

EVALUACION DE CEPAS DE *Clostridium acetobutylicum* PARA EL DESARROLLO DE LA FERMENTACION ACETOBUTILICA

** CLAUDIA PARRA
LUÍS E. LÓPEZ
JOSÉ GRANADOS
JULIO DUMAR

** DOLLY MONTOYA
* SALOMÓN FERREIRA
** GUSTAVO BUITRAGO
* EDELBERTO SILVA

total solvents (12.30 g/L) and higher productivity (0.205 of total solvents/L h).

INTRODUCCION

En 1912 Weisman aisló un microorganismo capaz de fermentar almidón de patatas y muchas otras fuentes amiláceas, el cual producía acetona, butanol y etanol, al que denominó *Amylobacter pectinovorum*, luego llamado *Clostridium acetobutylicum* (WALTON y MARTIN, 1979) (PRESCOTT y DUNN, 1979). Este microorganismo es capaz de degradar hexosas, pentosas, disacáridos, polisacáridos, glicerina, ácido cítrico y residuos agrícolas, en un proceso llamado fermentación acetobutílica (ABE) (COMPERE y GRIFFITH, 1979) (WALTON y MARTIN, 1979).

La fermentación ABE en cultivos discontinuos se caracteriza por tener dos fases, una acidogénica donde los ácidos acético y butírico se producen simultáneamente con el crecimiento celular, generando una caída del pH por debajo de 5.0, lo cual asociado a otros eventos de la célula hacen activar algunas enzimas y reprimir otras, cambiando el metabolismo hacia la segunda fase denominada solventogénica, en donde se presenta la reasimilación de los ácidos acumulados en el comienzo, para ser transformados en Acetona, Butanol y Etanol, originado un leve aumento en el pH (HÜSEMAN and PAPOUTSAKIS, 1988). Los niveles de solventes generados durante la fermentación ABE dependen de la cepa utilizada, de la composición del medio de cultivo y de las condiciones fisicoquímicas del sistema. Por ejemplo, el pH varía entre 6.0 y 4.5 (NISHIO et al, 1983); se requiere un potencial redox de entre -200 y -300 mv (JONES y WOODS, 1986); la temperatura más apropiada para la producción de solventes está entre 30 y 35°C y la agitación alrededor de los 200 rpm (JONES y WOODS, 1986).

Desde la década de los setenta la producción de n-butanol por fermentación de materias primas renovables ha recobrado interés como alternativa de producción de este químico por ser un proceso limpio, no contaminante y también por la incertidumbre generada con el aumento de los precios del petróleo (PARK et al, 1989) (LINDEN et al, 1986) (KROUWEL et al, 1983). Es por esto que el Instituto de Biotecnología de Univer-

RESUMEN

En este trabajo se hizo la evaluación de tres cepas de *Clostridium acetobutylicum* (DSM 1732, DSM 792 y ATCC 824) para la fermentación acetobutílica (ABE). De las tres, la cepa de *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732 fue la cepa seleccionada por que produce la mayor cantidad de solventes totales (8.9 g/L), el mayor rendimiento ($Y_{p/s}$ 0.173) y la mayor productividad (0.205 g de solventes totales/L h). Luego con la cepa seleccionada se evaluó el efecto de la melaza sobre la fermentación ABE dando como resultado que con este sustrato se obtiene mayor concentración de solventes totales (12.30 g/L) y mayor productividad (0.205 g de solventes totales/L h).

ABSTRACT

Three strains of *Clostridium acetobutylicum* (DSM 1732, DSM 792 and ATCC 824) were evaluated in relation to their capacity to perform the acetobutylic (ABE) fermentation. The strain *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732 was selected because it's which produced the higher concentration of total solvents (8.9 g/L), the higher yield ($Y_{p/s}$ 0.173) and the higher productivity (0.205 g of total solvents/L h). Then the selected strain was used to evaluate the effect of the molase on the ABE fermentation. It produced higher concentration of

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Santafé de Bogotá
D. C. A.A. 14490.

* Departamento de Farmacia

** Instituto de Biotecnología.

sidad Nacional de Colombia viene desarrollando el proyecto "Producción de Butanol y Acetona por Fermentación", mediante la degradación de mieles y melazas de caña con *Clostridium acetobutylicum*. Una de las primeras etapas es el estudio cinético de la fermentación ABE utilizando varias cepas del microorganismo, para determinar cual de ellas es la que se utilizará para el avance del proyecto en cuanto a desarrollo de mutantes hiperproductores de butanol, optimización de medios de cultivo, evaluación de diferentes esquemas de fermentación, entre otras actividades.

