



**FERMENTACION ACETONA-BUTANOL A PARTIR  
DE MIELES INCRISTALIZABLES**

**ANTONIETA ROSALINDA ACEVES LARA**

**GUADALAJARA, JAL.**

**1966**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

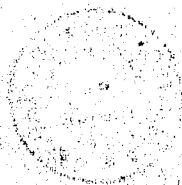
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela de Ciencias Químicas

U. N. A. M.



• **Fermentación Acetona-Butanol a Partir de Mielles Incristalizables**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**p r e s e n t a:**  
**Antonieta Rosalinda Aceves Lara**

**GUADALAJARA, JAL.**

**1966**





A mis padres con todo cariño  
Sra. María Lara de Aceves y  
Sr. Ángel Aceves Medina.

Con todo respeto y gratitud a quienes me  
dirigieron este trabajo:

Ing. Q. Juan José Trujillo  
Q. B. P. Jaime Mendiola  
Q. F. B. Francisco Espinoza

Con toda mi estimación y agradecimiento  
a las señoras:

Matilde D. de Villalvazo y  
Andrea L. Vda. de Quintanar

**A mis hermanos:**

**Cuitláhuac Aceves L.**

**Tonatiuh Aceves L.**

**al Sr. Ing. Yukio Nishikawa.**

**FERMENTACION ACETONA-BUTANOL A PARTIR  
DE MIELES INCORISTALIZABLES**



## CAPITULOS

- I.- Introducción.
- II.- Fundamentos de la fermentación acetona-butanol.
- III.- Fermentación acetona-butanol por bacterias del género *Clostridium*.
- IV.- Características del *Clostridium acetobutylicum*.
- V.- Estudio de las sales incristalizables.
- VI.- Trabajos realizados.
- VII.- Resultados.
- VIII.- Conclusiones.
- IX.- Bibliografía.

## I.- INTRODUCCION

La producción microbiológica de acetona y butanol fué uno de los primeros procesos microbiológicos producidos en gran escala, en gran parte iniciada por Chaim Weizmann.

Este proceso ha servido principalmente en la producción de butanol, aunque durante la primera guerra mundial la acetona producida en la fermentación fué muy útil en las fábricas de municiones para disolver la cordita.

El butanol se usa en numerosos procesos industriales desde la producción de lacas hasta la extracción de los antibióticos de los medios de cultivo. Las resinas urea-formaldehído también se producen empleando butanol.

La acetona tiene empleo como materia prima para algunas síntesis orgánicas, para la preparación del cloroformo, del isopreno, del sulfonal, de las iononas. Una de sus aplicaciones más valiosas tanto en el laboratorio como en la industria, se basa en su gran poder disolvente, no solo de sustancias orgánicas sino también de sustancias inorgánicas, con la particularidad de ser miscible con el agua y con numerosos disolventes orgánicos. Por su capacidad para mezclarse con el agua es utilizada la acetona como deshidratante onérgico.

El alcohol butílico normal fué descubierto por Wurtz en 1852 como un componente encontrado regularmente en el aceite de fuel. Sin embargo, Pasteur, fué el primer investigador que demostró que el alcohol butílico era un producto directo de la fermentación. Sus investigaciones se basaban en los resultados

de la fermentación butírica del ácido láctico y lactato de calcio.

De 1876 a 1910 las investigaciones referentes al butanol fueron hechas por Fitz (1882, 1884), Gruber (1887), Grimbart (1893), Beijerinck (1893), Duclaux (1895), Emerling (1897), Grassberger y Schattenfroh (1902), Winogradsky (1902), Schardinger (1905) y otros.

La necesidad de hule sintético, ayudó al éxito de los primeros procesos comerciales.

El primer proceso comercial importante se produjo en Inglaterra por la firma Strange & Graham, Ltd. (1913 y 1914) que empleó a Perkin, Weismann, Fernbach, Schoen y otros. Weismann dejó el empleo de esta firma en 1912 y un poco después aisló una bacteria anaerobia que fermentaba el almidón y era capaz de producir excelentes porcentajes de acetona y butanol. Esta bacteria, aislada después, recibió el nombre de *Clostridium acetobutylicum* Weismann y se empleó en procesos industriales.

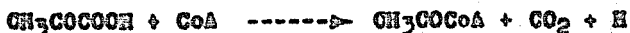
## II.- FUNDAMENTOS DE LA FERMENTACION ACETONA BUTANOL

Este tipo de fermentación se caracteriza por la producción de acetona y butanol. Debido a la importancia industrial de estos compuestos, se ha estudiado con mayor detalle que otras fermentaciones debidas a clostridias.

La formación de los productos principales de la fermentación del *Clostridium acetobutylicum*, se siguió a intervalos, durante su desarrollo, en un medio conteniendo glucosa y los resultados se pueden observar mediante la gráfica (Fig. 1)

La fermentación se puede dividir en dos fases. En los primeros estadios (arriba de 13 horas) la fermentación es esencialmente del tipo de la butírica.

