	19,4	77	4,5	8,47	3,74	2,15	1,80	0,73	0,98	0		

T A B L A 16

Fermentaciones en medio de levadura
(promedios de los ensayos efectuados sin pasteurizar el segundo "starter")

C e p a	N°	Glucosa		pH	Acidez: NaOH N/20 por ml. cultivo	Acidos		A l c o h o l e s				
		Residual g/l.	Fermentada g/l. %			butírico g/l.	acético g/l.	butanol g/l.	acetona g/l.	etanol g/l.	iso- propanol g/l.	
Clostridium pasteurianum	87	11,1	13,9	50	4,05	5,02	4,83	0,86	1,61	0,09	0,25	0
	181	9,9	15,1	60	4,95	4,28	4,13	1,08	2,29	0,28	0,46	0
Clostridium saccharobutyricum	179	1,0	24,0	96	5,4	1,85	0,93	1,49	4,59	0,10	0,24	0,98
	180	2,0	25,0	92	5,7	1,22	0,69	1,69	5,04	0,17	0,46	1,51
Clostridium fulvum	1-1	0,9	24,1	97	5,1	3,53	0,38	2,71	4,97	1,24	1,56	0
	4-2	13,8	11,2	46	4,45	7,57	2,56	2,81	1,11	0,15	1,24	0
	4-1	4,7	20,3	81	4,45	6,61	1,65	3,51	3,52	1,00	1,25	0
Clostridium acetobutylicum	D	12,9	12,1	46	4,25	9,08	3,29	2,27	0,44	0,10	1,20	0
	B-8-5	4,4	20,6	83	4,55	7,71	3,26	2,27	2,16	0,70	0,99	0

deben resultar sumamente útiles en la industria, pero medidas aisladas, aunque sea siempre después de un mismo período de incubación, no pueden servir en la diferenciación de las cepas.

La determinación de acidez total adolece del mismo defecto, aunque ya difiere más que el pH entre un germen y otro. Se observa que en el medio de levadura son productores máximos de acidez los acetobutílicos; les siguen los felsíneos y los del tipo "pasteurianum", mientras que los sacarobutíricos dan muy poca acidez.

Mucho más interesante resulta la determinación de los ácidos butírico y acético por separado. Hay más butírico que acético en los del tipo "pasteurianum" y en los acetobutílicos; hay menos en los sacarobutíricos y en los grandes enriadores. La relación entre la concentración de ambos ácidos está calculada en la tabla 17 y parece ser un buen índice en la diferenciación de las cepas.

T A B L A 17

C e p a		Relación = $\frac{\text{ácido butírico}}{\text{ácido acético}}$ en medio de levadura
tipo	Nº	
Cl. <i>pasteurianum</i>	87	5,6
	181	3,8
Cl. <i>saccharobutyricum</i>	179	0,62
	180	0,41
Cl. <i>felsincum</i>	1-1	0,14
	4-2	0,91
	4-1	0,50
Cl. <i>acetobutylicum</i>	D	1,45
	B-8-3	1,47

Si se consideran los solventes obtenidos, por de pronto se diferencia el tipo "saccharobutyricum" por la presencia del isopropanol; si luego se observa la relación entre las concentraciones de los solventes, la que figura en la tabla 18, se nota que la diferencia entre los felsíneos y acetobutílicos es poco nítida y que depende más bien en ambos tipos de gérmenes del porcentaje de glucosa consumida.

Es notable que en medio de levadura con glucosa siempre se obtenga más etanol que acetona, mientras que luego se verá que en masa de maíz, cuando el rendimiento en solventes es apreciable, siempre hay más acetona que etanol.

