

Tesis de Posgrado

Utilización industrial del maíz y de la melaza en la fermentación acetobutílica

Frére, Alberto Juan

1953

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:

Frére, Alberto Juan. (1953). Utilización industrial del maíz y de la melaza en la fermentación acetobutílica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0816_Frere.pdf

Cita tipo Chicago:

Frére, Alberto Juan. "Utilización industrial del maíz y de la melaza en la fermentación acetobutílica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1953. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0816_Frere.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

"Utilización industrial del maíz y de la melaza
en la fermentación acetobutílica"

El microorganismo usado era el "Clostridium acetobutylicum" (Weizmann).

Como materias primas se usó harina de maíz y melaza de caña de azúcar del litoral de la República.

Los medios semisintéticos ensayados estaban constituidos por un medio mineral básico con fosfatos, cloruros, sulfatos, sodio, calcio, potasio y magnesio; glucosa; asparagina y autolizado de levadura.

Para la observación de colonias y su aislación se preparó un medio de Agar extracto de malta.

Para investigar la fermentación de azúcares y otras sustancias se hizo uso de un medio basal con Peptona, púrpura de Bromo Cresol y Tioglicolato de Sodio al que se agregaba la sustancia en estudio.

Se tomaba como índice de la velocidad de fermentación, la producción de gases.

Para determinar la producción de solventes, la fermentación se desarrollaba en atmósfera de Nitrógeno. Y el curso de las mismas se seguía con determinaciones de acidez titulable y la concentración de azúcares. Al final de la fermentación se determinaba Butanol, Acetona y Etanol en el medio fermentado.

La concentración óptima del activador (Autolizado de levadura) en los medios semisintéticos era del 1,2 %.

Se observa que al aumentar la concentración de azúcares disminuye la actividad fermentativa relativa.

En el caso del maíz son convenientes concentraciones de alrededor del 6 % y en el de la melaza 5 %.

La fermentación del maíz produjo un 30 % de solventes industriales, de los cuales un 60 % era Butanol, un 30 % Acetona y un 10 % Etanol.

La fermentación de la melaza produjo un 15 % de solventes de ellos el 67 % era Butanol, el 23 % era Acetona y el 10 % Etanol.

Res. de Tesis! 816

Alfré

Alberto Juan Frére
Buenos Aires 1953.

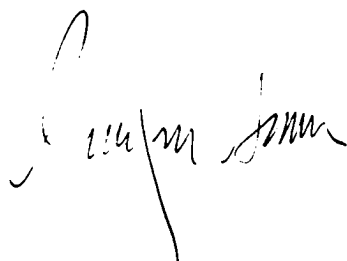
**Utilización industrial del maíz y
de la melaza en la fermentación acetobutílica**

**Tesis presentada a la
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
para optar al título de Doctor en Química**

por

Alberto Juan Prere

Buenos Aires 1953.



Tesis: 816

A mis padres

La parte experimental de este trabajo fué realizada en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Debo agradecer profundamente al Dr. Enrique Savino por su inteligente dirección y su ayuda constante, así como el haber facilitado las instalaciones del Instituto Malbrán para la preparación del activador. Asimismo hago extensivo mi agradecimiento a los Dres. Jorge Mendive y Eduardo Rennella por su cooperación. A todos ellos, muchas gracias.

I - ANTECEDENTES

Es Wurtz que en 1852 descubre el n-butanol en el aceite de fusel proveniente de la fermentación alcohólica. En 1862 Pasteur (1) demuestra que el n-butanol es producido directamente en las fermentaciones bacterianas.

El estudio de las bacterias relacionadas con la fermentación acetobutílica y similares se inicia en 1876 con Fitz (2) que describe un "Bacillus butylicus" capaz de fermentar glicerina, sacarosa, y manita con producción de butanol, ácido butírico, etanol, anhídrido carbónico e hidrógeno. Esta bacteria no fermentaba almidón ni celulosa. Vinculada con este tipo de bacterias estaba el "Bacillus amylobacter" de Van Tieghem (3) (1877); el "Clostridium butyricum" de Prazmowski (4) (1879) y las tres variedades I, II y III del "Bacillus amylobacter" que Gruber (5) en 1887 describe como productoras de butanol y ácido butírico por fermentación de carbohidratos. Igualmente relacionadas están el "Bacille amylozime" de Perdrix (6) (1891) y el "Bacillus butyricus" de Botkin (7) (1892). En 1893 Grimbert (8) estudia el "Bacillus orthobutylicus" diferenciándolo de las bacterias aisladas por Pasteur, Van Tieghem, Fitz y Perdrix.

Varios autores describen bacterias productoras de Butanol desde carbohidratos como el "Granulobacter butylicus" de Beijerinck (9) (1893); el "Amylobacter butylicus" de Duclaux (10) (1895); un bacilo anaeróbico de Emmerling (11) (1897); el Granulobacillus saccharobutyricus mobilis non liquefaciens" de Grassberger y Schattenfroch (12) (1902); el "Clostridium pasteurianum" de Winogradsky (13) (1902). En el año 1911 Fernbach y Weizmann (patente) descubren una bacteria del tipo de Fitz que fermenta la fécula de papa, dando butanol, acetona y alcohol amílico. Al año siguiente Weizmann (patente) aísla y patentó una bacteria que produce más acetona que el anterior y le propuso el nombre de "Bacillus granulobacter pectinovorum", el que más tarde se cambió por el de "Clostridium acetobutylicum" de Weizmann. En 1915 Weizmann patentó un procedimiento para producir acetona y butanol por fermentación del maíz y otros productos como trigo, arroz, avena, centeno, papas, etc. Se montaron algunas fábricas

cas para satisfacer las necesidades de la industria bélica que luego de terminada la guerra 1914/18 fueron abandonadas, pero poco después se instalan nuevamente al incrementarse el uso de la acetona, butanol y acetato de butilo como solventes industriales. En 1918 Weizmann monta una fábrica en los EE.UU. Desborough, Reilly, Thaysen y Henley patentan un procedimiento para aumentar la producción de acetona por agregado de ácido acético o acetatos a intervalos durante la fermentación. A partir de entonces se suceden los trabajos y patentes sobre el tema, se ensayan nuevos materiales como castañas, nueces y toda clase de sustancias amiláceas. Weizmann y Hamlyn (1919) patentan un procedimiento en que la masa esteril se inocular primero con cultivos de "Aspergillus oryzae" que produce las enzimas necesarias a la bacteria para su desarrollo. Por la misma época Speakman (14), Natham (15), y también Gill (16) aplican el procedimiento de Weizmann a la fermentación del maíz y de castañas de la India. Luego se suceden muchos trabajos sobre el tema y en particular se comienza a estudiar la bioquímica de la fermentación. Así Reilly, Mickinbottom, Henley y Thaysen (17) encuentran a los ácidos acético y butírico como productos intermedios. Speakman (18) hace estudios sobre la producción de gases (19) y la influencia de la configuración molecular de los azúcares y la producción de ácidos (20) y sugiere que el mecanismo de la fermentación procede, primero produciendo los ácidos butírico y acético, los cuales son reducidos luego a los correspondientes solventes. En el año 1926 Mc Coy, Fred, Peterson y Hastings (21) estudian 11 cepas de las bacterias productoras de acetona y butanol y proponen para el microorganismo el nombre con el cual se le conoce actualmente, esto es el "Clostridium acetobutylicum" (Weizmann). En 1927 Wilson, Peterson y Fred (22) encuentran que en la fermentación de una masa de maíz al 8 % por el Cl. acetobutylicum se producen de 300 a 400 miligramos de acetyl metil carbinol. Weyer y Rettger (23) estudian cepas aisladas de almejas en putrefacción, harina de maíz, suelo de jardín y otras fuentes, no encontrando diferencias cualitativas entre ellas en su poder fermentativo, proteolítico y en la aglutinación serológica. En 1929 Hopkins, Peterson y Fred (24)

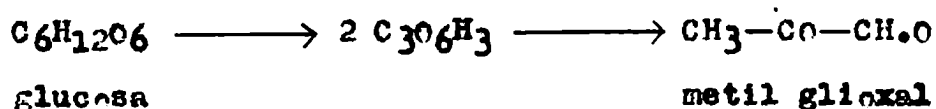
encontraron que el contenido en carbono y nitrógeno del *Cl. acetobutylicum* era de 47,4 % y 11,2 % respectivamente. Stiles, Peterson y Fred (25) (1929) estudiando los ácidos producidos en la fermentación acetobutílica comprueban que si se agrega ácido fórmico es descompuesto, probablemente para dar anhídrido carbónico e hidrógeno.

Peterson, Scott y Thompson (26) (1930) encontraron que se produce glucosa como producto intermedio en la fermentación del almidón y de la celulosa por el "*Cl. acetobutylicum*". Wilson y sus colaboradores (27) (1930) hallaron que la bacteria que nos ocupa es capaz de utilizar proteínas, peptona o aminoácidos como fuente de Nitrógeno.

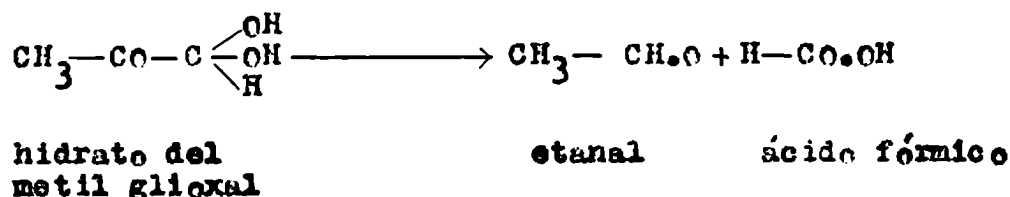
Wynne (28) (1931) estudió el efecto inhibitorio de 30 ácidos orgánicos e inorgánicos. Johnson, Peterson y Fred (29) (1931) miden el potencial de oxireducción de la fermentación acetobutílica y encuentran que al principio de la fermentación (8 hs.) es de +0,008 V aumenta a +0,027 V a las 48 hs., baja a +0,005 V a las 72 hs. a partir de donde se mantiene constante.

Kluyver (30) (1931) formuló el siguiente esquema para la fermentación acetobutílica:

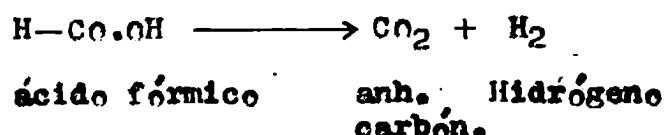
1)



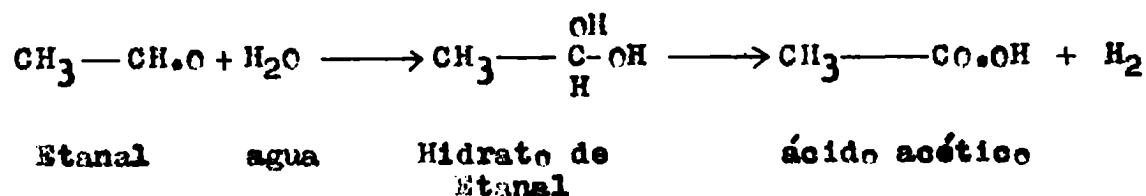
2)



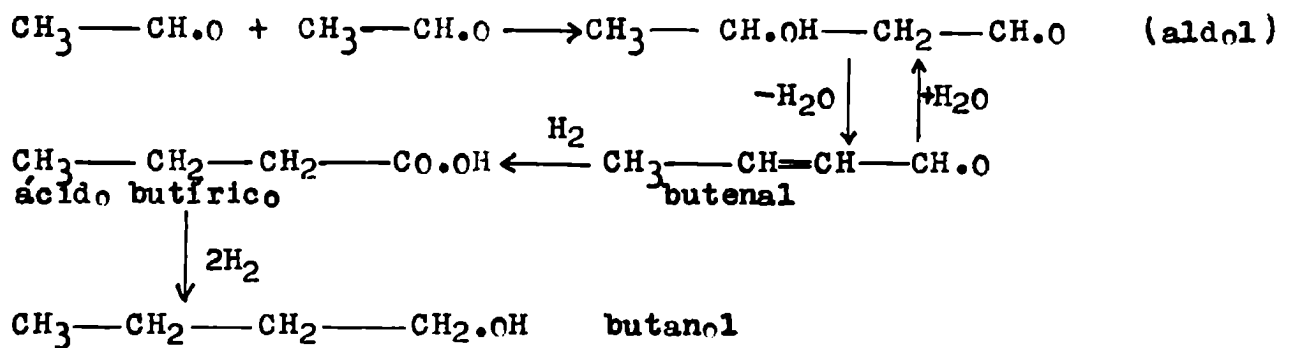
3)



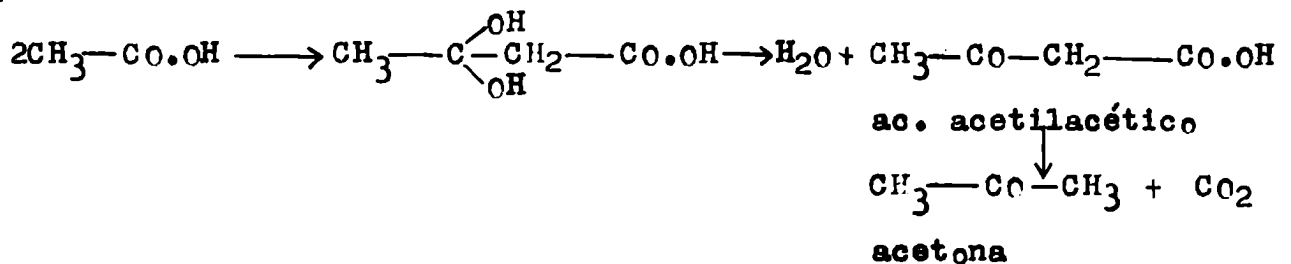
4)



5)



6)



Peterson y Fred (31) (1932) hicieron un estudio muy completo del "Cl. acetobutylicum" en la fermentación de la harina de maíz bajo el punto de vista bacteriológico, bioquímico y de la producción de solventes. Wynne y Pett (32) (1932) estudiaron la formación del metil glicoxal por el "Cl. acetobutylicum".