La glucosa se descompone en ácido pirúvico por el ciclo EMP (Embden Meyerhof Parnas), (Cynkin y Gibbs, 1958). El piruvato se transforma a un derivado del ácido acético (acetil coenzima A o acetil fosfato) dióxido de carbono e hidrógeno. Es posible que la acetil coenzima A (CoA) sea el producto primario



El mecanismo de la reacción es complejo e incompletamente entendido. El trifenil fosfato (TFP) interviene y es probable que se forme un trifenil fosfato (TFP) acetaldehído complejo, en la descarboxilación primaria. Ciertamente no hay evidencia para la formación intermedia de ácido fórmico. Probablemente el complejo acetaldehído es después oxidado con liberación de acetil coenzima A o hidrogeno libre.

Algo de acetil coenzima A es convertido a ácido acético por la probable producción intermedia de acetil fosfato y la subsiguiente formación de una unión fosfato rica en energía. El resto de la acetil coenzima A se convierte a ácido butírico. - Las reacciones que intervienen en esta transformación son esencialmente las que intervienen en los ácidos grasos.

Inicialmente dos moléculas de acetil coenzima A se condensan para formar aceto acetil coenzima A. No hay evidencia de que este sistema requiera dióxido de carbono activado o intervenga en la formación intermedia de malonil coenzima A como ocurre en algunos ciclos de las síntesis de ácidos grasos. La aceto acetil coenzima A es después reducida por la beta hidroxil butiril coenzima A y crotonil coenzima A para dar butiril coenzima A que finalmente se convierte a ácido butírico.

Como resultado de la acumulación de ácido acético y ácido butírico hay un rápido descenso del valor del pH, alrededor de 4.5.

La segunda fase después de 18 horas, el ácido acético y el ácido butírico empiezan a desaparecer del medio para ser reemplazados por el butanol y la acetona como productos principales de la fermentación.

Finalmente después de 48 horas, el balance es similar a la siguiente tabla, en la que se compara con las fermentaciones producidas por otros clostridios.

**BALANCES DE LAS FERMENTACIONES DE TRES TIPICAS  
CLASES DE CLOSTRIDIUM**

Productos	Cl. butyricum	Cl. acetobutylicum	Cl. butylicum
Acido butírico	76	4	17
Acido acético	42	14	17
Etolol			
Butanol	--	7	--
Acetona	--	22	--
Isopropanol	--	--	12
Acetilmetilcarbinol	--	6	--
CO <sub>2</sub>	188	221	204
H <sub>2</sub>	235	135	78
Total c%	96	100	96

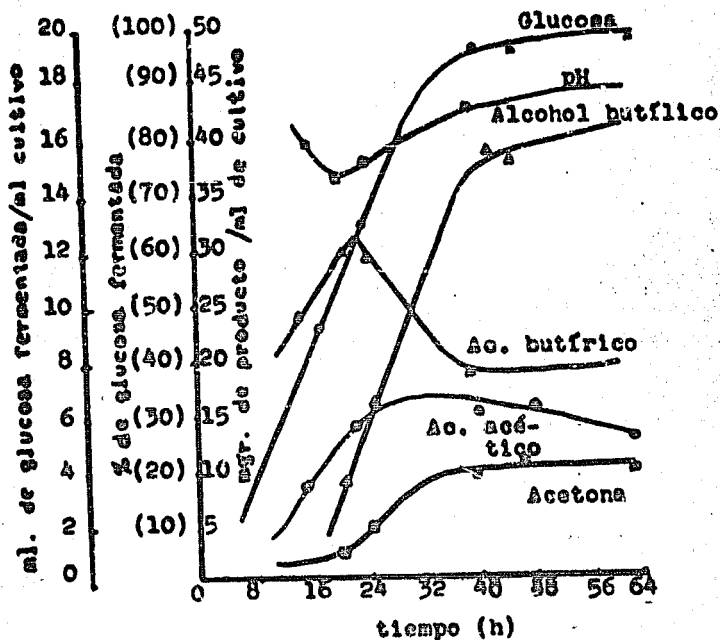
La segunda fase se puede considerar como un mecanismo de neutralización, similar al que ocurre cuando la *Klobsiella - aerogenus* produce acetilmetilcarbinol a un valor ácido de pH - permitiendo una fermentación continua.

Es probable que las enzimas responsables de la síntesis de la acetona y el butanol se forman solo como respuesta al valor bajo de pH del medio. Esto es realmente verdadero para la enzima responsable de la descarboxilación del ácido acetoacético, reacción a la cual se debe la síntesis de la acetona.



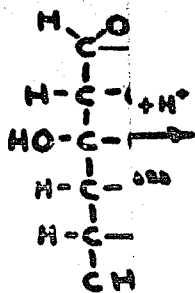
El butanol se forma por reducción del ácido butírico  
o butiril-coenzima A al correspondiente alcohol.



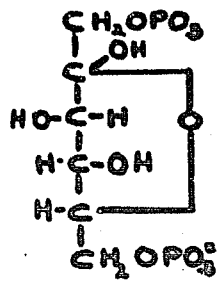


(fig.) Curso de la fermentación de la glucosa por el *Clostridium acetobutylicum*.

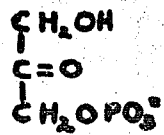




D-Glu.