T A B L A 18

C e p a.		Relación butanol:acetona:etanol:(isopropanol)
tipo	Nº	en medio de levadura + glucosa
Clostridium pasteurianum	87	6,4 : 0,36 : 1
	181	5,0 : 0,61 : 1
Clostridium saccharobutyricum	179	19,1 : 0,42 : 1 : 4,1
	180	12,6 : 0,43 : 1 : 3,3
Clostridium felsineum	1-1	3,7 : 0,91 : 1
	4-2	0,90 : 0,12 : 1
	4-1	2,6 : 0,80 : 1
Clostridium acetobutylicum	D	0,37 : 0,08 : 1
	B-8-3	2,2 : 0,71 : 1

B. En masa de maíz al 5 %.

Consideremos ahora las fermentaciones en masa de maíz, cuyos resultados están expuestos en la tabla 19.

La acidez es aquí máxima en los felsíneos, les siguen los acetobutílicos y finalmente los del tipo "saccharobutyricum" y "pasteurianum" que dan muy poca acidez.

La relación entre ácido butírico y acético no presenta variaciones tan nítidas como en el medio de levadura: sólo se puede decir que hay más butírico que acético en los del tipo "pasteurianum" y "saccharobutyricum", hay menos en los acetobutílicos y la relación es variable, aunque bastante cercana a 1 en los felsíneos.

En cuanto a los solventes, en ningún caso se ha obtenido isopropanol, pero en muchos casos las concentraciones de solventes son tan exiguas que ya no se tiene mucha seguridad en los análisis. Por la misma razón no se puede hablar de relación de solventes más que en el caso de los acetobutílicos y de algunos felsíneos, donde se tiene:

Clostridium	{	1-1	butanol:acetona:etanol = 5,3 : 2,3 : 1
felsineum		4-1	" " " = 3,7 : 1,5 : 1
Clostridium	{	D	" " " = 6,1 : 2,7 : 1
acetobutylicum		B-8-3	" " " = 5,7 : 3,4 : 1.

Las relaciones calculadas en base a los datos de McCoy y McClung /31/ son las siguientes:

Cl. felsineum	butanol:acetona:etanol = 6,7 : 3,4 : 1
Cl. roseum	" " " = 4,8 : 2,2 : 1
Cl. acetobutylicum	" " " = 6,4 : 3,1 : 1.

Habría que ver si repetidos "heat shocks" en un medio favorable a la esporulación modifican o no tales relaciones en forma apreciable o si se consigue una mejora en el rendimiento.

T A B L A 19
Fermentaciones en masa de maíz

C e p a	Nº	Acidez: NaOH N/20 por 5 ml. de cultivo	A c i d o s		S o l v e n t e s				
			butíricoacético		acetone	etanol	iso- propanol		
			g/l.	g/l.	g/l.	g/l.	g/l.		
		ml.							
Clostridium pasteurianum	87	0,50	0,23	0,19	0	0,02	0,08	0	0
	181	0,65	0,51	0,14	0	0,01	0,64	0	0
Clostridium saccharobutyricum	179	0,95	0,48	0,18	0,01	0,02	0,09	0	0
	180	1,48	0,79	0,25	0,06	0,05	0,07	0	0
	1-1	7,08	1,74	2,42	5,48	1,50	0,66	0	0
Clostridium falsinum	4-2	5,58	2,54	1,27	0,08	0,05	0,12	0	0
	4-1	5,22	1,73	1,60	0,36	0,35	0,24	0	0
Clostridium acetobutylicum	D	5,10	0,58	0,84	4,67	2,07	0,77	0	0
	2-8-5	3,72	0,95	1,04	5,25	3,10	0,92	0	0
		medio sin sebrar							
		0,30							

Resumen

La investigación, que fué realizada con finalidad taxonómica a la par que con el propósito de poner a punto y dominar las técnicas analíticas necesarias para el estudio de los balances de fermentación, no alcanzó íntegramente el propósito inicial. Sin embargo, la experiencia alcanzada nos coloca en una posición tal, que nos será mucho más fácil obtener resultados que signifiquen alguna contribución al conocimiento del tema.

Los métodos analíticos para determinar azúcares reductores, butanol, etanol, acetona, alcohol isopropílico, ácidos butírico y acético fueron examinados por pruebas testigos hasta conocer sus limitaciones y errores y luego aplicados a los líquidos fermentados. Los métodos utilizados son del tipo semi-microquímico y han dado resultados compatibles con la exactitud requerida para los balances de fermentación. Prácticamente se han introducido pocas variantes sobre las técnicas descritas originalmente.