MATERIALES Y METODOS

MICROORGANISMOS: *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, DSM 1732, y DSM 792.

MEDIOS DE CULTIVO: Medio vegetativo: glucosa 20 g, triptosa 10 g, peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, Na_2SO_4 0.2 g, K_2HPO_4 3.5 g, solución de minerales 1 mL y agua destilada c.s.p. 1L. **Medio de fermentación I:** similar al medio vegetativo pero con glucosa 60 g/L. **Medio de fermentación II:** Igual al medio de fermentación I, pero en lugar de glucosa se adicionó el equivalente en melaza "black strap".

METODOS ANALITICOS: Centrifugar 1 mL de muestra a 5000 rpm/15 min. El sobrenadante se utiliza para determinar sustrato residual y acidez titulable. El pelet se resuspende en 5 mL de solución de NaCl (0.9% p/v) y se vuelve a centrifugar, se descarta el sobrenadante y se resuspende de nuevo en 10 mL de solución de NaCl y se determina la biomasa.

Biomasa se hizo mediante la utilización de una correlación predeterminada entre la absorbancia a 540 nm de una suspensión de células y su correspondiente peso seco en g/L. Con el sobrenadante de las muestras centrifugadas a 5000 rpm/30 min. **Sustrato residual** por el método de la glucosa oxidasa (MERK). **Acidez Titulable** mediante titulación ácido base

con una solución normalizada de NaOH 0.1N. **Solventes** por cromatografía de gases con un cromatógrafo Perkin Elmer 900, detector FID, una columna de acero inoxidable de 20 pies de longitud y diametro interno de 1/8", hallcomid M-18 al 4.3% con carbowax K-600 al 5%, temperatura del puerto de inyección y del detector 170°C, y la temperatura de la columna 180°C. Para cuantificar se utiliza el método del patrón interno (DUMAR y GRANADOS, 1987).

FERMENTACIONES: Colocar 1 mL del "stock" de esporas del microorganismo en 9 mL de medio vegetativo, activar con choque térmico (80°C/3 min.) e incubar a 37°C por 24-36 horas. Este preinóculo es transferido a 100 mL de medio de fermentación e incuba por 24 horas. Luego se inocula un matraz que contiene 1 litro de medio de fermentación y se incuba por 125 a 144 horas, durante las cuales se toman muestras periodicamente para hacer los análisis respectivos.

RESULTADOS Y ANALISIS

Para realizar la evaluación de las cepas de *C. acetobutylicum* (ATCC824, DSM 792 Y DSM 1732) se hicieron las fermentaciones simultaneamente, en las cuales se determinó la producción de biomasa, el sustrato residual y producción de solventes y con estos datos se calculó velocidad específica de crecimiento (μ), porcentaje de sustrato consumido (%SC) rendimiento de sustrato en biomasa ($Y_{x/s}$), rendimiento de sustrato en producto ($Y_{p/s}$) y Productividad (P), con el fin de evaluar el desarrollo de la fermentación que realiza cada cepa.

Observando la Tabla No. 1 vemos como la cepa DSM 1732 produce mayor cantidad de biomasa y de solventes totales, y consume en su totalidad el sustrato disponible. En relación a la biomasa, produce un 17% más que la ATCC 824 y 33% más que la DSM 792. Con respecto a los solventes totales la DSM 1732 produce casi 70% más que la ATCC 824 y 90% más que la DSM 792.

TABLA No. 1. Parámetros cinéticos de la fermentación ABE con *C. acetobutylicum*.

CEPA	BIOMASA	SR	ST	m	%SC	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	P
ATCC 824	1.86	9.18	2.80	0.124	82	0.041	0.066	0.020
DSM 792	1.50	13.55	0.92	0.101	74	0.037	0.024	0.007
DSM 1732	2.25	0.00	8.90	0.110	100	0.040	0.173	0.205

SR: Sustrato Residual (g/L) ST: Solventes Totales (g/L) %SC: % Sustrato Consumido

$Y_{x/s}$: Rendimiento de Sustrato en Biomasa (g. de Biomasa / g de SC)

$Y_{p/s}$: Rendimiento de Sustrato en Producto (g. de ST / g de SC)

P: Productividad (g de ST / L h) μ Velocidad Especifica de Crecimiento (h^{-1})