Weinstein y Rettger (33) (1933) afirman que para obtener una producción normal de solventes son necesarias sustancias que contengan prelamina.

Johnson, Peterson y Fred (34) (1933) investigaron las sustancias intermedias en esta fermentación por dos caminos: 1) aislación de los compuestos intermedios; 2) determinación de su fermentabilidad y llegaron a los siguientes resultados: El ácido acetacético (el agente descarboxilante parece ser intracelular) y el ácido piruvico son sustancias intermedias. No se puede aislar ni fermentar el ácido hidroxibutírico.

Johnson y Wynne (35) (1935) fracasan en la demostración de la presencia de amilasa en las células de esta especie pero obtienen preparaciones enzimáticamente activas de medios libres de células en los cuales el "Cl. acetobutylicum" había sido cultivado.

Mc. Coy y Mc. Clung (36) (1935) hacen un estudio serológico de veintidos cepas de "Cl. acetobutylicum" por la técnica de aglutinación H-O y encuentran marcada homogeneidad.

Knaysi y Dutky (37) (1936) miden el potencial de oxireducción de un Clostridium productor de butanol y hallan que en ausencia de oxígeno el organismo crece en un medio con un potencial ligeramente debajo de +0,335 volts respecto del potencial normal de Hidrógeno. Una presión de oxígeno correspondiente a un potencial alrededor de +0,3 volts inhiben el desarrollo.

Underkofler, Christiansen y Fulner (38) (1936) hacen un estudio muy completo de la fermentación acetobutílica de varios carbohidratos y afirman que sin afectar los rendimientos se puede reemplazar el 90% de la harina de maíz por almidón, el 80% por sacarosa y el 40% por xilosa. Encuentran también que al disminuir la razón superficie/volumen aumentan los rendimientos.

Weizmann y Rosenfeld (39) (1937) encuentran que para la fermentación acetobutílica sea normal son necesarios dos factores uno que es la asparagina y otro que no llegan a identificar que se encuentra en el salvado, en plantas y semillas verdes y en extractos de levadura; los autores suponen sea una coenzima.

Mc. Daniel, Woolley y Peterson (40) (1939) estudian factores de crecimiento y los hallan en el hígado, levadura malta germinada, maíz amarillo, salvado de trigo y preparaciones vitamínicas comerciales. Las sales de cobre solubles en alcohol dan un estímulo detectable a concentraciones de 0,01γ por mililitro y efecto máximo a 1γ por mililitro.

Weizmann y Rosenfeld (41) (1939) indican que para una fermentación normal son necesarios, en un medio sintético, biotina, asparagina y un tercer factor desconocido presente en extracto de levadura. En este sentido Oxford, Lampen y Peterson (42) (1940) afirman que no hay correlación estricta entre desarrollo y fermentación, así para un crecimiento normal se precisan dos factores: biotina y otro desconocido pero que obtienen en forma muy concentrada, pero para que al mismo tiempo la producción de solventes sea normal son necesarios otros factores.

Manteifelj (43) (1941) estudia la producción de proteinasa por la bacteria acetobutílica y observa que sólo se produce en presencia de proteínas degradadas y que la actividad de proteinasa es paralela a

la de la autólisis de la bacteria.

Davies, Ronald y Stephenson (44) (1941) sostienen que sólo las células cosechadas después de la aparición de acetona en el cultivo contienen las enzimas necesarias para dar una fermentación normal.

Algunos autores ensayan nuevas materias primas para la fermentación acetobutílica, así Wiley, Averill, Johnson, Mc. Coy y Peterson (45) (1941) usan desechos del licor al sulfito.

Wendland, Ray, Fulner y Underkofler (46) (1941) usan la levulosa obtenida de una especie de girasol (Jerusalem artichokes).

Rubbo, Maxwell, Fairbridge y Gillespie (47) (1941) en un estudio sistemático desde el punto de vista bacteriológico del C1. acetobutylicum afirman que un factor esencial es el ácido p-aminobenzoico aunque no estimula la producción de acetona para lo cual es necesario otro factor, probablemente una coenzima relacionada con las bases nitrogenadas.

Lampen y Peterson (48) (1941) llegan a esclarecer la naturaleza de los factores de crecimiento para esta bacteria se tratan de la biotina y del ácido p-amino benzoico. Davies (49) (1942) en un interesante trabajo sobre los productos intermedios confirma en parte el mecanismo sugerido por Kluyver para esta fermentación. Banzon, Fulner y Underkofler (50) (1941) estudian el uso de la harina de casabe para la producción de acetona y butanol por fermentación.

Pittman (51) (1946) encuentra que el C1. acetobutylicum es más sensible a los cambios de pH que al contenido en sales. Varios autores estudian la producción de riboflavina por esta bacteria entre ellos: Tanner, Vojnovich y Van Lanen (52) (1945).

Rodgers, Henika y Hanson (53) (1946). Levinton (54) 1946). Sebek (55) (1947). Otros como Housewright, Riley y Koser (56) (1944) utilizan el C1. acetobutylicum en el análisis del ácido p-aminobenzoico.

En cuanto a nuevas materias primas Ieruslimskii y Semenova (57) (1946) ensayan las melazas de remolacha. Marroquín, Sánchez y Hernández Cabrera (58) (1948) usan centeno, jugos de tomate, ananás y de naranja, frutos de papaya, etc.

Wood, Brown y Werkman (59) (1945) y Simon (60) (1947) realiza experiencias tendientes a formular un mecanismo de la fermentación acetobutílica usando C^{13} .

Beesch (61) (1952) entre otras experiencias encuentra que el cobre, el mercurio y el antimonio (en ese orden) tienen efecto inhibitorio de la fermentación.

II - MATERIAL UTILIZADO

En nuestros ensayos se usaron tres cepas de "Clostridium acetobutylicum" (Weizmann), las que fueron facilitadas por el Instituto de Microbiología Agrícola del Ministerio de Agricultura, por lo que agradecemos la gentileza y figuran catalogadas como B-8-3; B-8-4 y B-8-6-. El origen de las mismas es el siguiente:

B-8-3 origen: A.T.C.C. (American Type Culture Collection); Mc Coy, Fred, Peterson y Hastings () N° 824, 1948.

B-8-4 origen: N.R.R.L. (Northern Regional Research Laboratories); Mc. Coy, Fred, Peterson y Hastings () N° 527, 1948.

B-8-6 origen: L. D. Galloway (Londres) N° 14.

El microorganismo utilizado está ubicado en la clasificación del manual Bergey (año 1948) en la clase: Schizomycetes, orden: Eubacteriales, suborden: Eubacteriineae, familia Bacillaceae, género: Clostridium.

Como materias primas se usaron harina de maíz y melaza de caña de azúcar del litoral de la República.

Para las pruebas de fermentación de azúcares se usó un medio básico de agua de peptona (a pH = 7), púrpura de bromo cresol (concentración final del indicador: 0,1 o/oo y macerado de maíz al cual se agregaba la cantidad necesaria de una solución al 20% del azúcar que se investigaba para tener al final una concentración del 1%.

Los medios semisintéticos ensayados estaban constituidos, por: medio mineral básico, glucosa al 0,5% asparagina al 0,4% y autolizado de levadura.

III - TÉCNICA Y MÉTODOS DE BACTERIO

a) Medios de cultivo.

El medio mineral básico era el siguiente: ácido fosfórico siruposo (85%): 1,32 ml.; cloruro de sodio, 3 grs.; Sulfato de Magnesio, 0,05 grs.; Cloruro de Calcio, 0,01 grs.; solución acuosa de hidróxido de potasio al 20%, 10,5 ml.; agua destilada C.S.P., 1 litro. Corrección del pH a 6,8 y luego se esterilizaba en autoclave a 120 grados centígrados durante 15 minutos. A este medio se agregaba luego 5 grs. de glucosa y 4 grs. de asparagina, se entubaba y se esterilizaba en autoclave a 110 grados centígrados media hora. Finalmente se agregaba a cada tubo, en condiciones estériles, los activadores.

El autolizado de levadura fué preparado siguiendo el método de Grassmann y Haag (62) (1927) citada por Savino y Rennella (63) (1944) y para ello a 1 Kg. de levadura de cerveza se agregó 100 ml. de acetato de etilo y se agitó con espátula de vidrio hasta obtener la plasmolisis de la levadura. Entonces se agregó solución de PO_4HNa_2 al 10% hasta llevar a pH.6,8-7,0. Se dejó 2 horas a temperatura ambiente, se rectificó el pH/ y se agregó 100 ml. de Toluol y en un frasco bien tapado se llevó a estufa a 37 grados centígrados. Al día siguiente se llevó nuevamente a pH/ 6,8-7,0 con la solución de PO_4HNa_2 y se puso en estufa por 48 horas. Luego el líquido se dializó en bolsas de papel celofán, el líquido exterior eran 4 litros de agua destilada con 150 ml. de Xilol y 150 ml. de Cloroformo. Después de 24 horas de diálisis, se retiró el líquido exterior mediante un sifón y se colocó otros 4 litros de agua con Xilol y Cloroformo. Esta operación se repitió tres veces y los líquidos exteriores se concentraron al vacío hasta aparición de un enturbiamiento (más o menos 600 ml.). Para esta operación se usó un balón Pyrex de 25 litros conectado mediante un refrigerante a un kitasato de 5 litros y este a la trompa de agua. El kitasato se rodeaba con una mezcla de hielo y sal; el balón se calentaba mediante un baño de agua a 80 grados centígrados. El líquido concentrado se dejó dos días en cámara fría con lo que se formó un precipitado amorfo que fué separado por filtración.

En el curso de las experiencias se usaron dos autolizados de levaduras, uno cedido gentilmente por el Dr. Enrique Savino, Director del Instituto Malbrán que contenía 2,5% de Nitrógeno total y el otro preparado por nosotros contenía 1,34% de Nitrógeno total.

El Hidrolizado de caseína que se usó fué preparado según el método de Mueller y Johnson (64) (1941) y facilitado también por el Dr. Enrique Savino.

Para la observación de colonias y su aislación se preparó un medio de Agar-extracto de malta de la siguiente manera: agar-agar, 20 gr.; extracto de malta 50 grs.; agua 1 litro; se disolvió primeramente el extracto de malta en el agua y luego se agregó el agar, se llevó a pH.6,8 se envasó en tubos de Veillon para la observación de colonias profundas y en cajas de Petri para colonias superficiales y se esterilizó a 120 grados centígrados 20 minutos.