Las cepas que hemos estudiado son muy pocas (9) para poder intentar un examen sistemático crítico útil y además su origen y autenticidad no nos han sido garantizados, de modo que los nombres de cuatro de ellas (87: Clostridium granulobacter pectinovorum, 181: Clostridium beijerinckii, 179: Clostridium butylicum y 180: Clostridium acetobutylicum) pueden no corresponder a las especies de esa designación. Tres cepas de Clostridium felsineum dadas por el Ing. Agr. Santos Soriano corresponden sin duda a la especie. Dos de Clostridium acetobutylicum son casi con certeza también auténticas y así lo consideraremos.

La fermentación fué estudiada en un medio de levadura (autolizado de levadura) con glucosa y en mosto de maíz completo. Los resultados difieren de manera tan marcada,

que el hecho merece la mayor atención y deberá ser estudiado, pues ofrece perspectivas interesantes. En efecto, en el medio de levadura la cantidad de solventes neutros formados contradice la idea corriente de que los "butíricos" apenas los producen, en comparación con los verdaderos formadores de solventes. En cambio dicha idea es correcta para el caso del medio de maíz, cuando la fuente hidrocarbonada está constituida casi exclusivamente por el almidón. De igual manera la proporción relativa de los distintos solventes no es la misma en el medio de levadura que en el medio de maíz.

Hemos confirmado el significado práctico y quizás de valor taxonómico de la licuación de la gelatina, del enriado del lino, de la formación de isopropanol, de la del acetilmetilcarbinol.

La proporción de ácidos acético y butírico en el medio de levadura se ha mostrado como una propiedad relativamente constante y distintiva de por lo menos dos de los cuatro grupos de bacterias que hemos creado por razones prácticas y no taxonómicas. Dicha propiedad está asociada con otras, como la de formar isopropanol. De su valor práctico nada puede adelantarse y menos aún de su significado taxonómico.

En el cuadro 20 de la página siguiente figuran en resumen las propiedades que mayor significado tienen para intentar una diferenciación de las bacterias estudiadas.

T A B L A 20

Tipo de cepa	Reacción de la granulosa	Licuección de la gelatina	Acetilmetil-carbimol	Enriado	Ataque del almidón	Isopropanol en medio de levadura	á. butírico á. acético en medio de levadura	acidéz en raíz: ml. de NaOH N/20 por 5 ml. cultivo
<i>Clostridium pasteurianum</i>	+	-	-	-	-	-	5 - 6	0,5
<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	+	-	-	-	(+)	+	0,4 - 0,6	1
<i>Clostridium felsinum</i>	+	-	+	+++	++ "sobrero" 3 veces	-	0,1 - 0,9	5 - 7
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	+	+	-	(+)	+++ "sobrero"	-	1,5	5 - 7

Conclusiones

1. La aplicación de métodos semi-microquímicos conocidos para la determinación de azúcares reductores, butanol, etanol, isopropanol y acetona, y ácidos butírico y acético es relativamente simple y da resultados suficientemente exactos para el estudio de balances de fermentación.
2. Por el estudio de cuatro cepas de clostridios del tipo butírico, de tres de Cl. felsineum y de dos de Cl. acetobutylicum fué posible establecer una diferenciación en cuatro grupos (o tipos) por lo menos:
 - tipo I: no producen prácticamente ácidos ni solventes a partir de almidón y no parecen atacar a este polisacárido (correspondería a la especie Cl. pasteurianum según la edición de 1948 de Bergey);
 - tipo II: no producen prácticamente ácidos ni solventes del almidón, pero lo transforman en un polisacárido de reacción distinta con el iodo y producen isopropanol a partir de la glucosa;
 - tipo III: especie Cl. felsineum (enriador);
 - tipo IV: especie Cl. acetobutylicum (licúa gelatina y no enría prácticamente).Las propiedades mencionadas están asociadas a algunas otras, que dan una base un poco más sólida a tal división provisoria.
3. La fermentación de la glucosa en un medio de levadura y la del almidón en un medio de maíz muestran diferencias tan importantes, que merecen ser investigadas sistematícamente.