D Fructosa 1,6 difosfato



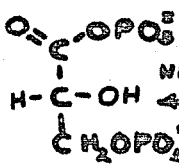
Dihidroxiacetona fosfato

Triosa fosfato isomerasa

Aldolasa

$\text{ADP} + \text{H}^+$

fosfogliceral quinasa

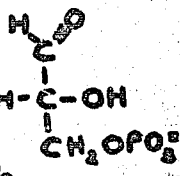


1-3 difosfato glicerato

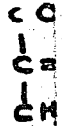
$\text{NADH} + \text{H}^+$

$\text{NAD}^+$

Gliceraldehido fosfato desidrogenasa

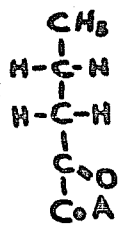


D Gliceraldehido 3 fosfato



Piruv

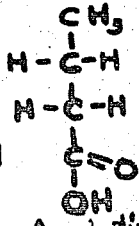
$\text{CoA}$  generoso DPH



Butiril CoA

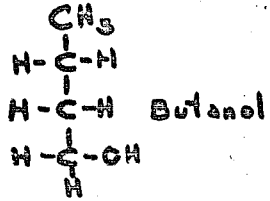
Ac Lipico Hidrolasa

$\text{Co-SH}$



Ac. butirico

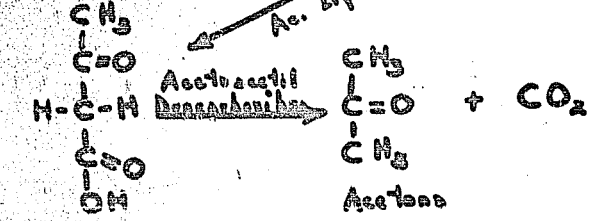
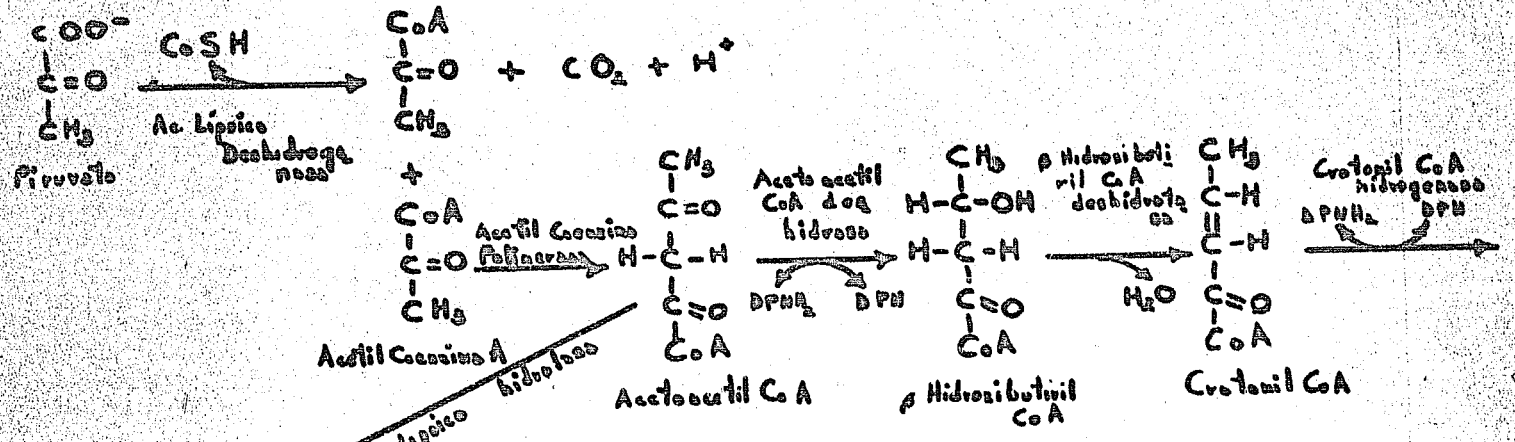
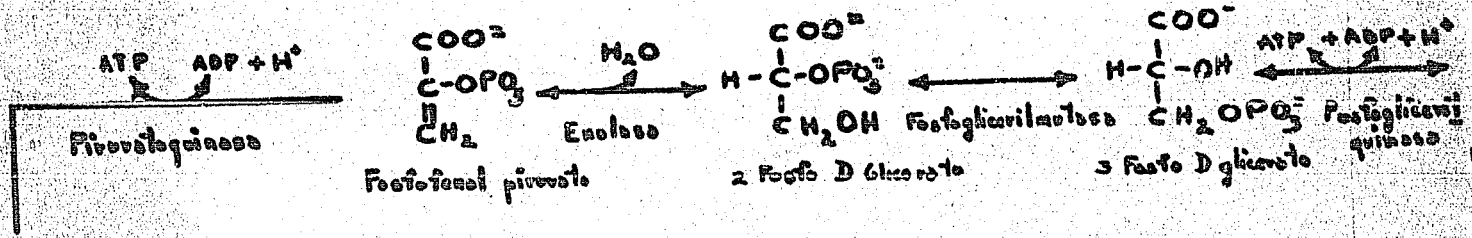
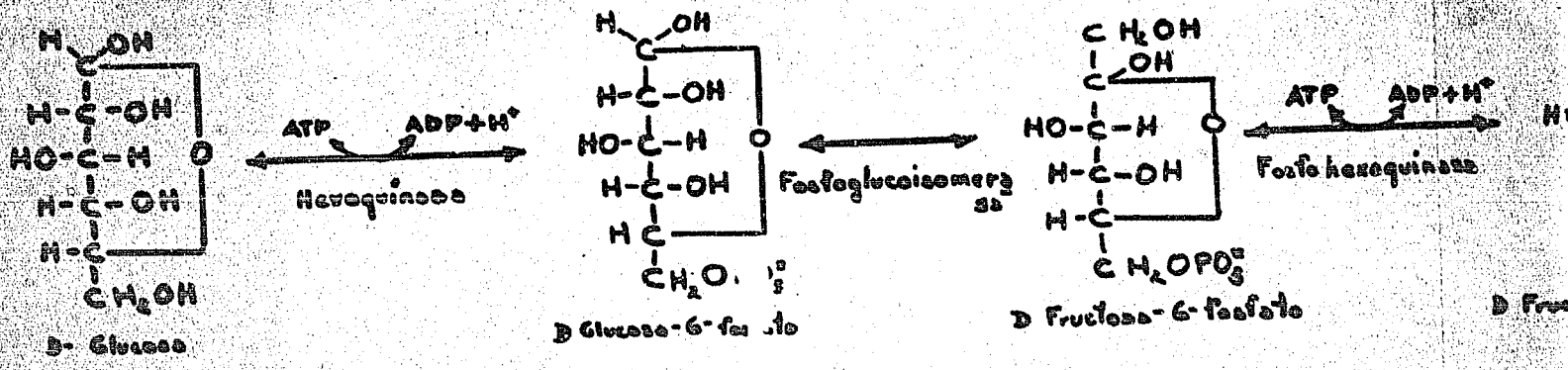
$\text{DPNH}_2$  Butiril reductasa