Para investigar la fermentación de azúcares y otras sustancias se preparó el siguiente medio básico; Peptona, 5 gr.; Púrpura de bromo cresol 0,05 gr.; Tioglicolato de sodio 1 gr.; se llevó a 500 ml. con agua se ajustó el pH. a 6,8, se envasó en tubos de ensayo, con campanita para observar producción de gas; se esterilizó a 110 grados centígrados durante media hora. Aparte se prepararon soluciones al 20% de los distintos azúcares y otras sustancias que se ensayaron, se esterilizaron a 110 grados durante media hora y se distribuyeron asépticamente 0,5 ml. de la solución en cada tubo con 9 ml. de medio básico. Se siguió para esto el método recomendado por Soriano (65) (1938): se separan tantos lotes de tubos con medio básico como el número de sustancias que se van a probar, cada uno compuesto por un número de tubos igual al número de cepas que se sembrarán en el día más uno para el control de esterilidad de cada sustancia. Los tubos de cada lote se marcan con una misma cifra romana indicadora de la sustancia que se ensaya. A continuación se reparten en estos tubos las sustancias del ensayo. Al terminar de repartir las sustancias se vuelven a hacer otros lotes constituidos por un tubo de cada sustancia e indicando la nueva serie por otra cifra (por ejemplo con cifras arábigas que indicará el número de cada cultivo) al final de lo cual quedará sobrando un tubo de cada sustancia que se reunirán en otro

lote y se usará para el control de las sustancias a ensayar. A cada uno de estos lotes se agrega un tubo más con medio básico que servirá para el control de este medio para probar el comportamiento de cada cultivo. En nuestro caso había cuatro lotes, uno para cada cepa y otro para el control de esterilidad. En los tubos de los tres primeros lotes se sembró 0,5 ml. de una suspensión de cada cepa en agua destilada, obtenida desliendo en el agua colonias desarrolladas en agar de malta.

El macerado de maíz fué preparado en la siguiente forma: se colocaron 700 gr. de maíz entero con 1 litro de agua corriente y 10 ml. de Cloroformo (para evitar el desarrollo de microorganismos) durante cinco días en estufa a 50 grados. Cada 24 horas se cambiaba el maíz y se llevaba el líquido, nuevamente a 1 litro con agua. Al terminar la maceración se filtró, el líquido resultante, con tierra filtrante por papel. Luego se esterilizó por filtro Seitz. Antes de usarlo se colocó durante 48 horas a 37 grados para eliminar el Cloroformo. Siempre se tuvo la precaución de no calentar nunca sobre los 60 grados para evitar la coagulación del macerado.

El medio para determinar la concentración óptima de activador era el siguiente: al medio mineral básico ya descrito se agregaba sacarosa, 2 gr. y asparagina 0,1 gr. por cada 100 ml. de solución. Se corregía el pH. a 6,8, se distribuía en tubos de Hall pequeños, se esterilizaba media hora a 110 grados y luego se añadía asepticamente el activador en cantidades adecuadas para obtener las concentraciones deseadas.

El medio para estudiar la influencia de la concentración de sacarosa era semejante al anterior pero dejando fija la concentración de activador (en su óptimo) y variando la concentración de sacarosa. Para ello se partía de un medio igual al anterior pero con 20% de sacarosa se colocaba en cada tubo la cantidad de este medio calculada para obtener las concentraciones finales de Sacarosa que se deseaban luego se completaba el volumen con una solución de minerales y Asparagina en las mismas concentraciones anteriores. Luego se esterilizaba y agregaba el activador.

Para estudiar la influencia de la concentración de Melaza se procedía exactamente como para el estudio de la concentración de sacarosa, pero ahora usando una solución al 20% de melaza, en lugar de Sacarosa.

Preparación de la masa de maíz: se colocaban 60 gr. de harina de maíz por cada litro de agua, se hervía 15 minutos agitando y reponiendo el agua evaporada, se decantaba el engrudo de almidón formado. Lo depositado en el fondo se repartía en tubos y luego se añadía el líquido separado. Se esterilizaba 20 minutos a 120 grados centígrados.

El medio para observar la producción de acetilmetilcarbinol y de Indol tenía la siguiente composición: Bactopeptona, 5 gr.; Glucosa, 5 gr.; PO_4HK_2 , 5 gr.; agua hasta completar 1 litro. Una vez disueltos los sólidos, se filtraba, se distribuía en pequeños tubos de Hall y se esterilizaba a 110 grados durante media hora.

El medio para observar la reducción de nitratos era semejante pero con 0,1% de NO_3K . Para ver la reducción de nitritos se agregaba NO_2Na hasta reacción de nitritos justamente positiva (alrededor de 0,002%). Para comprobar la producción de SH_2 , al medio con Peptona, Glucosa y fosfatos se añadía 0,25% de SO_3Na_2 .

b) Observaciones morfológicas.

Para las observaciones microscópicas se usaron las coloraciones de Gram-Nicolle; de Wiertz para esperas; de Gray para cilias; Azul de metileno de Loeffler; Lugol y Nigrosina.

La observación de movilidad se hizo en cultivos frescos en medio de harina de maíz. Se usó el método de gota colgante.

c) Aparatos y técnicas de su uso.

Como el microorganismo ensayado es anaerobio para cultivos en medios líquidos se usó tubos de Hall (con bolita), excepto en la fermentación de azúcares y otras sustancias que se usó un medio con Tioglicolato.

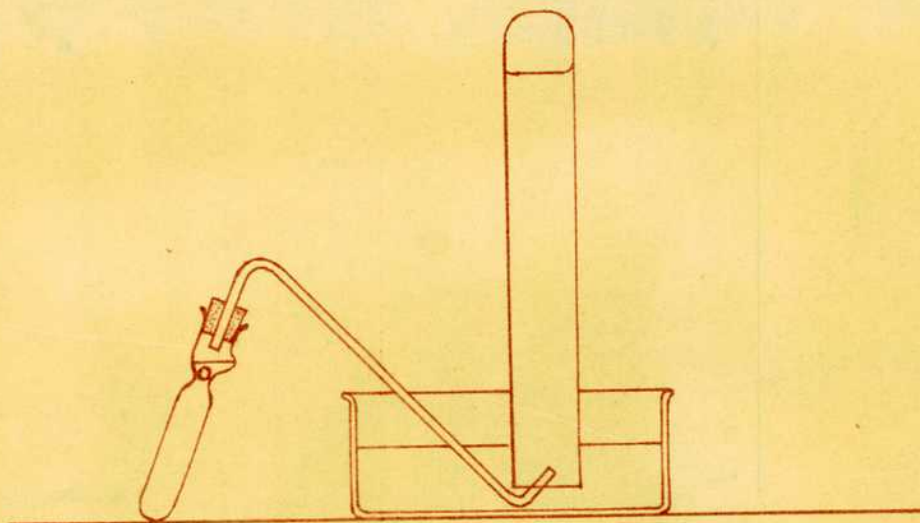
Para la aislación de colonias se usaron tubos de Veillon, abiertos en ambos extremos uno de los cuales se cerraba con tapón de goma y el otro como habitualmente con algodón. Para sembrar se fundía el Agar colocando los tubos en un baño de agua hirviente,

luego se enfriaba a 45 grados centígrados y se sembraba con un cultivo en maíz de 24 horas. Un tubo conteniendo 10 ml. de agar se sembraba con 0,5 ml. del cultivo en maíz. 0,5 ml. de este primer tubo se pasaban a un segundo y 0,5 ml. de éste a un tercero, los dos últimos tubos también tenían 10 ml. de Agar. Una vez logrado el desarrollo se destapaban ambos extremos y con una varilla estéril se empujaba el Agar de malta dentro de una caja de Petri también estéril y de allí se tomaba con el ansa una colonia aislada y se sembraba en un medio líquido de harina de maíz.

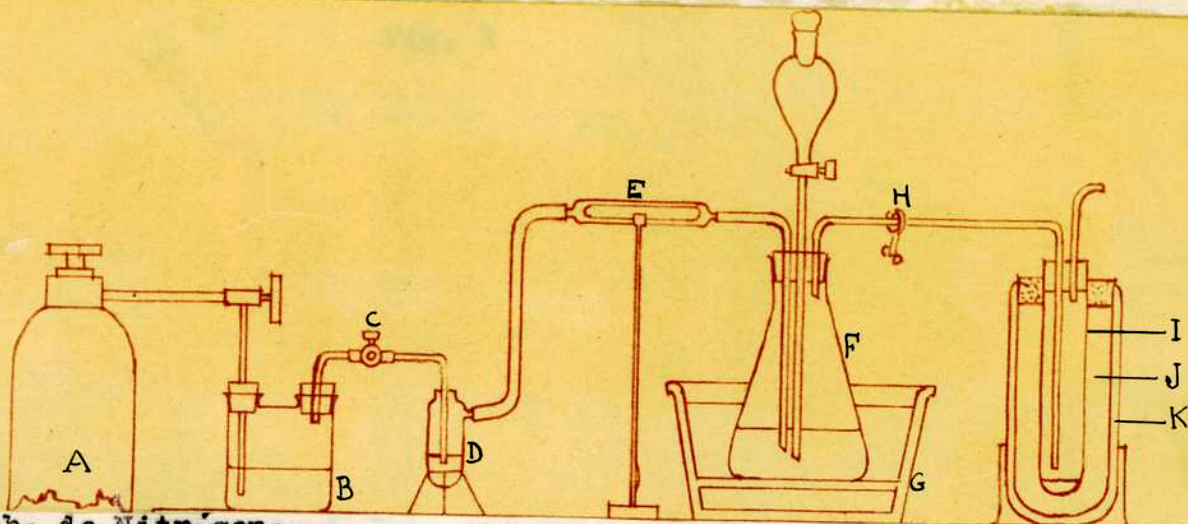
La observación de colonias superficiales se hizo en cajas de Petri colocadas en un desecador con avena fermentada para proveer de una atmósfera anaeróbica.

Para las determinaciones de velocidad de fermentación en base al gas producido se hizo uso de pequeños tubos de Hall (15 ml. de capacidad) con tapón de goma perforado atravesado por un tubo de vidrio acodado, el gas se recogía en un tubo de unos 100 ml. de capacidad, bajo agua acidulada con ClH. En cada lectura se hacía una marca del nivel del agua y luego se medía el volumen que correspondía, con agua que era medida con una bureta.

Fig. 1

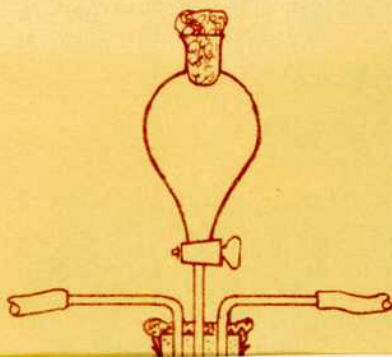


En la investigación de la producción de solventes se hizo uso del siguiente aparato.



- A: tubo de Nitrógeno.
- B: frasco con Pirogalato de Potasio.
- C: llave.
- D: burbujeador con ácido Sulfúrico.
- E: tubo con algodón estéril.
- F: frasco fermentador.
- G: baño termostático.
- H: pinza de Mohr.
- I: tubo de 2,5 x 25 cm.
- J: nieve carbónica.
- K: vaso Dewar.

El frasco fermentador era un erlenmeyer de 500 ml. de capacidad cerrado con un tapón de goma con tres perforaciones, por las que pasaban: el tubo aductor, una ampolla de decantación y el tubo de salida. El tapón y los extremos de los tubos se protegían con algodón para evitar las contaminaciones.



El conjunto con 300 ml. de medio de cultivo se esterilizaba 20 minutos a 120 grados. Luego se agregaba el activador y/o se sembraba con 5 ml. de un cultivo vigoroso de 24 horas previamente pasteurizado colocándolo 2 minutos en agua hirviendo. Finalmente se conectaba al tren de la fig. 2. Para las determinaciones periódicas de acidez y azúcares reductores, se cerraba la salida del gas con la pinza de Mohr y luego abriendo la llave de la ampolla de decantación se hacía pasar a la misma parte del líquido en fermentación y de allí con las precauciones de asepsia habituales, se tomaba la cantidad necesaria para hacer las valoraciones respectivas.

d) métodos químicos.-

Investigaciones cualitativas:

1) Acetilmetilcarbinol (reacción de Voges Proskauer). Se colocaba 1c.c. del cultivo en un tubo de ensayo, se le agregaban 0,5 ml. de una solución alcohólica de α Naftol y 0,5 ml. de solución de KOH al 10% un tinte rojo cereza indicaba la presencia de Acetilmetilcarbinol (reacción de Voges Proskauer positiva)

2) Indol (técnica de Ehrlich-Böhne modificada como indica Ferramola (66)). A 10 cc. de cultivo se agrega (por las paredes del tubo): 1 cc. de Eter y luego 5 cc. del reactivo para Indol, de modo que se interponga entre las dos fases, (el cultivo y el Eter). La reacción es positiva cuando aparece un anillo rojo en la interfase. El reactivo para Indol tiene la siguiente composición: Etanol, 95 ml.; ClH concentrado, 20 ml.; p-Dimetil Aminobenzaldehído, 1 gr.

3) Sulfuro de Hidrógeno: se colocaba en la parte superior del tubo, con el medio adecuado, un trozo de papel de filtro previamente impregnado con una solución de acetato de Plomo y secado a la estufa.

4) Reducción de nitratos: se debe investigar la presencia de nitritos. Para ello se usan las siguientes soluciones reactivas:

(I)

Acido Sulfanílico, 2,8 gr.; Acido Acético glacial, 100 cc.; Agua, 250 cc.