Bibliografía

1. Pasteur L. - 1862 - Extrait des procès verbaux. Soc. Chim. Paris, Séance du 9 mai, p. 52.
2. Fitz A. - 1878 - Berichte, 11:42
- 1882 - Berichte, 15:867
- 1884 - Berichte, 17:1188.
3. Van Tieghem M. - 1877 - Sur le Bacillus amylobacter et son rôle dans la putréfaction des tissus végétaux. - Bull. Soc. Bot. France, 24:128.
4. Prozowski A. - 1879 - Zur Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten. - Botan. Zeit., 37:409.
5. Gruber M. - 1887 - Eine Methode der Cultur anaerobischer Bacterien nebst Bemerkungen zur Morphologie der Buttersäuregärung. - Centr. Bakt. Infektionskrankh., 1:367.
6. Perdrix M.L. - 1891 - Sur les fermentations produites par un microbe anaérobie de l'eau. - Ann. Inst. Pasteur, 5:287.
7. Botkin S. - 1892 - Über einen Bacillus butyricus. - Zeit. Hyg. Infektionskrankh., 11:421.
8. Grimbert M.L. - 1893 - Fermentation anaérobie produite par le Bacillus orthobutylicus. - Ann. Inst. Pasteur, 7:353.
9. Beijerinck M.W. - 1893 - Über die Butylalkoholgärung und das Butyl-Ferment. - Verhandl. Akad. Wetenschappen Amsterdam, Afd. Natuurkunde, Sectie II, Deel I.
10. Duclaux E. - 1895 - Sur la nutrition intracellulaire. - Ann. Inst. Pasteur, 9:811.
11. Grassberger R. und Schattenfroh A. - 1902 - Über Buttersäuregärung. - Arch. Hyg., 42:219.
12. Winogradsky S. - 1902 - Clostridium pasteurianum, seine morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment. - Centr. Bakt. Parasitenk., Abt. II, 9:43 y 107.

13. Stoddard - 1912 - Lancet, 1:12.
14. Tonasi A. - 1925 - Boll. Ist. Sierot. Milanese, 4:203.
15. Donker H.J.L. - 1926 - Bijdrage tot de kennis der boter-
zuurbutylalkoholen acetongistingen. -
Thesis, Technische Hoogeschool, Delft.
16. Sherman and Erb - U.S. Patent 2.017.572 - 1935.
17. Arnaudi - 1936 - Soc. Intern. Microbiol., Boll. Sez.
Ital., 8:251.
- 1937 - Boll. Ist. Sieroter. Milanese, 16:650.
18. Speakman H.B. - 1920 - The biochemistry of the acetone
and butyl alcohol fermentation of starch by
Bacillus granulobacter pectinovorum. -
Jour. Biol. Chem., 41:319.
19. McCoy E., Fred E.B., Peterson W.H. and Hastings E.G. -
1926 - A cultural study of the acetone butyl
alcohol organism. - Jour. Inf. Dis., 39:457.
20. Winogradsky S. - Sur le rouissage du lin et son agent
microbien. - Compt. rend. Acad. Sci. Paris,
121:744 - 1895.
21. Störmer K. - 1903 - Über die Wasserroste des Flachses. -
Mitteil. d. Deuts. Landwirts. Gesellsch.,
18:195.
- 1904 - Centralbl. f. Bakt., II, 13:35.
22. Beijerinck M.W. und van Delden A. - 1904 - Über die
Bakterien, die bei der Maceration des Leins
tätig sind. - Arch. Néerland. d. Sci.
Exactes et Nat., Sec. II, 9:423.
23. Makrinov I.A. - 1915 - A new microorganism bringing
about the fermentation of starch and pectous
materials. - Arch. Sci. Biol. (Rusia),
18:441.
24. Carbone D. e Tolbolato A. - 1917 - Sulla macerazione
della canapa. - Le Staz. Sper. Agrar. Ital.,
50:563.
25. Henneberg W. - 1922 - Centralbl. f. Bakt., II Abt.,
55:279.