Al examinar el comportamiento cinético de la producción de biomasa el consumo de sustrato, la acidez titulable y la producción de solventes (Figuras Nos 1, 2, 3 y 4) se aprecia como la cepa DSM 1732 es la que logra su máximo nivel de producción de biomasa (Fig. No. 1) en menor tiempo (25 horas) mientras que la ATCC 824 y la DSM 792 requieren más tiempo (41 y 142 horas respectivamente). La cepa DSM 1732 logra consumir todo el sustrato disponible en 40 horas, mientras las otras dos cepas consumen el 82% (ATCC) y 74% (DSM 792) a las 142 horas de fermentación (fig. No. 2). Se debe observar que todas cepas entre las 25 y las 40 horas logran un nivel de consumo similar (aprox. 15 g/L de SR), y solamente la cepa DSM 1732 continúa consumiendo el sustrato hasta agotarlo, mientras que en las demás cepas el consumo se estabiliza. Esta diferencia en el comportamiento es la que permite que la cepa DSM 1732 logre la reasimilación de los ácidos acumulados, representada en la disminución de la acidez titulable, evento que no se presenta en la cepa ATCC 824 cuya acidez titulable permanece estable una vez alcanza su máximo nivel (Fig. No. 3). Asociado a la reasimilación de los ácidos acumulados durante la fase de crecimiento, se presenta la mayor producción de solventes por parte de la DSM 1732, mientras que los niveles de producción de las otras dos cepas son bien bajos (Fig. No. 4).

Podemos concluir que la producción de solventes está directamente ligada al consumo de sustrato y la reasimilación de los ácidos. Si estos dos eventos no se presentan la producción de solventes se ve afectada. Lo anterior concuerda con lo expuesto por JOHNNES (1986) y HARTMANIS et al (1984), quienes postulan que la producción de solventes depende de la reasimilación de los ácidos para que se transformen en solventes, y que a su vez, esta reasimilación requiere del consumo de sustrato, sin lo cual este evento no podría llevarse a cabo.

Como a nivel industrial con el proceso de fermentación ABE solo se ha logrado una producción de 18 a 20 g/L

(WALTON y MARTIN, 1979), se hace necesario diseñar un medio de cultivo sencillo y que utilice materias primas económicas, por esta razón se procedió a estudiar cual sería el efecto sobre la fermentación si la fuente de carbono (glucosa) es reemplazada por melaza. Para ello se hicieron fermentaciones simultáneas con los medios I y II, empleando la cepa seleccionada (*Clostridium acetobutylicum* DSM 1732).

Como se puede apreciar en la Tabla No. 2, el medio de fermentación II permite al microorganismo obtener un mayor cantidad de biomasa y de solventes totales, lo cual está asociado al mayor consumo de sustrato. Esto repercute en los otros parámetros como son los rendimientos y la productividad de la fermentación. Este comportamiento se ve mejor ilustrado en las Figuras 5 y 6, donde podemos observar que con el medio II la máxima producción de biomasa (2.40 g/L) se logra en menor tiempo (50.25 h) comparada al otro medio que produce menos biomasa (1.60 g/L) en mayor tiempo (95 h).

Analizando el consumo de sustrato se ve como el medio II favorece este hecho, dando lugar a un mayor consumo (63%), que con el medio I (54%), lo cual va a repercutir en la producción de solventes.

En cuanto a la producción de solventes, con el medio II se logran la mayor producción de solventes (12.3 g/L) a las 72 horas, mientras que con el medio I para la mayor producción (8.86 g/L) se necesitan 96 horas.

Hay varias razones por las cuales con el medio II se logra la mayor producción de solventes, una de ellas es que la melaza es una fuente de carbohidratos con un alto contenido de nutrientes (minerales, vitaminas y aminoácidos) que favorecen el desarrollo de la fermentación ABE (WARD, 1991), en segundo lugar con el medio II el microorganismo crece más lentamente (Tabla No. 2), lo cual está inversamente correlacionado con la producción de solventes, a menor velocidad de crecimiento mayor producción de solventes (BAHL

TABLA No. 2. Parámetros cinéticos de la fermentación ABE con *C. acetobutylicum* DSM 1732.