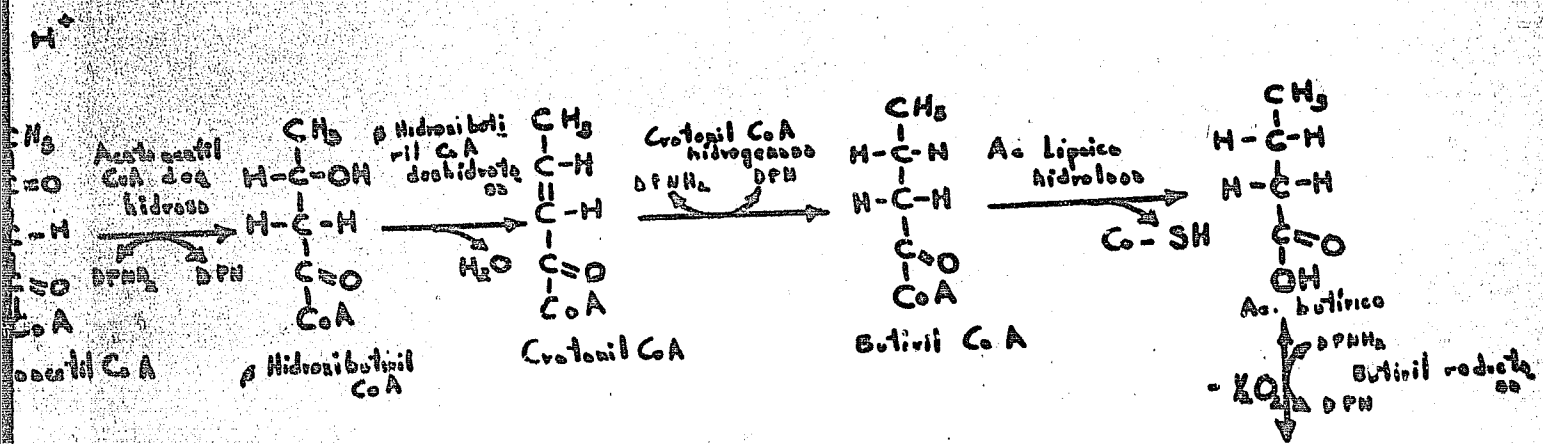
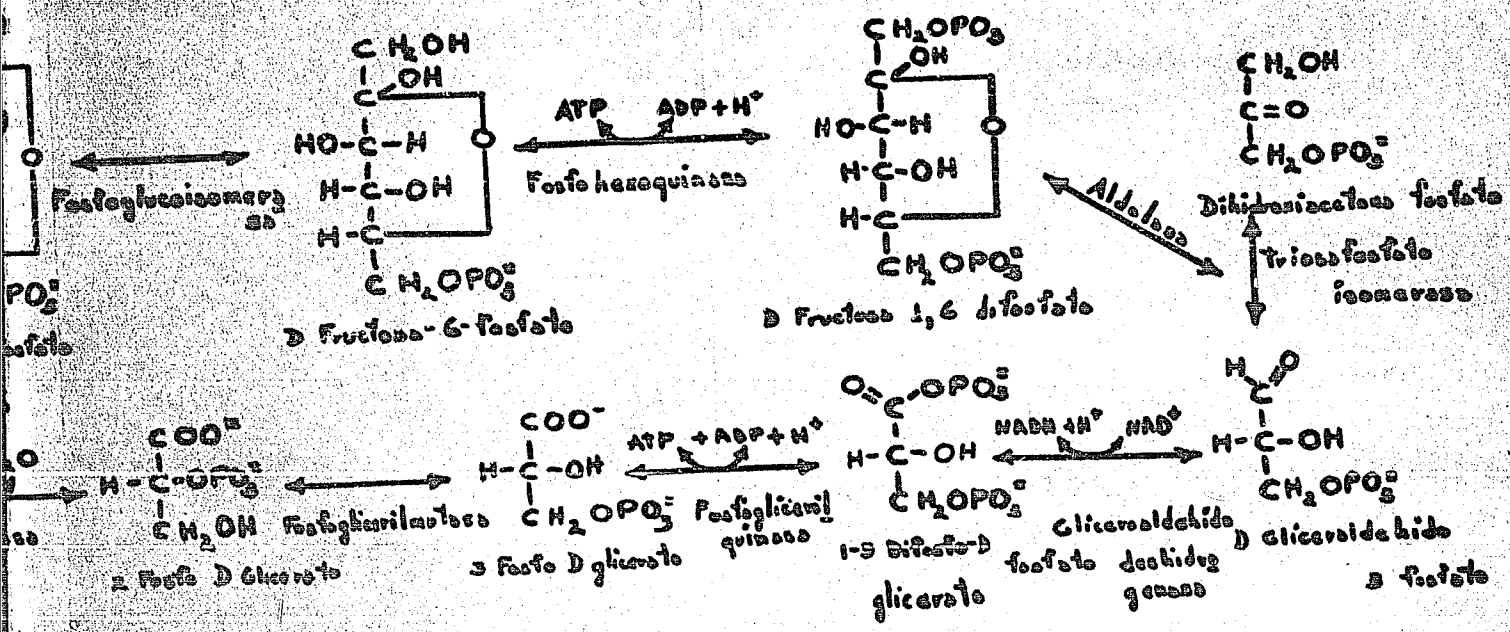
Butanol