(II)

Dimetil α Naftilamina, 2,1 gr.; Ac. Acético glacial, 100 cc.; Agua, 250 cc.

Se toma una porción del cultivo y se le añaden unas gotas de la solución (I) y otras pocas de la (II), la aparición de color rojo indica la presencia de nitritos y por lo tanto hubo reducción de nitratos. Si no aparece color puede ser debido a dos causas: a) no hubo reducción de nitratos; b) hubo reducción de nitratos pero la reducción continuó hasta Amoníaco o Nitrógeno.

Para decidirlo se añade cinc en polvo éste reduce los nitratos a nitritos y entonces se investigan nitritos como antes. Si es positivo estamos en el caso (a), si es negativa, significa que no quedaban nitratos y entonces se trata del caso (b).

5) Reducción de nitritos: el medio de cultivo debe contener la mínima cantidad de NO_2Na que todavía dé positiva la reacción anterior. Se incuba y en una porción del cultivo no hace la reacción de nitritos.

Si es positiva el microorganismo no reduce nitritos.

Si es negativa el microorganismo reduce a los nitritos.

Determinaciones cuantitativas.

1) Acidez titulable: la acidez en esta fermentación se debe especialmente al ácido Butírico, encontrándose también ácido Acético y Fórmico.

Para la determinación se tomaban 5 ml. del líquido en fermentación, se agregaban 2 gotas de una solución alcohólica de Fenolftaleína y se titulaba con NaOH 0,1N hasta aparición de coloración rosada débil, persistente.

2) Hidratos de Carbono: se usó el método de Stiles, Peterson y Fred (67) para determinar Glucosa en líquidos fermentados, el método es una modificación del de Shaffer y Hartmann (68).

Debido a que, como fuentes de Carbono en la fermentación, se usaron unas veces materias primas amiláceas (harina de maíz) y otros materiales conteniendo sacarosa (melaza), se hacían dos determinaciones una con hidrólisis y otra sin ella, ésta última correspondía a azúcares reductores y la diferencia multiplicada por 0,9 al almidón y por 0,95 a la Sacarosa, según el caso.

En el caso del Almidón, para efectuar la hidrólisis, a 5 ml. del cultivo se agregaban 2 ml. de ClH concentrado y 15 ml. de

agua destilada y se hervía a reflujo durante dos horas. Luego se llevaba casi a neutralidad con NaOH 40%, se pasaba a matraz aforado de 50 ml. y se seguía como va indicado más abajo.

En el caso de la melaza a 5 ml. del cultivo se agregaban 1 ml. de ClH concentrado y 10 ml. de agua destilada. Se colocaba durante 10 minutos en un baño de agua a 70 grados. Luego se enfriaba y casi neutralizaba con NaOH 40%. A continuación se procedía igual tanto en el caso del Almidón como en el de la melaza y ya sea con la muestra hidrolizada como con la directa.

El procedimiento era como sigue: 5 ml. del cultivo (con o sin hidrólisis) se llevaba a neutralidad con CO_3Na_2 2% se agregaban 1 ml. de la solución de acetato básico de Plomo y 3 ml. de la de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, se neutralizaba y diluía a 50 ml. con agua destilada. Se filtraba por filtro seco y se tomaban 1 ml. del filtrado (0,5 ml. cuando el $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ gastado excedía a los datos tabulados en la micro-tabla) que se colocaban en un tubo Pyrex de 50 ml. de capacidad, se agregaban 5 ml. del microreactivo y agua destilada hasta completar 10 ml. Paralelamente se hacía un blanco con 5 ml. de reactivo y 5 ml. de agua, se tapaban los tubos con tapones perforados y se calentaban 15 minutos en baño de agua en ebullición. Se enfriaba bajo chorro de agua, se agregaban 5 ml. de SO_4H_2 1N en cada tubo, se agitaba y dejaba un minuto en reposo. Luego se titulaba con $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ 0,005N. hasta coloración amarillo paja, entonces se agregaba solución de almidón y se continuaba la titulación hasta desaparación del color azul. Con la diferencia entre los mililitros gastados en la titulación en blanco y la de la muestra se va a las tablas dadas por los autores y se tienen directamente los miligramos de Glucosa.

El microreactivo para azúcares tiene la siguiente composición

$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5	gramos
Acido Tartárico.	7,5	"
CO_3Na_2 anhidro	40,0	"
IK	10,0	"
IO_3K	0,7	"
Oxalato de Potasio	18,4	"

Se lleva al litro con agua destilada.

Además se requieren las siguientes soluciones:

Acido Sulfúrico aproximadamente 1 normal.

Tiosulfato de Sodio 0,005 normal. Como esta solución dura pocos días, se preparaba a partir de una solución 0,1 normal que tiene mayor duración. La solución 0,1 normal contenía además 2 gr. de NaOH por litro.

Acetato básico de Plomo al 33%.

$\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ al 10%.

3) Solventes: como productos de la fermentación se obtiene n-Butanol, Acetona y Etanol, los que se determinaron por el método propuesto por Christensen y Fulner (69).

Terminada la fermentación se lavaba cuidadosamente externa e interiormente el tubo aductor, la ampolla de decantación, el tubo de salida, su continuación de goma y el tubo sumergido en nieve carbónica estos líquidos de lavado se agregaban al substracto fermentado, el cual se llevaba luego a pH. 7,5, se pasaba al balón de la figura 4 y se destilaba recibéndolo en el matraz aforado. Se recogían 100 ml. del destilado.

Como indican los autores la Acetona se determinó por la modificación de Goodwin (70) al método de Messinger.

Para determinar el Butanol y Etanol se procedía de la siguiente manera: 10 cc. del destilado original se diluían a 100 cc. con agua destilada y 10 cc. de esta dilución se agregaban a una mezcla fría de 10 cc. de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ 0,4 normal y 10 cc. de SO_4H_2 concentrado, colocada en un tubo de ensayos de 2,5 x 25 cm.; se introducían dos trozos de varilla de vidrio de unos 8 cm. de longitud y el conjunto se agitaba vigorosamente. Se cerraban, los tubos, con tapón de corcho con dos ligeras acanaladuras laterales y se colocaban en un baño de agua hirviente durante diez minutos. Luego se enfriaba se pasaba el contenido a un erlenmeyer de 1 litro, se lavaba bien con agua y se llevaba a 400 cc. Se añadían entonces 15 cc. de una solución de IK al 20%, se tapaba se dejaba dos minutos y el Iodo liberado se titulaba con $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ 0,1 normal. Paralelamente se hacía un ensayo en blanco en la misma forma.

La diferencia entre el blanco y la muestra se designaba "M" y su valor está dado por la siguiente ecuación:

$$M = 6,92 B + 0,691 A + 8,78 E \quad (1)$$

donde B, A y E son los pesos en gramos del Butanol, Acetona y Etanol respectivamente que hay en los 100 cc. del destilado original.

Se hacía luego otra titulación con mayor concentración de ácido para obtener una segunda ecuación. 10 cc. del destilado original se diluían a 100 cc. 5 cc. de esta dilución se agregaban a una mezcla fría de 25 cc. de SO_4H_2 concentrado y 10 cc. de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ 0,4 normal contenidos en un tubo de ensayos de 2,5 x 25 cm. luego se proseguía en la misma forma que para obtener "M". También se hacía un ensayo en blanco y la diferencia entre el blanco y la muestra, se multiplicaba por dos y se le llamaba "N". Cuyo valor es:

$$N = 24,62 B + 17,68 A + 8,84 E \quad (2)$$

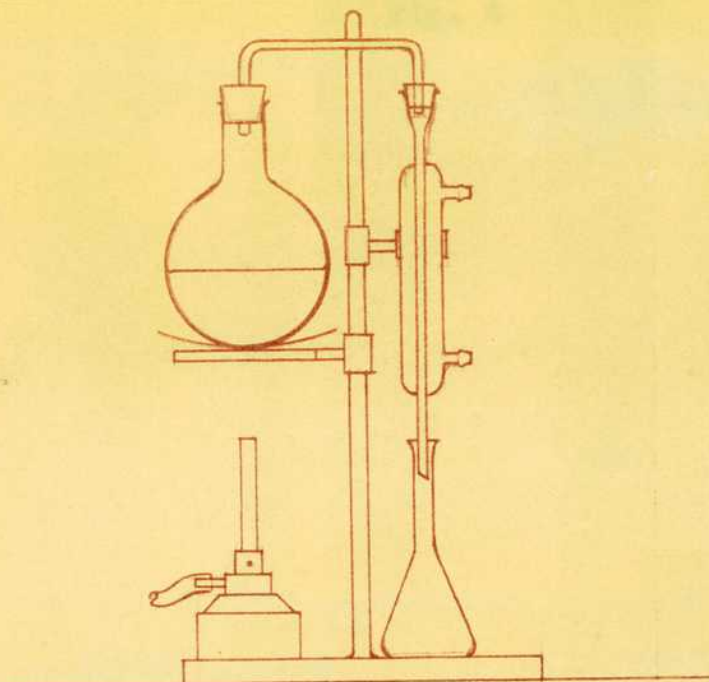
Operando con las ecuaciones (1) y (2) se obtuvieron las (3) y (4) que dan los gramos de Butanol y etanol contenidos en el destilado original:

$$B = 0,057 (N-M) - 0,96 A \quad (3)$$

$$E = 0,114 M - 0,788 B - 0,0787 A \quad (4)$$

Para determinar Acetona se procedía de la siguiente manera: de la dilución 1:10 del destilado original se tomaban 5 cc. y se agregaban a 50 cc. de NaOH 1 normal y se cerraba con tapón de vidrio. Después de cinco minutos se agregaban 5 cc. de Iodo 0,1 normal agitando continuamente. Luego se tapaba el frasco y se dejaba en reposo diez minutos. Se agregaba luego la cantidad de SO_4H_2 2 normal necesaria para neutralizar el NaOH (25 cc.) y 0,3-0,4 cc. de exceso. Luego se titulaba con $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ 0,05 normal usando Almidón para el punto final. Paralelamente se hacía un ensayo en blanco en la misma forma. Los cálculos se hacían teniendo en cuenta que 1 cc. de solución de Iodo 0,1 normal equivalen a 0,96747 mgr. de Acetona.

La destilación del medio fermentado se hacía en un aparato como el de la figura:



Para probar el método se hicieron soluciones acuosas conteniendo cantidades conocidas de Butanol, Acetona y Etanol. Los resultados están consignados en la tabla adjunta.

Solventes en el original en gramos/100 cc.			Solventes hallados en gramos/100 cc.					
Butanol	Acetona	Etanol	Butanol calc. error		Acetona calc. error		Etanol calc. error	
2,48	1,01	0,53	2,53	+ 3%	1,02	+ 1%	0,52	- 2%
2,47	1,01	0,54	2,52	+ 2%	1,015	+ 0,5%	0,49	- 1%
3,51	0,08	0,51	3,44	- 2%	0,082	+ 3%	0,515	+ 1%
2,02	2,37	0,07	2,00	- 1%	2,35	- 1%	0,072	+ 3%
1,42	2,13	1,16	1,45	+ 2%	2,11	- 1%	1,14	- 2%

IV - RESULTADOS

a) Morfología.-

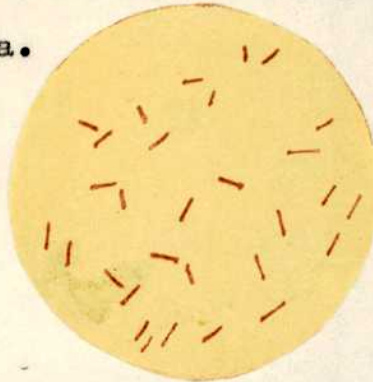
Las células vegetativas eran bastones rectos, que se presentaban aislados o de a pares nunca en cadena. Eran móviles con flagelos peritricos. Esporulaban dando formas clostridiales. Al principio de la fermentación adoptaban formas como (a) y mas tarde como (b).



(a)

(b)

En cultivos de hasta cinco o seis días eran Gram positivos para volverse luego Gram negativos. Los clostridios presentaban al Lugol reacción Granulosa positiva.

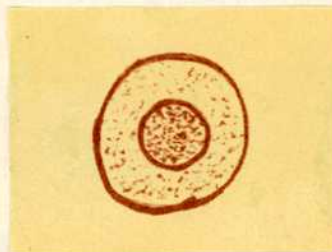


Formas vegetativas

b) Colonias.-

Las colonias superficiales en Agar de malta, incubadas en atmósfera anaeróbica eran compactas, elevadas, oscuras, más o menos regulares y de borde liso.