MEDIO	BIOMASA	SR	ST	μ	%SC	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	P
I	1.60	20.05	8.86	0.1157	54	0.0691	0.3759	0.0928
II	2.40	17.50	12.30	0.0201	63	0.0705	0.3613	0.1720

SR: Sustrato Residual (g/L) ST: Solventes Totales (g/L) %SC: % Sustrato Consumido

$Y_{x/s}$: Rendimiento de Sustrato en Biomasa (g. de Biomasa / g de SC)

$Y_{p/s}$: Rendimiento de Sustrato en Producto (g. de ST / g de SC)

P: Productividad (g de ST / L h) μ : Velocidad Específica de Crecimiento (h^{-1})

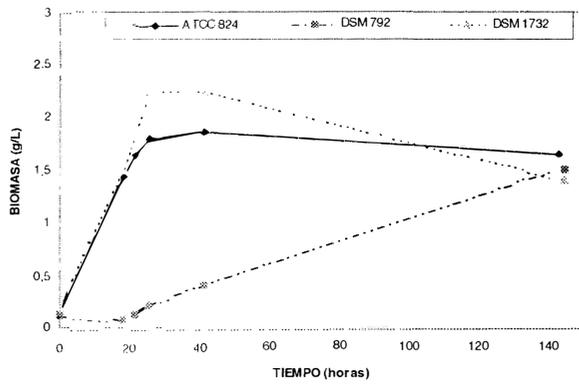


FIGURA No. 1. Producción de Biomasa en la Fermentación ABE con *C. acetobutylicum*

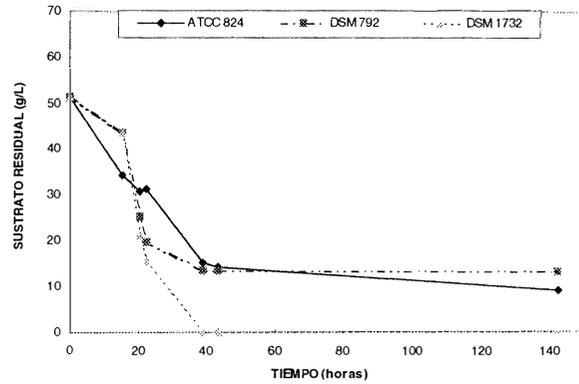


FIGURA No. 2. Consumo de sustrato en la fermentación ABE con *C. acetobutylicum*

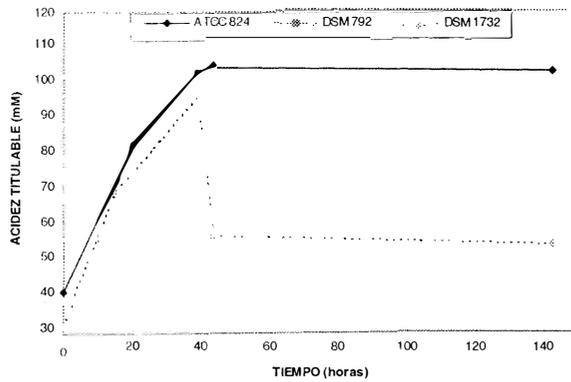


FIGURA No. 3. Acidez titulable en la fermentación ABE con *C. acetobutylicum*

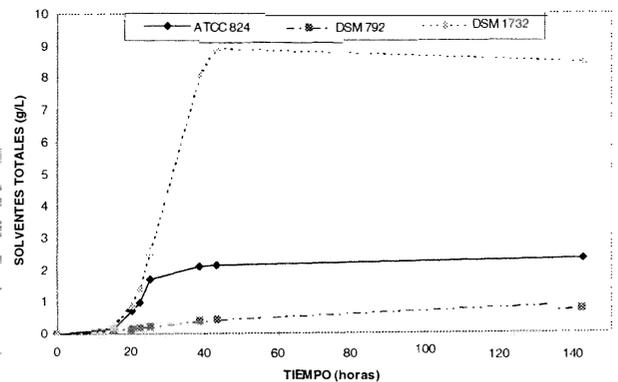


FIGURA No. 4. Producción de solventes en la fermentación ABE con *C. acetobutylicum*