ucción





# Ciclo Metabólico de Producción de Acetona y Butanol



## Ciclo Metabólico de Producción de Acetona y Butanol

### III.- FERMENTACION ACETONA-BUTANOL POR BACTERIAS

#### DEL GENERO CLOSTRIDIUM

Se conocen varios microorganismos que producen acetona y butanol como productos finales de la desasimilación anaeróbica de los azúcares, pero los organismos que se han empleado en escala comercial para producir estos solventes son casi todas especies de la bacteria esporógena anaerobia Clostridium. La descomposición de los azúcares por esta bacteria da una serie de productos finales que incluyen: acetona, n-butanol, iso-propanol, etanol, ácido fórmico, ácido acético, ácido butírico, acetilmetilcarbinol, dióxido de carbono e hidrógeno.

Los solventes se producen en distintos porcentajes por estas bacterias.

El siguiente cuadro indica los porcentajes de solventes producidos por las diferentes bacterias sacarolíticas.

**% DE SOLVENTES PRODUCIDO POR DIVERSAS BACTERIAS SACAROLITICAS**

Nombre de la bacteria	Substrato	Alcohol butilico.	Alcohol etilico	Acetona	Alcohol isopropilico
<i>Cl. saccharobutylicum</i>	Hieles finales y $\text{CaCO}_3$	65-80	---	18-34	1-2
<i>Cl. saccharobutyl-ace tonicum</i>	Miel fina, maiz gluten y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	64	---	36	
<i>Cl. viscifaciens</i>	Melaza invertida y $\text{CaCO}_3$	66	---	3	31
<i>Cl. saccharoacetobutyl-licum-beta y gamma</i>	Melaza de caña y - proteina degradada	68-73	1-3	26-32	---
<i>Cl. propil butylicum</i>	Melaza invertida - $\text{NH}_3$ y - $\text{CaCO}_3$	69-70	---	4-17	14-28
<i>Cl. invertosacetobutyl-licum</i>	Melaza de Louisiana (invertida) sales de $\text{NH}_3$ o dicalcia.	66-70	2-3	27-31	---
<i>Cl. saccharoacetobutyl-licum</i>	Melaza de Louisiana $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{CaCO}_3$	68-73	1-3	26-32	---
<i>Cl. saccharobutyl-ianopropil acetonicum</i>	Melaza invertida y proteinas degradadas	pH bajo 60-70 pH alto 65-80	---	20-38 2-20	10-30
<i>Cl. celerifactor</i>	Melaza invertida - smontaco, y $\text{CaCO}_3$	60	2	38	