Las colonias profundas también en Agar de malta, eran lenticulares, oscuras rodeadas de una zona clara. El Agar aparecía completamente fragmentado por la producción de gas. El aspecto era el de la figura:



c) Fermentación de sustancias varias.-

Las cepas ensayadas producían etilmetilcarbinol. Licuaban totalmente la gelatina glucosada. En cambio no producían Indol, ni nitritos a partir de los nitratos, pero

sí reducían los nitritos a Amoníaco.

Fermentaban las siguientes sustancias, con producción de ácido y gas: Xilosa, Arabinosa, Rammosa, Glucosa, Galactosa, Levulosa, Sacarosa, Maltosa, Lactosa, Melezitosa, Almidón, Inulina, Metilglucósido. La cepa B-8-6 prácticamente no fermentó el Esculín y las demás muy debilmente.

Se observó la producción de Sulfuro de Hidrógeno a partir de medios con sulfitos.

En papa el desarrollo fué abundante. La papa tomó un aspecto cremoso Blancuzco en la zona de la línea de siembra y en el resto un tinte amarillento.

No hubo desarrollo en caldo puro,, así como no se observó fermentación de las siguientes sustancias: Dulcita, Melobiosa, Arabita, Sorbita, Inosita y Glicerina.

En todos los casos la temperatura de incubación fué de 37 grados Centígrados.

d) Determinación de la concentración óptima del Activador.-

Se prepararon medios semisintéticos con distintas concentraciones del Autolizado de Levadura y se inocularon con 0,3 ml. de un cultivo en maíz de 24 horas de edad previamente pasteurizado. Se ensayaron las tres cepas: B-8-3; B-8-4; y B-8-4.

El activador usado fué un Autolizado de Levadura que contenía 1,34% de Nitrógeno total.

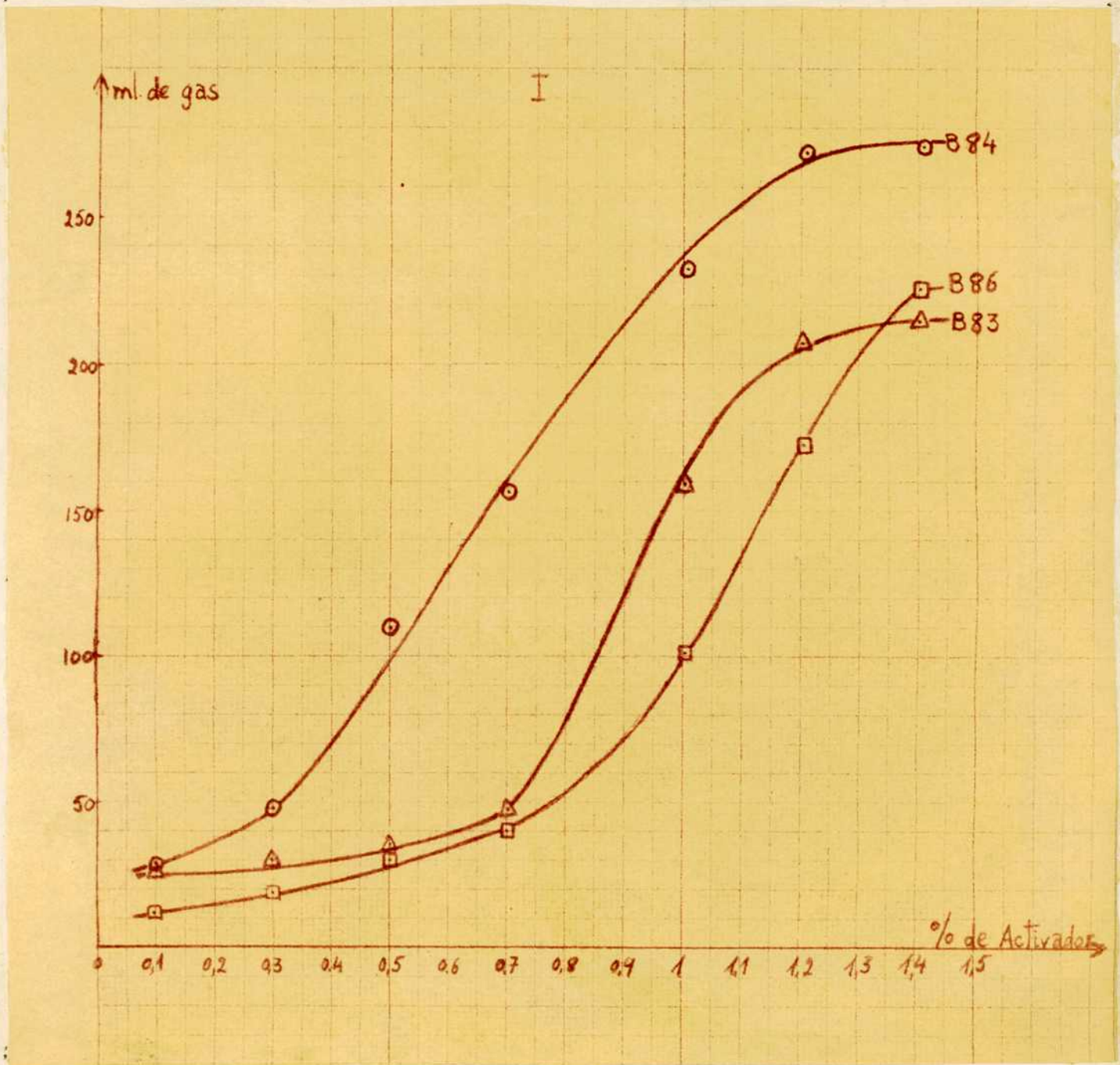
Se observó la producción total de gas a las 80 horas. Expresándose el número de mililitros de gas producido por gramo de Sacarosa en función de la concentración del Activador.

Los resultados se consignan en la tabla I y en el cuadro I

Tabla I

cepa B-8-4		cepa B-8-6		cepa B-8-3	
Activador %	ml. de gas/gr. de Sacarosa.	Act. %	ml. de gas/gr. de Sacarosa.	Act. %	ml. de gas/gr. de Sac.
0,1	29,6	0,1	12,3	0,1	26,1
0,3	47,6	0,3	18,6	0,3	30,3
0,5	110,3	0,5	29,6	0,5	35,2
0,7	156,2	0,7	40,5	0,7	46,9
1,0	231,0	1,0	101,0	1,0	158,0
1,2	270,0	1,2	172,0	1,2	206,0
1,4	273,0	1,4	224,0	1,4	213,0

Cuadro I



e) Estudio de la influencia de la concentración de Sacarosa.-

El medio

era el semisintético con 1,2% de Activador y concentraciones variables de Sacarosa.

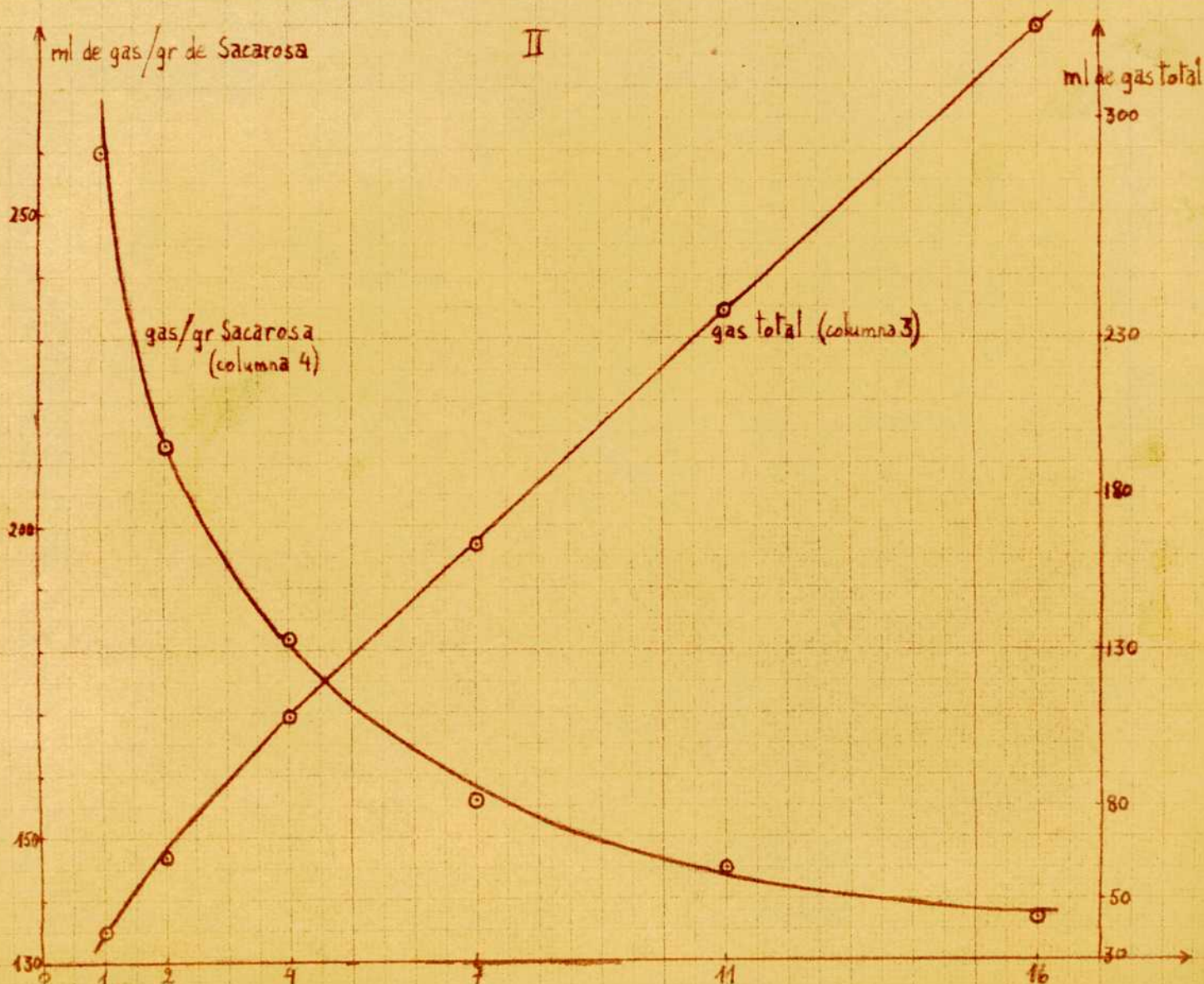
Se usó la cepa B-8-4, Se observó la producción total de gases a las 80 horas.

Los resultados fueron los consignados en la tabla II y el cuadro II.

Tabla II

1 gr. de Sacarosa	2 Conc. de Sacarosa gr./100 ml. de soluc.	3 gas producido ml.	4 gas produc. gr. de Sac. ml.
0,15	1%	40	260
0,30	2%	64	213
0,60	4%	109	182
1,05	7%	164	156
1,65	11%	239	145
2,40	16%	329	137