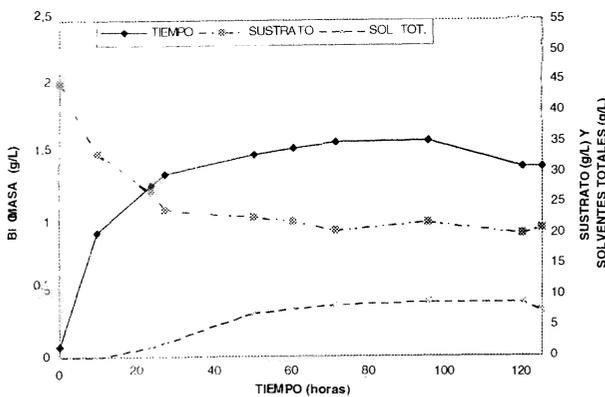


FIGURA No. 5. Fermentación ABE con *C. acetobutylicum* DSM 1732 en el medio I

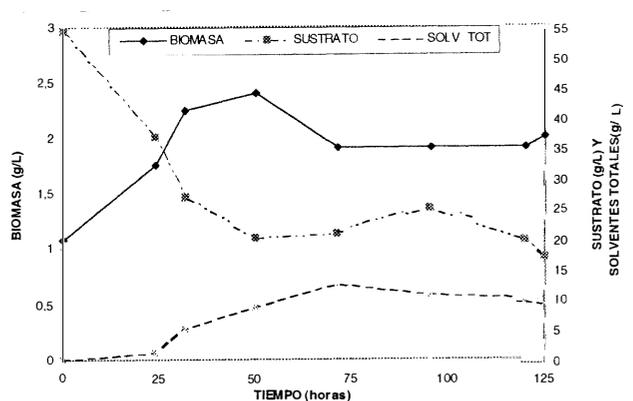


FIGURA No. 6. Fermentación ABE con *C. acetobutylicum* DSM 1732 en el medio II

y GOTTSCHALK, 1984). tercero, la acumulación de los ácidos generados en la fase de crecimiento (representados por la acidez titulable) se hace más lentamente y en menor proporción (Fig. Nos 5 y 6) lo cual puede permitir su resimilación (HARTMANIS et al. 1994), y unido a todo esto, el consumo de sustrato es permanente, hecho que es necesario para que los ácidos puedan ser reasimilados mediante su incorporación a la ruta solventogénica y de esta manera ser transformados en acetona, butanol y etanol (JONES y WOODS, 1986).

CONCLUSIONES

De las tres cepas de *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824, DSM 792 y DSM 1732) utilizadas para el desarrollo de la fermentación ABE la cepa DSM 1732 es la más apropiada, puesto que produce la mayor cantidad de solventes, con el mayor rendimiento y productividad.

La melaza es un sustrato apropiado para el desarrollo de la fermentación ABE, pues con el medio II se logra la mayor producción de solventes con la mayor productividad.

La producción de solventes en la fermentación ABE depende de la cepa utilizada y del medio de cultivo empleado.

BIBLIOGRAFIA

1. M. T. WALTON and J. L. MARTIN. "Microbial Technology". J. PEPPLER and D. PERLMAN. Edits. 2nd. Edit. 1979. Volumen 1. Pp 187-209.
2. S. J. PRESCOTT and G. C. DUNN. "Industrial Microbiology". Editorial Aguilar. Madrid. (1979).
3. A. L. COMPERE and W. L. GRIFFTH. Dev. Ind. Microb. 20, 509-517. (1979).
4. M. H. W. H_SEMAN and E. T. PAPOUTSAKISD. Biotech. and Bioeng. 32. 843-852. (1988).
5. N. NISHIO, H. BIEBL and M. MEINERS. J. Ferm. Tech. 61. 101-104. (1983).
6. T. JONES and D. R. WOODS. Microbiol. Rev.. 50, 484-524. 1986.
7. C. H. PARK, M. R. OKOS and P. C. WANKA. Biotechn. Bioeng. 34, 18-29. (1989).
8. J. C. LINDEN, A. R. MOREIRA and G. LENZ. "Comprehensive Biotechnology. The Principles of Biotechnology: Engineering Consideration". C. L. CONNEY and A. E. HUMPHREY Edits. 1986. Pp. 915-931.
9. P. G. KROWEL, W. F. M. Van der LAAN and N. W. F. KOSSEN. Biotech. Let. 2. 253-258. (1980).
10. J. DUMAR y J. M. GRANADOS. "Estandarización de técnicas analíticas para la determinación de parámetros cinéticos en la fermentación acetobutílica". Tesis. Universidad Nacional de Colombia. (1987).
11. O. P. WARD. "Biotecnología de las Fermentaciones. principios, procesos y productos". Edit. Acribia. Zaragoza. 1991.
12. H. BAHL and G. GOTTSCHALK. Biotech. Bioeng. Symp. 14. 169-172. (1986).
13. G. N. HARTMANIS, T. KLASON and S. GATENBECK. App. Microb. Biotech. 20. 66-71. (1984).