**% DE SOLVENTES PRODUCIDO POR DIVERSAS BACTERIAS SACAROLITICAS**

Nombre de la bacteria	Substrato	Alcohol butilico.	Alcohol etilico	Acetona	Alcohol isopropilico.
<i>Cl. butylicum-alfa</i>	Melaza in vertida, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , - CaCO <sub>3</sub> y - mgSO <sub>4</sub>	65-70	3-4	5-10	16-20
<i>Cl. granulobacter ace- tobutylicum</i>	Melaza, - gluten de maiz, sa- les de a- monio y - CaCO <sub>3</sub>	60-75	1-10	25-30	---
<i>Cl. saccharobutyl-iso- propil-aceticum-beta</i>	Melaza de caña y re- molacha, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y CaCO <sub>3</sub>	60-85	---	15-40	0.1-4
<i>Cl. madisonii</i>	Melaza fi- nal cuba- na, NH <sub>4</sub> OH (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y CaCO <sub>3</sub>	75-76	4-6	17-20	---
<i>Cl. amilosaccharobu- tyl-propilicum</i>	Melaza in- vertida, - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> CaCO <sub>3</sub> , y - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> o - NH <sub>4</sub> OH y - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	65-72	huellas	2-4	26-32
<i>Cl. saccharoacetoper- butylicum</i>	Melaza in- vertida, NH <sub>4</sub> OH y - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	69-76	2-7	18-25	---
<i>Cl. saccharobutyl-a- ceticum-liquefa- ciens-gamma y delta</i>	Melaza cu- bana P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y CaCO <sub>3</sub>				

#### IV.- CARACTERISTICAS DEL CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM

Estos bacilos son rectos, con extremos redondeados y se encuentran sueltos o en parejas, pero no en cadenas. Las células vegetativas miden de 0.6 a 0.72 por 2.6 a 4.7 micras, el clostridio de 1.3 a 1.6 por 4.7 a 5.5 micras. Las esporas son ovales, excéntricas a subterminales y por abultamiento producen formas clostrídicas. No capsulados. Móviles mediante flagelos peritricos. Son gram-positivos y se vuelven gram-negativos.

**Glucosa-gelatina:** licuefacción

**Glucosa agar, colonias en la superficie (anaerobio):**  
Compactas, levantadas, medianamente regulares.

**Glucosa agar, colonias profundas:** Compactas y lisas -  
El agar se fragmenta por la abundancia de gas.

**Pigmentación:** Ninguna. Colonias blanco cremosas, opacas.

**Caldo ordinario:** No hay crecimiento.

**Caldo glucosado:** Abundante y uniformemente turbio; -  
produciéndose mucho gas.

**Leche de tornasol:** Ácida y activa, a menudo grumosa, coagulación. El tornasol se reduce. Coágulo fragmentado por el gas pero no digerido visiblemente. Proteólisis demostrable, pero en agar leche.

**Papa:** Crecimiento amarillo cremoso. La papa es digerida a un limo amarillo.

**Papilla de maíz:** Mucho gas con olor butílico.

No produce indol.



**Acido sulfhídrico:** que proviene de tiosulfatos o sulfitos, generalmente negativo cuando se emplean materiales proteínicos.

Acido y gas de arabinosa, xilosa, ramnosa, glucosa, - galactosa, manosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa, melicitosa, almidón, dextrina, inulina, glicógeno, d-manitol alfa metil-glucosa y calicilina. Esculina, amigdalina y trihalosa son fermentadas débilmente. No fermentan: melibiosa, dulcitol, d-arabitol, perseitol, lactositol, sorbitol, eritritol, adonitol, inositol, quercitol, glicerol, pectina y celulosa.

Los productos de la fermentación incluyen acetona, alcohol butílico, ácido butírico y acético, hidrógeno y dióxido de carbono.

Se produce acetilmetilcarbinol de muchos carbohidratos.

Los nitritos no se producen de los nitratos. Los nitritos se reducen a amoniaco.

Fijan el nitrógeno atmosférico aunque menos activamente que el *Clostridium pasteurianum* (Roseblum y Wilson, Jour. - Bast., 57, 1949, 413).

Cubos de albúmina coagulados: Se ablandan y colorean de café debido a una digestión lenta.

Agar sangre: No hay hemólisis.

Agar suero: No hay licuefacción.

Medio de eosos: No se oscurece ni hay digestión.

Anaerobios.

**Temperatura óptima:** Probablemente cerca de 37°C. Crece entre 20°C y 47°C.

**No patógeno** para cobayos o conejos.

**Origen:** Aislado del maíz, melazas, papas y tierras de jardín.

**Habitat:** Amplia, pero aparentemente poco esparcido, - en tierras agrícolas.

## V.- ESTUDIO DE LAS MIELES INCRISTALIZABLES.

Se da el nombre de miel final o miel incristalizable a la última miel correspondiente a la última temple (masa que queda después de evaporar y cristalizar) cuya pureza es tan baja que una nueva cristalización de azúcar sería antieconómica.

Los análisis de las mieles incristalizables que se exigen oficialmente son los siguientes:

Brix, % de sacarosa aparente, % de pureza aparente, % de reductores parciales, % de reductores totales, % de sacarosa Clerget o verdadera, coeficiente glucósico, % de pureza verdadera y % de reductores totales en miel final a 65°Bx.

Pero en los análisis rutinarios de control de fábrica solo se determinan: Brix, % de sacarosa, % de pureza y % de glucosa.

### Brix.

Una de las determinaciones fundamentales en los materiales manejados en la fábrica de azúcar es el % de sólidos en solución. Estos sólidos comprenden azúcares, no azúcares, sustancias orgánicas e inorgánicas.

La determinación de estos sólidos en solución se hace por medio de hidrómetros graduados en grados brix (°Bx) y también simplemente Brix.