Cuadro II



f) Influencia de la concentración de Melaza.-

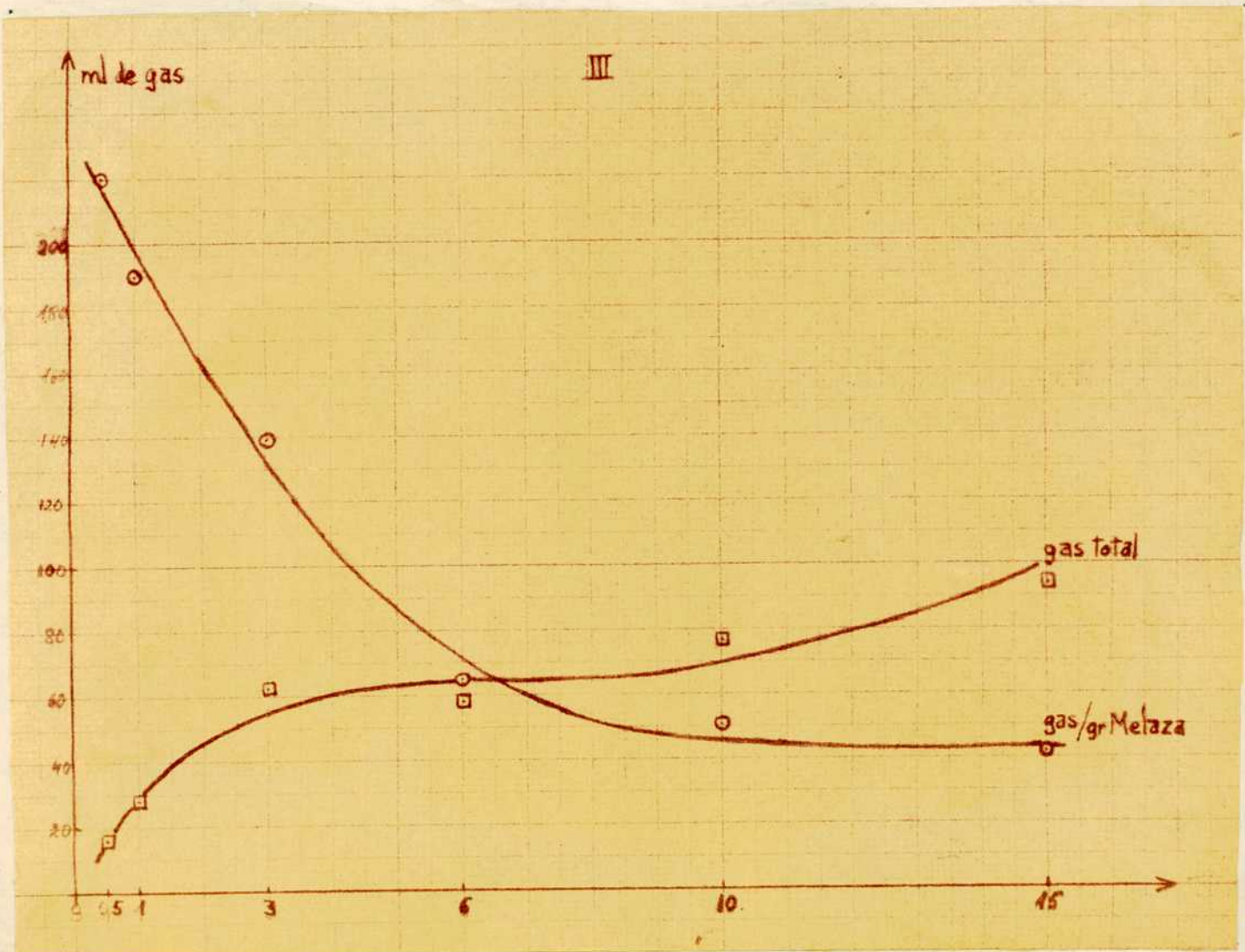
Se usó un medio con sales minerales, melaza y activador. Se hizo uso en la fermentación de la cepa B-8-4.

Se observó la producción total de gases a las 80 horas. Los resultados quedan consignados en la tabla III y en el cuadro III.

Tabla III

gr. de Melaza	conc. de Melaza gr./100 ml. de soluc.	gas producido ml.	gas producido por gr. de Melaza ml.
0,075	0,5	16,5	220
0,15	1,0	28,5	190
0,45	3,0	62,6	139
0,90	6,0	58,5	65
1,5	10,0	77,0	51,3
2,25	15,0	94,0	41,8

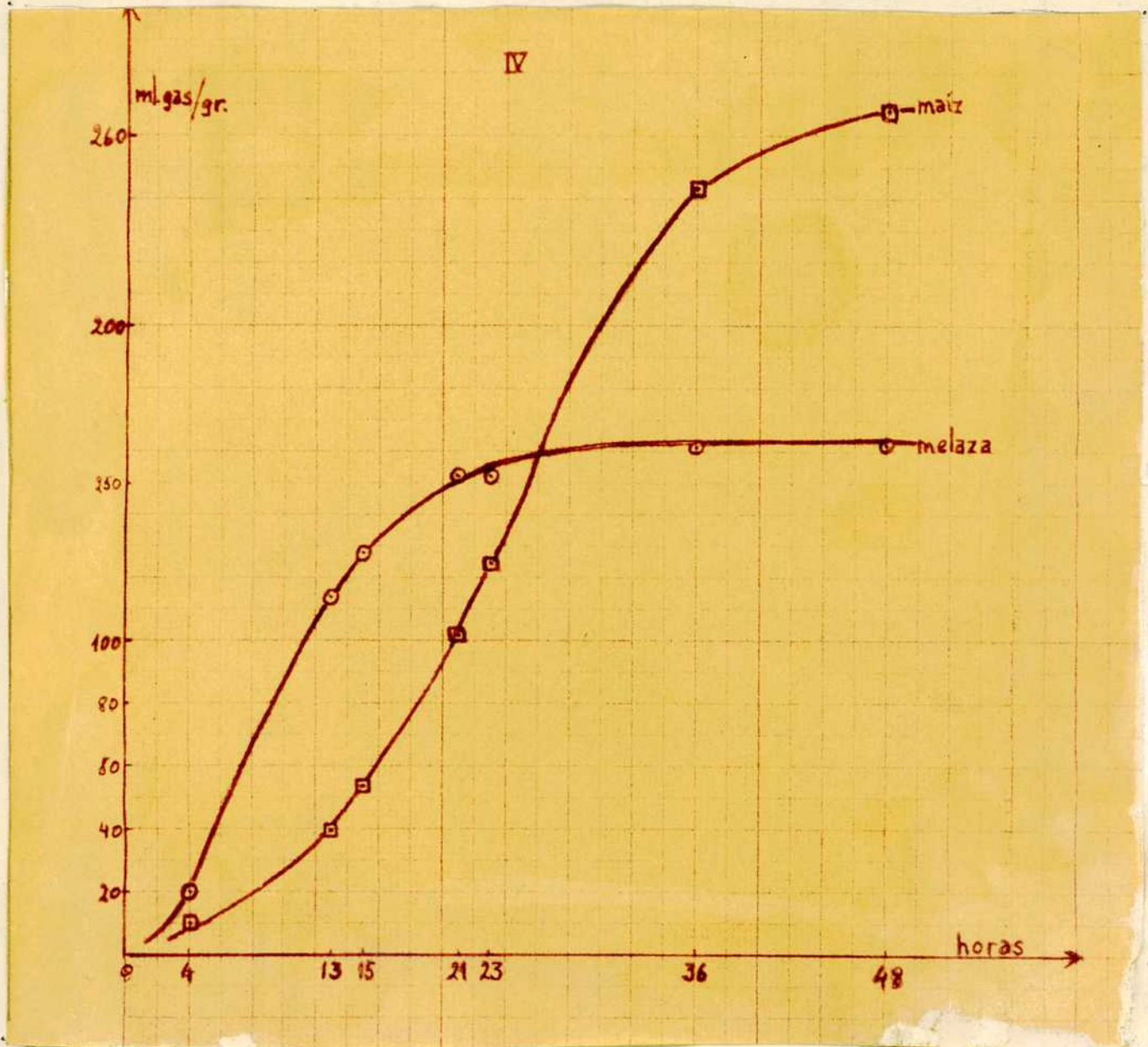
Cuadro III



g) Comparación de las velocidades de fermentación del maíz y de la Melaza.-

Se usaron medios conteniendo 3% de harina de maíz y de melaza respectivamente. Se inocularon con cultivos de la cepa B-8-4. Los resultados obtenidos constan en el cuadro IV. En ordenadas figuran los mililitros de gas producido por cada gramo de harina de maíz o melaza inicialmente presentes y en abcisas el tiempo en horas.

Cuadro IV



h) Estudio de la fermentación del maíz.-

Se usó un medio conteniendo 6% de harina de maíz. El volumen total era de 300 ml. y se inoculó con un cultivo de la cepa B-8-4. La acidez está expresada en mililitros de ácido 0,1 normal por 100 ml. de cultivo (tabla IV y cuadro VI). Los azúcares reductores en gramos de glucosa por 100 ml. de cultivo (tabla IV y cuadro V). El Almidón está expresado en gramos por 100 ml. de cultivo (tabla IV y cuadro V).

Tabla IV

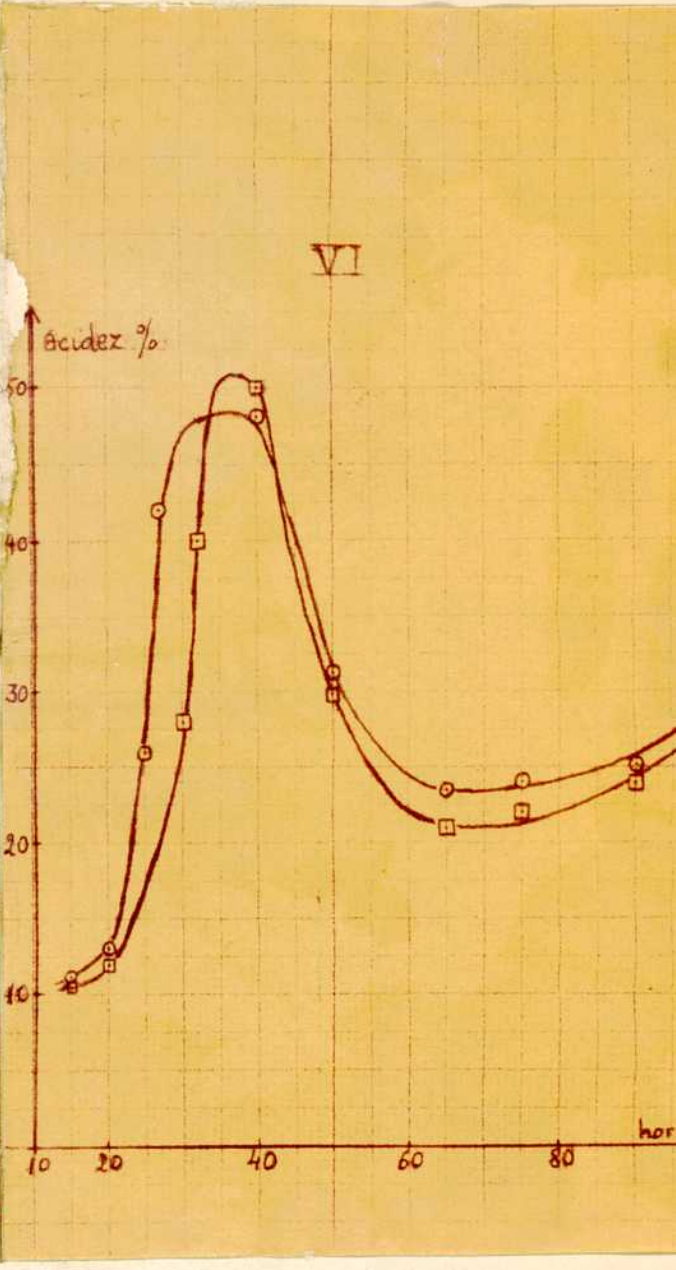
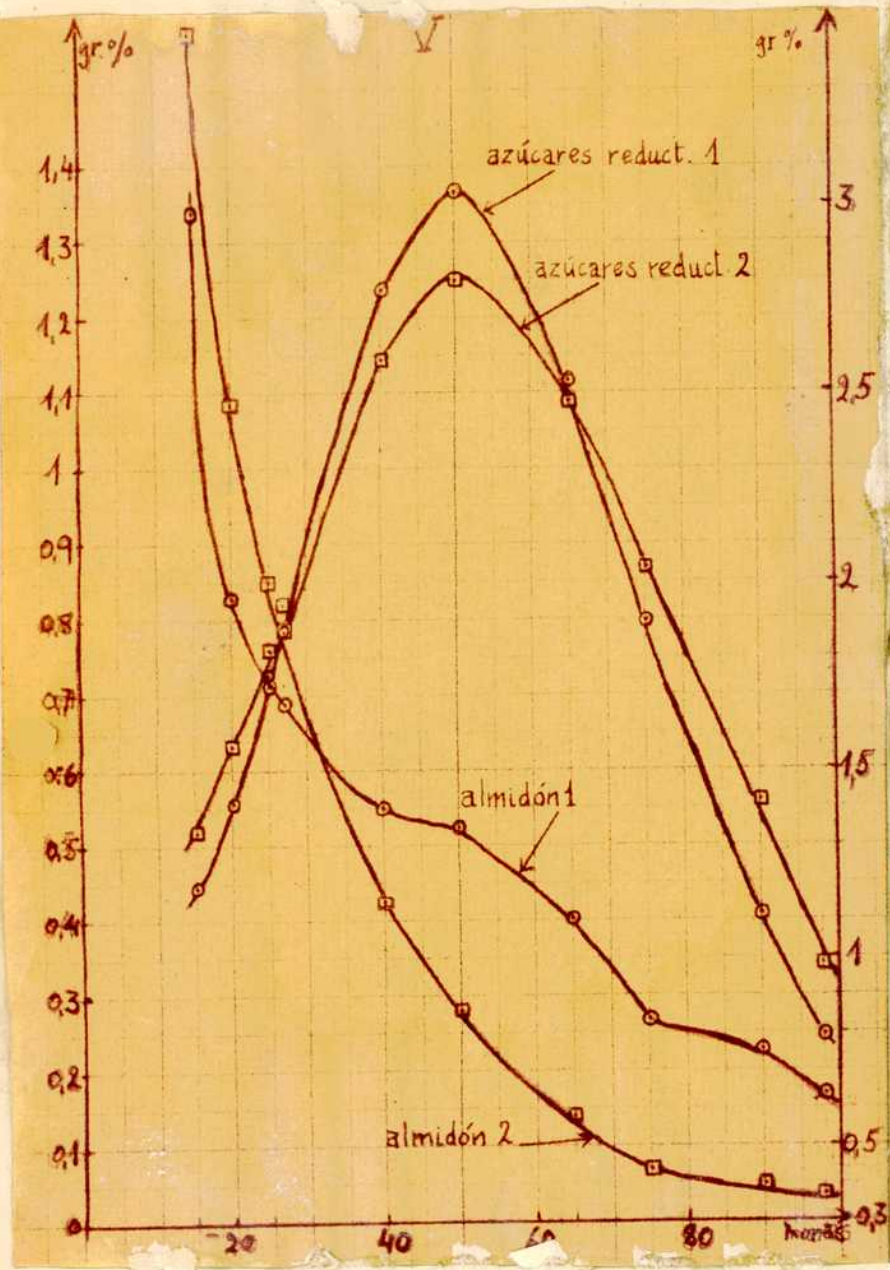
frasco	tiempo horas	acidez gr.%	azúcares reduct. gr.%	almidón gr.%
1	15	11,2	0,446	2,98
2	"	11,0	0,520	3,448
1	20	13,1	0,558	1,96
2	"	12,1	0,634	2,374
1	25	26,0	0,729	1,73
2	"	27,9	0,759	2,001
1	27	41,9	0,784	1,68
2	"	40,0	0,784	1,939
1	40	48,2	1,237	1,40
2	"	50,3	1,145	1,149
1	50	31,3	1,368	1,352
2	"	29,8	1,249	0,8595
1	65	23,5	1,116	1,107
2	"	21,1	1,088	0,576
1	75	24,0	0,797	0,838
2	"	22,2	0,868	0,437
1	90	25,1	0,408	0,757
2	"	24,3	0,558	0,395
1	98	28,5	0,247	0,637
2	"	27,2	0,344	0,374