26. Soriano S. - 1929 - Estudio sobre un bacilo anaerobio enriador del lino. - Tomo conmemorat. XXV anivers. fundac. Fac. Agr. Vet., Bs. As., p. 279.
- 1930 - Nuevo bacilo anaerobio enriador del lino. - Rev. Inst. Bact. Dep. Nac. Hyg., 5:741.
27. Ruschmann G. und Bavendamm W. - 1925 - Zur Kenntnis der Rosterreger Bac. felsineus Carbone und Plectridium pectinovorum (Bac. amylobacter A.M. et Bredenann). - Centralbl. f. Bakt., II Abt., 64:340.
28. Van Der Lek J.B. - 1930 - Onderzoekingen over de Butylalkoholgisting. - Thesis, Technische Hoogeschool, Delft.
29. Bergey et al. - 1930 - Manual of Determinative Bacteriology, 3rd. ed., pág. 453.
30. McCoy E. and McClung L.S. - 1935 - The serological relations of Cl. acetobutylicum, Cl. felsineum and Cl. roseum. - Arch. f. Mikrob., 6:239.
31. McCoy E. and McClung L.S. - 1935 - The nature and systematic position of a new chromogenic Clostridium. - Arch. f. Mikrob., 6:230.
32. McCoy E., Fred E.B., Peterson W.H. and Hastings E.G. - 1930 - A cultural study of certain anaerobic butyric-acid-forming bacteria. - Jour. Inf. Dis., 46:118.
33. Langlykke A.F., Peterson W.H. and McCoy E. - 1935 - Products from the fermentation of glucose and arabinose by butyric acid anaerobes. - Jour. Bact., 29:333.
34. McCoy E. and McClung L.S. - 1935 - The serological agglutination of Clostridium acetobutylicum and related species. - Jour. Inf. Dis., 56:333.
35. Sordelli A. y Soriano S. - 1928 - Aislamiento del Bac. felsineus y su existencia en la República Argentina. - Rev. Soc. Arg. Biol., 4:611.

36. Soriano S. - 1949 - Investigaciones sobre las bacterias anaerobias activas en el enriquecimiento industrial del lino. - Rev. Fac. Agr. Vet., 12:174.
37. Barrit M.M. - 1936 - The intensification of the Voges-Proskauer reaction by addition of α -naphthol. - Jour. Pathol. Bact., 42:441.
38. Hagedorn H.C. und Jensen B.N. - 1923 - Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid. - Biochem. Z., 135:46.
39. Shaffer P.A. and Hartmann A.F. - 1921 - The iodometric determination of copper and its use in sugar analysis. - Jour. Biol. Chem., 45:365.
40. Stiles H.R., Peterson W.H. and Fred E.B. - 1926 - A rapid method for the determination of sugar in bacterial cultures. - Jour. Bact., 12:427.
41. Shaffer P.A. and Sonogyi M. - 1933 - Copper-iodometric reagents for sugar determination. - Jour. Biol. Chem., 100:695.
42. Underkofler L.A., Guyton J.F., Raynon M.M. and Fulner E.I. - 1942 - A semi-micro method for the determination of reducing sugars in fermentation media. - Iowa State Coll. Jour. Sci., 17:251.
43. Sonogyi M. - 1945 - A new reagent for the determination of sugars. - Jour. Biol. Chem., 160:61.
44. Bogin C.D. - 1924 - Analysis of binary mixtures. Volumetric turbidity method. - Ind. Eng. Chem., 16:380.
45. Bakonyi S. - 1939 - Betriebskontrolle bei Butanol-Azeton-Anlagen. - Z. f. Spiritusindustrie, 62 (Nº 20):154.
46. Hsi Ch'ou Fang - 1932 - Study on the utilization of xylose. - Iowa State Coll. Jour. Sci., 6:423.
47. Stahly G.L., Osburn O.L. and Werlman C.H. - 1934 - Quantitative determination of acetone and ethyl, butyl and iso-propyl alcohols in fermentation liquors. - The Analyst, 59:319.