La determinación del Brix en las mieles finales se verifica sobre una muestra diluida a la cuarta, este es, 1:3 en agua; el resultado se multiplica por 4, corrigiendo antes por temperatura.

### § de Sacarosa.

La sacarosa se determina mediante la polarización de una solución de un peso normal 26.0 gra. en 100 mls. o bien mediante la determinación de la pureza y por cálculo el § de sacarosa.

El empleo del polarímetro, aprovecha la relación que hay entre la concentración de sacarosa y su poder rotatorio del plano de la luz polarizada (dextrarotatorio)

Si se emplea el método de los factores de pureza, se determina primero el Bx., luego la pureza y multiplicando ambos se obtiene la sacarosa.

### § de Pureza.

Se pueden emplear dos métodos el de Horne y el de Rice.

Método de Horne.- De la cuarta dilución que se utilizó para el Bx, se toma una parte en una taza de peltre grande y se diluye lo suficiente para obtener una solución de 10 brix - aproximadamente. Una parte de esta solución se pone en otra probeta de cobre para determinarle el Bx y la temperatura y otra porción se coloca en un vaso de vidrio y se clarifica con subacetato de plomo seco y se filtra. La polarización se efectúa en cubo de 200 mm. Las tablas de Horne relacionan el Bx corregido a 20°C con la polarización obteniendo así el § de pureza.

Método de Rice.- Para cada Brix corregido de la solución que se polarizó da un factor por el cual hay que multiplicar la lectura polarimétrica obteniendo así el § de pureza.

### **% de Glucosa.**

El % de glucosa o reductores parciales se determina como sigue: se pesan 5 gra., aproximadamente de miel final, en una cápsula y se pasan a un matraz de tapón esmerilado, aforado de 100 mls. Se clarifica con subacetato de plomo antes de aforar con agua destilada. Se filtra. Con el filtrado en una bureta de 50 mls. se titula la solución de Fehling (5 mls. de solución A + 5 mls. de solución B) por duplicado y se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de glucosa} = \frac{100 f}{\text{mls.} \times P} \times 100$$

f.- Factor de Fehling (gra. de dextrosa necesario para reducir el cobre presente en el licor que se titula)

mls.- mls. de la solución gastada en la titulación.

P.- peso de la miel tomada en 100 mls. de solución.

## VI.- TRABAJOS REALIZADOS

La fermentación se llevó a cabo en una solución de melaza al 40% previamente tindalizada (calentando a 60°C durante 15 minutos y colocando después en la estufa a 37°C, repitiendo el calentamiento a las 24 y 48 horas).

Se empleó la cepa de *Clostridium acetobutylicum* B-527 que se sembró en medio de tioglicolato de sodio, cubriendo con una capa de petrolato, todo completamente estéril. Esta cepa se conservó durante todas las pruebas, resembrándola para evitar que envejeciera.

A partir de la cepa y el sustrato se llevaron a cabo las siguientes pruebas variando:

- a).- Temperatura.
- b).- Agitación.
- c).- Aireación.
- d).- pH
- e).- Concentración del sustrato con respecto del inóculo.
- f).- Factores que mejorarían el rendimiento.

a).- Temperatura.

A tres matraces erlenmeyer se les añadió 100 ml. de melaza al 5%, 1 c.c. de inóculo y se les pasó una corriente de CO<sub>2</sub> hasta desalojar el aire contenido en ellos. Se colocó cada uno a diferente temperatura: 19°C, 37°C y 65°C. Después de 48 horas se separó una parte para la determinación de la acetona y

otra para el butanol.

b).- Agitación:

En dos matraces erlenmeyer se pusieron 100 c.c. de melaza al 5%, 1 c.c. de inóculo y se les pasó una corriente de  $\text{CO}_2$ . Los matraces se metieron a la estufa 12 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Se agitaron 12 horas a intervalos de 20 minutos y se volvieron a meter a la estufa hasta completar 48 horas. Se tomó una parte para determinar la acetona y otra para el butanol.

c).- Aireación.

Se pusieron dos matraces con 100 c.c. de melaza al 5% y 1 c.c. de inóculo. A uno de los matraces se le pasó una corriente de  $\text{CO}_2$  hasta desalojar todo el aire contenido en él y se colocó en la estufa durante 48 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Al segundo matraz se le pasó una corriente de  $\text{CO}_2$  12 horas, después una corriente de aire y se metió a la estufa 48 horas. De cada matraz se tomó una parte para la determinación de la acetona y otra para el butanol.

d).- pH.

En primer lugar se hicieron pruebas para determinar que cantidad de sosa y ácido sulfúrico eran necesarios para tener un pH de 9 y un pH de 5 respectivamente. Las pruebas se hicieron en melaza al 5%

A tres matraces erlenmeyer se les añadió:

- 1.- 100 c.c. de melaza al 5%, 1 c.c. de inóculo y --  
11.5 c.c. de NaOH .1N
- 2.- 100 c.c. de melaza al 5%, 1 c.c. de inóculo y --  
16.3 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> .1N.
- 3.- 100 c.c. de melaza al 5% y 1 c.c. de inóculo.

A los tres matraces se les pasó una corriente de CO<sub>2</sub> y los metieron en la estufa 48 horas a 37°C. Después de este tiempo se separó una parte para la determinación de la acetona y otra para la del butanol.

e).- Concentración del sustrato con respecto del inóculo.