Frasco (1) —○—

Frasco (2) —□—

Cuadro V

Cuadro VI



Producción de solventes

Tabla V

Frasco (1)

	Rendimiento gr.	% sobre solven- tes totales	% sobre el peso de harina de maiz
Butanol	3,1	58,5 %	17,2 %
Acetona	1,7	32,1 %	9,4 %
Etanol	0,5	9,4 %	2,8 %
Solventes totales	5,3	100,0 %	29,4 %

Frasco (2)

	Rendimiento gr.	% sobre solven- tes totales	% sobre el peso de harina de maíz
Butanol	3,4	65,4 %	18,8 %
Acetona	1,2	23,1 %	6,7 %
Etanol	0,6	11,5 %	3,3 %
Solventes totales	5,2	100,0 %	28,8 %

1) Estudio de la fermentación de la Melaza.-

Se usó un medio conteniendo 5 gramos de Melaza cada 100 ml. de medio de cultivo. El volumen total era de 300 ml. y se inoculó con un cultivo de la cepa B-8-4 en la forma habitual.

Los resultados figuran en las tablas VI y VII y en los cuadros VII y VIII.

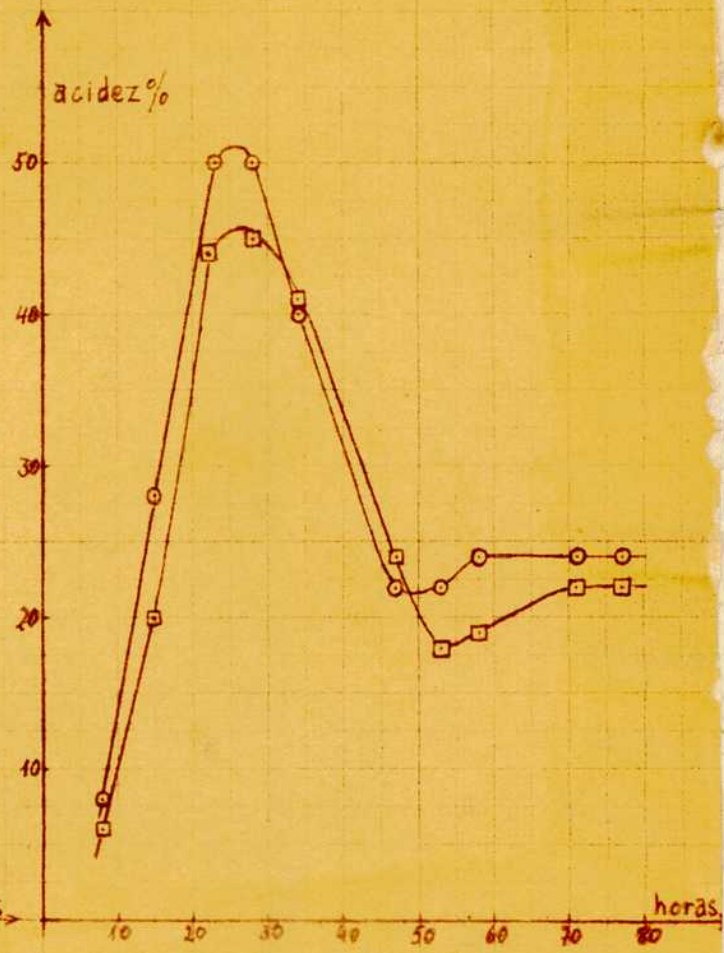
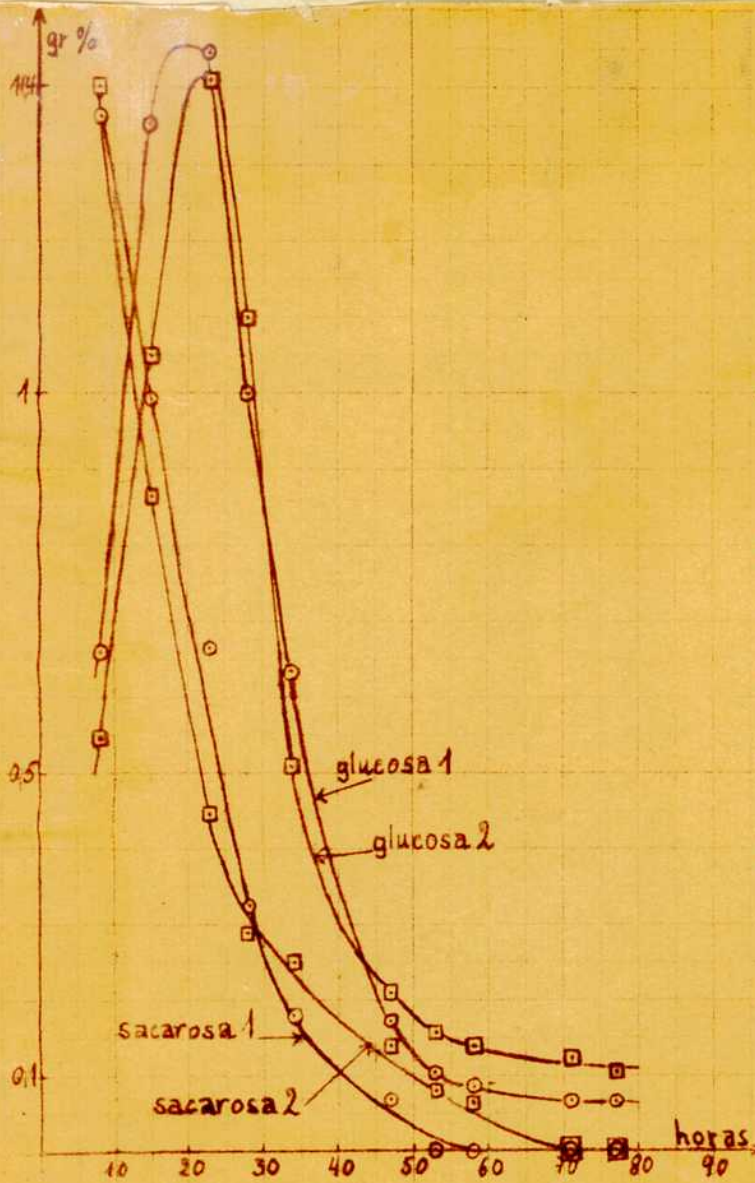
La expresión de los mismos es igual a la de los resultados del párrafo (h).

Tabla VI

frasco	tiempo horas	acidez %	azúcares reduct. %	Sacarosa %
1	8	8	0,660	1,364
2	"	6	0,545	1,401
1	15	28	1,354	0,990
2	"	20	1,048	0,865
1	23	50	1,446	0,667
2	"	44	1,411	0,446
1	28	50	0,997	0,325
2	"	45	1,102	0,293
1	34	40	0,634	0,179
2	"	41	0,507	0,252
1	47	22	0,173	0,070
2	"	24	0,210	0,1396
1	53	22	0,105	0,000
2	"	18	0,157	0,086
1	58	24	0,086	0,000
2	"	19	0,142	0,068
1	71	24	0,067	0,000
2	"	22	0,125	0,000
1	77	24	0,067	0,000
2	"	22	0,105	0,000

Cuadro VII

Cuadro VIII



Producción de solventes

Frasco (1)

Tabla VII

	Rendimiento gr.	% sobre solven- tes totales	% sobre el peso de melaza
Butanol	1,542	67,6 %	10,3 %
Acetona	0,498	21,8 %	3,3 %
Etanol	0,246	10,6 %	1,6 %
Solventes totales	2,286	100,0 %	15,2 %

Frasco (2)

	Rendimiento gr.	% sobre solven- tes totales	% sobre el peso de melaza
Butanol	1,352	65,58 %	9,01 %
Acetona	0,513	24,86 %	3,42 %
Etanol	0,198	9,56 %	1,32 %
Solventes totales	2,063	100,00 %	13,75 %

V - DISCUSION.

Se sigue el mismo orden indicado en los apartados del Capítulo IV: a), b), c) De los estudios morfológicos y culturales se desprende que el microorganismo usado es el "Clostridium acetobutylicum" (Weizmann).

d) Respecto al activador se deduce de la tabla I y del cuadro I que la concentración óptima en las condiciones usadas es de 1,2 % de autolizado de levadura y que la cepa que produce una fermentación más vigorosa es la designada como B-8-4.

e) En las experiencias encaminadas a estudiar la influencia de la concentración de azúcares se observa que hay una gran disminución de la actividad fermentativa con el aumento de la concentración de azúcares (tabla II, gráfico II).

f) Estudiando en la misma forma la influencia de la concentración de melaza se ve en la tabla III y cuadro III que si bien hay una mayor acción fermentativa al disminuir la concentración de melaza los valores absolutos son demasiado bajos, por lo que aparece como más conveniente concentraciones de alrededor del 5 %.

g) Comparando las velocidades de fermentación del maíz y de la melaza (Cuadro IV) se observa que con melaza se llega antes al máximo de producción de gas pero en el maíz este máximo es 1,7 veces mayor debido que a igual concentración el maíz tiene más carbohidratos que la melaza.

h) En el estudio de la fermentación del maíz observamos que los azúcares reductores (Cuadro V) aumentan al principio hasta alcanzar un máximo alrededor de las 50 horas de realizada la siembra, para luego disminuir hasta un mínimo. La curva es aproximadamente simétrica. La curva de acidez titulable (Cuadro VI) tiene una porción de poca pendiente hasta las 10 - 15 horas para luego aumentar muy rápidamente y alcanzar un máximo. El posterior descenso no es tan pronunciado, la curva después de pasar por un mínimo asciende lentamente.

La tabla V muestra que un 30 % de la harina de maíz es transformada en solventes de aplicación industrial (Butanol, Acetona y Etanol), de los cuales un 60 % es Butanol, un 30 % Acetona y un 10% Etanol.

i) En la fermentación de la melaza observamos en los cuadros VII

y VIII que las curvas son comparables con las del maíz, pero los máximos se alcanzan en un tiempo apreciablemente menor.

La tabla VII muestra que la fermentación de la melaza transforma un 14 a 15 % de la misma en solventes. En general se observa un incremento del porcentaje de Butanol a expensas de la acetona, comparando con la producción relativa de las mismas sustancias en el caso del maíz.

VI - RESUMEN

Se estudian tres cepas de "Clostridium acetobutylicum". Una de las cuales se usa para determinar la óptima concentración de un activador (autolizado de levadura); la influencia de la concentración de Sacarosa y de Melaza en la fermentación acetobutílica del maíz y de la melaza, el curso de las cuales se sigue con la acidez titulable y la concentración de azúcares reductores. Al final de las mismas se determina la producción de Butanol, Acetona y Etanol, encontrándose que el 30 % de la harina de maíz y el 15 % de la melaza son transformados en solventes de aplicación industrial.