48. Christensen L.M. and Fulner E.I. - 1935 - Analysis of n-butanol, acetone, and ethanol in aqueous solutions. - Ind. Eng. Chem., An. Ed., 7:180.
49. Mouratoff M. - 1947 - Une méthode de dosage de l'alcool butylique normal formé dans les moûts soumis à la fermentation acétono-butylique. - Chin. Analytique, 29 (N° 2):29.
50. Johnson M.J. - 1932 - Determination of small amounts of ethyl and butyl alcohols. - Ind. Eng. Chem., An. Ed., 4:20.
51. Duclaux E. - 1895 - Sur le dosage des alcools et des acides volatils. - Ann. Inst. Pasteur, 9:265.
52. Green M.W. - 1940 - Determination of acetone. - Jour. Am. Pharm. Assoc., 29:33.
53. Messinger J. - 1888 - Titrimetrische Bestimmung von Aceton in Methylalkohol. - Ber. d. Deuts. Chem. Gesellsch., 21:3366.
54. Goodwin L.F. - 1920 - The analysis of acetone by Messinger's method. - Jour. Am. Chem. Soc., 42:39.
55. Virtanen A.I. and Pulkki L. - 1928 - The volatility with steam of water-soluble organic substances. - Jour. Am. Chem. Soc., 50:3138.
56. Osburn O.L., Wood H.G. and Werkman C.H. - 1936 - Determination of volatile fatty acids by the partition method. - Ind. Eng. Chem., An. Ed., 8:270.
57. Werkman C.H. - 1930 - Determination of organic acids. - Ind. Eng. Chem., An. Ed., 2:302.
Iowa State Coll. Jour. Sci., 4:459, 5:1 y 5:121.
58. Allgeier R.J., Peterson W.H. and Fred E.B. - 1929 - A colorimetric method for the determination of butyric acid. - Jour. Bact., 17:79.
59. Orla-Jensen S. - 1919 - The lactic acid bacteria, p. 84.
60. Hall I.C. - 1929 - A review of the development and application of physical and chemical principles in the cultivation of obligately anaerobic bacteria. - Jour. Bact., 17:255.

Indice

	Página
Definición del grupo de organismos en estudio	1
Antecedentes bibliográficos	2
Objeto del presente trabajo	7
Descripción de las cepas estudiadas y su origen	9
Métodos bacteriológicos	
a. Estudio de la morfología	11
b. Reacción de la granulosa	13
c. Licuación de la gelatina	15
d. Formación de acetilmetilcarbinol	17
e. Enriado	19
f. Ataque del almidón	20
Métodos químicos	
1. Determinación de azúcar residual	24
2-3. Determinación de alcohol butílico y etílico	26
Reactivos	27
Aparatos	28
Procedimiento	30
Cálculos para estandarizar el método	32
4-5. Determinación de acetona e isopropanol	40
Reactivos	42
Aparatos	43
Procedimiento	44
6. Determinación de pH	45
7. Determinación de la acidez total	45
8-9. Determinación de ácido butírico y acético	48
Medios de cultivo empleados en las fermentaciones	
Extracto de levadura de doble concentración	53
Medio de papa-levadura	54
Masa de maíz	54
Técnica de las fermentaciones	56

	Página
A. Fermentaciones en medio de levadura + glucosa	57
Primer "starter"	57
Segundo "starter"	58
Fermentación	58
Análisis	58
B. Fermentaciones en masa de maíz al 5 %	59
Resultados de las fermentaciones	
A. En medio de levadura + glucosa	60
B. En masa de maíz al 5 %	65
Resumen	66
Conclusiones	69
Bibliografía	70

Alvarez

Vera-Lah