VII - BIBLIOGRAFIA

- 1) PASTEUR, L. - "Extrait des procès verbaux". Soc. Chim. Paris
Seance du 9 mai 1862. pag. 52.
- 2) FITZ A. - Berichte, 11: 42 (1878)
Berichte, 15: 867 (1882)
Berichte, 17: 1188 (1884)
- 3) VAN TIEGHEM M. - "Sur le Bacillus amylobacter et son role dans la
putrefaction des tissus végétaux". Bull. Soc.
Botan France 24: 128 (1877).
- 4) PRAZMOWSKI A. - "Zur Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung
einiger Bacterien - Arten". Bot Zeit 37: 409
(1879)
- 5) GRUBER - "Eine methode der culture anaerobischer bakterien nebst
Bemerkungen zur morphologia der Buttersäuregärung". -
Centr Bakt Infektionskrankh 1: 367 (1887).
- 6) PERDRIX M. L. - "Sur les fermentations produites par un microbe
anaérobie de l'eau". Ann. Inst. Pasteur 5: 287
(1891).
- 7) BOTKIN S. - "Über einen Bacillus butyricus". - Zeit Hyg Infektions-
krankh 11: 421 (1892).
- 8) GRILLBERT M. L. - "Fermentation anaérobie produite par le Bacillus
orthobutylicus". - Ann. Inst. Pasteur 7: 353
(1893).
- 9) BEIJERINCK M. W. - "Über die Butylalkohol gärung und das Butyl -
Ferment" Verhandl Akad Wetenschappen Amster-
dam, Afdeel Natuurkunde Sectie II Deel I
(1893).
- 10) DUCLAUX E. - "Sur la nutrition intracellulaire" Ann. Inst. Pasteur
9: 811 (1895).
- 11) EMERLING - "Butylalkoholische Gärung" Ber. Dtsch. Chem. Ges. 29,
2726; C97 1117.
- 12) GRASSBERGER R. und SCHATTAUROCH. - "Über Buttersäuregärung" Arch.
Hyg 42: 219 (1902).
- 13) WINOGRADSKY S. - "Seine morphologie und seine Eigenschaften als
Buttersäureferment" Centr. Bakt Parasitenk Abt

- 14) SPEAKMAN H. B. - "The production of acetone and Butyl alcohol by a bacteriological process" Jour. Soc. Chem. Ind. 38: 155 (1919).
- 15) NATHAN F. - "The manufacture of acetone" Jour Soc. Chem. Ind. 38: 271 (1919).
- 16) GILL A. - "The acetone fermentation process and its technical application" Jour. Soc. Chem. Ind. 38: 273 (1919).
GILL A. - "The production of normal butyl alcohol and acetone by fermentation of Horse-Chestnuts" Jour Soc. Chem. Ind. 38: 411 (1919).
- 17) KELLY, HICKINBOTTOM, HENLEY and Thaysen - "The products of the Acetone, n-Butyl alcohol fermentation of carbohydrates material; with special reference to some of the intermediate substances produced" Biochemical Jour. 14: 229 (1920).
- 18) SPEAKMAN H. B. - "Seed culture methods in the production of acetone and butyl alcohol by a fermentation process" Jour. Ind. Eng. Chem. 12: 581 (1920).
SPEAKMAN H. B. - "The biochemistry of the acetone and butyl alcohol fermentation of starch by Bacillus granulobacter pectinovorum" Jour. Biol. Chem. 41: 319 (1920).
- 19) SPEAKMAN H. B. - "Gas production during the acetone and butyl alcohol fermentation of starch" Jour. Biol. Chem. 43: 401 (1920).
- 20) SPEAKMAN H.B. - "Molecular configuration in the sugars and acid production by Bacillus granulobacter pectinovorum" Jour. Biol. Chem. 58: 395 (1923).
- 21) MC COY, FRED, PETERSON y HASTINGS - "A cultural study of the acetone-butyl alcohol organism" Jour. Infect. Dis 39: 457 (1926).
- 22) WILSON, PETERSON y FRED - "The production of the acetyl methyl carbinol by Cl. acetobutylicum" Jour. Biol. Chem. 74: 495 (1927).

- 23) WEYER Y RETTGER - "A comparative study of six different strains of the organisms commonly concerned in large scale production of butyl alcohol and acetone by the biological process" Jour. Bact. 14: 399 (1927).
- 24) HOPKINS, PETERSON y FRED - "The composition of certain bacteria with special reference to their carbon and their nitrogen content" Jour. Biol. Chem. 85: 21 (1929).
- 25) STILES, PETERSON y FRED - "The nature of acids produced in the fermentation of maize by *Cl. aceto-butylicum*" - Jour. Biol. Chem. 84: 437 (1929).
- 26) PETERSON, SCOTT y THOMPSON - "Über den aus stärke und cellulose durch gewisse Bakterien gebildeten reduzierenden zucker" Biochem. Zeitschr. 219: 1 (1930).
- 27) WILSON, PETERSON y FRED - "The relationship between the nitrogen and carbon metabolism of *Cl. Aceto-butylicum*" Jour. Bact. 19: 231 (1930).
- 28) WYNNE - "Inhibition of the acetone-butyl fermentation by acids" Jour. Bact. 22: 209 (1931).
- 29) JOHNSON, PETERSON y FRED - "Oxidation and reduction relations between substrate and products in the acetone-butyl alcohol fermentation" Jour. Biol. Chem. 91: 569 (1931).
- 30) KLUYVER - "The Chemical Activities of Micro-organism" University of London Press Ltd. 1931.
- 31) PETERSON y FRED - "Butyl-acetone fermentation of corn meal". Ind. Engineer. Chem. 24: 237 (1932).
- 32) WYNNE y PETT - "The formation of methyl-glyoxal by *Cl. Aceto-butylicum*" Jour. Biol. Chem. 97: 177 (1932).
- 33) WEINSTEIN y RETTGER - "Some factors involved in the biological production of acetone and butyl alcohol" Jour. Bact. 25: 201 (1933).

- 34) JOHNSON, PETERSON y FRED - "Intermediary compounds in the acetone-butyl alcohol fermentation" Jour. Biol. Chem. 101: 145 (1933).
- 35) JONSTON and WYNNE - "The amylase of *Cl. acetobutylicum*" Jour. Bact. 30: 491 (1935).
- 36) MAC COY y MC CLUNG - "Studies on anaerobic bacteria. The serological agglutination of *Cl. acetobutylicum* and related species" Jour. Infect. Dis. 56: 333 (1935).
- 37) KNAYSI and DUTKY - "The growth of a Butanol Clostridium in relation to the oxidation-reduction potencial and oxygen content of the medium" Jour. Bact. 31: 137 (1936).
- 38) UNDERKOPFER, CHRISTIANSEN and FULMER - "Butyl-acetonic fermentation of Kilose and other sugars" Ind. Eng. Chem. 28: 350 (1936).
- 39) WEIZMANN and ROSENFELD - "The activation of the Butanol-acetone fermentation of Carbohydrates by *Clostridium acetobutylicum*" Biochem. Jour. 31: 619 (1937)
- 40) MC DANIEL, WOOLLEY and PETERSON - "Growth factors for bacteria" VII Nutrient requirements of certain Butyl alcohol, producing bacteria Jour. Bact. 37: 259 (1939).
- 41) WEIZMANN and ROSENFELD - "The specific nutritive requirements of *Clostridium acetobutylicum* (Weizmann)". Biochem. Jour. 33: 1376 (1939).
- 42) OXFORD, LAMPEN and PETERSON - "Growth factor and other nutritional requirements of the Acetone-Butanol organism *Cl. acetobutylicum*". Biochem. Jour. 34: 1588 (1940).
- 43) MANTZIFELJ AIA - "Autolysis of Acetone-butyl alcohol bacteria" (with Eng. summ.). Mikrobiologia 10: 273 (1941).
En abstract: Biol. Abst. 18685 (1942).
- 44) DAVIES, RONALD and STEPHENSON - "Studies on the Acetone-butyl

- alcohol fermentation". Biochem. Jour. 35: 1320 (1941).
- 45) WILBY, AVERILL, JOHNSON, MC COY and PETERSON - "Acetone-butyl alcohol fermentation of waste sulfite liquor". Ind. Eng. Chem. Ind. Ed. 33: 606 (1941).
- 46) WENDLAND, RAY, FULNER and UNDERKOFER - "Butyl-acetonic fermentation of Jerusalem artichokes". Ind. Eng. Chem. Eng. Ed. 33: 1078 (1941).
- 47) RUMBO, MAXWELL, FAIRBRIDGE and GILLESPIE - "The bacteriology growth factors requirements and fermentation reactions of Clostridium acetobutylicum (Weizmann)". Australian Jour Exp. Biol. and Med. Sci. 19: 185 (1941).
- 48) LAMPEN and PETERSON - "Biotin and p-Aminobenzoic acid as growth factors of the Clostridium acetobutylicum". Jour Amer. Chem. Soc. 63: 2283 (1941).
- 49) DAVIES R. - "Studies on the acetone-butyl alcohol fermentation". Biochem. Jour 36: 582 (1942).
- 50) BANZON FULNER y UNDERKOFER: "Fermentation utilization of cassava. The Butyl-acetonic fermentation". Proc. Iowa Acad. Sci. 48: 233 (1941).
- 51) PITTMAN M. - "A study of fluid thioglycolate medium for the sterility test". Jour Bact. 51: 19 (1946).
- 52) TANNER, VOJNOVICH y VAN LANEN - "Riboflavin production by Candida species". Science 101: 180 (1945).
- 53) RODGERS, HENIKA and HANSON - "Relation of strain variation and culture history to the synthesis of riboflavin by Clostridium acetobutylicum in Whey". Jour Bact. 51: 569 (1946).
- 54) VINTON A. - "The microbiological synthesis of riboflavin; a theory concerning its inhibition". Jour Amer. Chem. Soc. 68: 835 (1946).
- K - "Production of Riboflavin by the Butyl bacteria". Chemische Listy 41: 238 (1947). En abstract: Biolog.

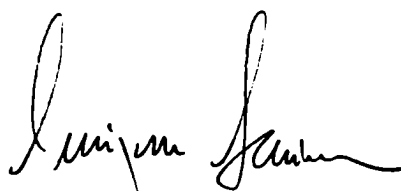

Abstr. 16885 (1948).

- 56) HOUSEWRIGHT, RILEY and KOBER - "A study of the p-aminobenzoic acid requirements of *Clostridium acetobutylicum*. Application to assay procedure". Jour. Infect. Dis. 75: 113 (1944).
- 57) IERUSLIMSKII and SEMENOVA - "Studies on the physiology of metabolism of *Clostridium acetobutylicum*". Mikrobiologiya 13: 116 (1944). En Abstract: Biolog. Abstr. 3228 (1946)
- 58) MARROQUIN, SANCHEZ y HERNANDEZ CABRERA - "Ensayos sobre algunos medios de cultivo para las bacterias de la fermentación Butanol-acetónica". Ciencia 8: 163 (1948).
- 59) WOOD, BROWN and WERKMAN - "Fixation of carbon dioxide in lactic acid by *Clostridium butylicum*". Arch. Biochem. 5: 423 (1944).
- 60) SIMON E. - "Investigations on the acetone-butyl alcohol fermentation". Arch. Biochem. 14: 39 (1947).
- 61) BEESCH S. - "Acetone-butanol fermentation of sugars". Ind. Eng. Chem. 44: 1677 (1952).
- 62) GRASSMANN and HAAG - Z. Physiol. Chem. 167: 188 (1927).
- 63) SAVINO Y RENNIELLA - "El cultivo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae* (Inada e Ido 1915). IV Cultivo en medio sintético y semisintético". Rev. Inst. Bact. "Dr. Carlos G. Malbrán" 9: 322 (1943).
- 64) MUELLER and JOHNSON - "Production of diphtheric toxin of high potency on a reproducible medium". Jour Imm. 40: 33 (1941).
- 65) SORIANO S. - "Estudio microbiológico del proceso de fermentación de la chicha". Rev. del Inst. Bact. (D N H) 8: 231 (1938).
- 66) FERRACIOLA R. - "Exámen Bacteriológico de aguas". Buenos Aires Ateneo 1947.
- 67) STILES, PETERSON and FRED - "A rapid method for the determination of sugar in bacterial cultures". Jour Bact. 12: 427 (1926).
- 68) SCHAFFNER and HARTEMAN - "The Iodometric determination of cooper

and its use in sugar analysis". Jour Biol.
Chem. 45: 365 (1920).

69) CHRISTENSEN and FULNER - "Analysis of n-Butanol, Acetone and
Ethanol in aqueous solution". Ind. Eng.
Chem. An. Ed. 7: 180 (1935).

70) GOODWIN S. - "Analysis of acetone by Messinger's method". Jour
Am. Chem. Soc. 42: 39 (1920).



Dr. E. SAVINO