De la solución de melaza tinalizada (solución al 40% se hicieron las siguientes diluciones, colocándolas en matraces de 250 c.c.:

Melaza	Agua estéril	% de solución
100.0 c.c.	- c.c.	40%
87.5	12.5	35%
75.0	25.0	30%
62.5	37.5	25%
50.0	50.0	20%
37.5	62.5	15%
25.0	75.0	10%
12.5	87.5	5%
2.5	97.5	1%



A cada matras se le añadió 1 c.c. de inóculo y se pasó una corriente de  $\text{CO}_2$  durante varios minutos hasta desalojar el aire contenido en ellos. Se metieron a la estufa durante 48 horas a  $37^\circ\text{C}$ . De cada matras se tomó una parte para la determinación de la acetona y otra para el butanol.

f).- Factores que mejorarían el rendimiento.

Se prepararon soluciones al 1% de: cloruro de sodio - cloruro de potasio, carbonato de magnesio y cloruro de calcio.

Se pusieron 4 matraces con:

- 1.- 100 c.c. de melaza al 5%, 1 c.c. de inóculo y 2 c.c. de cloruro de sodio.
- 2.- 100 c.c. de melaza al 5%, 1 c.c. de inóculo y 2 c.c. de solución de cloruro de potasio.
- 3.- 100 c.c. de melaza al 5%, 1 c.c. de inóculo y 2 c.c. de carbonato de magnesio.
- 4.- 100 c.c. de melaza al 5%, 1 c.c. de inóculo y 2 c.c. de cloruro de calcio.

A todos los matraces se les pasó una corriente de  $\text{CO}_2$  durante varios minutos y se metieron a la estufa por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$ . De cada matras se tomó una parte para determinar la acetona y otra para el butanol.

#### DETERMINACION DE LA ACETONA.

La determinación de la acetona se llevó a cabo por el método de Messinger, fundado en la absorción del yodo por la acetona (formación de yodoformo), valorando el exceso de yodo -

con hiposulfito.

#### Reactivos.

a).- Una solución de hidróxido de sodio que contenga 80 gr. de sosa cáustica purísima, exenta de nitritos por litro (tratando 10 c.c. de esta solución con 0.1 a 0.2 gr. de yoduro de potasio y acidificando con HCl no debe ponerse yodo en libertad).

b).- Una solución de ácido sulfúrico al 10% aproximadamente, preparada pesando 100 gr de ácido sulfúrico puro y concentrado y añadiendo agua hasta formar un litro; 10 c.c. de esta solución deben no solo neutralizar sino acidificar 10 c.c. - de la solución precedente.

c).- Una solución aproximadamente 1/5 N de yodo, obtenida disolviendo 25.5 gr. de yodo en una solución de 50 gr. de yoduro de potasio en 200 c.c. de agua y completando el volumen a un litro.

d).- Una solución aproximadamente 0.1N de tiosulfato sódico preparada disolviendo 25 gr. de tiosulfato puro en agua y completando el volumen de 1 litro.

e).- Una solución reciente de engrudo de almidón como indicador.

#### Valoración de la solución de tiosulfato:

Se prepara una solución acuosa de 3.863 gr. exactos - de dicromato de potasio purísimo por litro. Se toman 20 c.c. de esta solución, se agregan 10 c.c. de solución acuosa de yoduro

de potasio al 10% y 5 c.c. de ácido clorhídrico de densidad - igual a 1.10, se agita, se agregan de 100-150 c.c. de agua y se valora el yodo liberado mediante la solución de tiosulfato. Hacia el fin de la valoración se agrega un poco de engrudo de almidón y se deja de añadir tiosulfato cuando una gota de este hace pasar el líquido del azul verdoso al verde claro.

Puesto que 20 c.c. de la solución de dicromato ponen en libertad 0.2 gr. de yodo del yoduro de potasio; el número de c.c. de tiosulfato empleados corresponden a 0.2 gr de yodo y de aquí se puede deducir a cuanto yodo corresponde 1 c.c. de tiosulfato.

**Valoración de la solución de yodo:**

Con una bureta se miden 10 c.c. de solución de yodo y se deja caer con una bureta una solución valorada de tiosulfato hasta adquirir un color amarillo claro. Se agrega engrudo de almidón hasta decoloración.

Num. de c.c. de tiosulfato empleados por valor con respecto al yodo igual a cantidad de yodo contenida en los 10 c.c. de solución, entre 10, cantidad de yodo en cada c.c.

**Modo de operar:**

Tomense 25 c.c. del alcohol en examen, dejense ocurrir en un matras tarado de 1 litro, que contenga unos 500 c.c. de agua y se completa el volumen. Agitese y tomense 10 c.c. de la solución (correspondientes a 0.25 c.c. del alcohol metílico) que se dejan caer en un frasco de tapón esmerilado de 500 c.c.

de potasio al 10% y 5 c.c. de ácido clorhídrico de densidad - igual a 1.10, se agita, se agregan de 100-150 c.c. de agua y se valora el yodo liberado mediante la solución de tiosulfato. Hacia el fin de la valoración se agrega un poco de engrudo de almidón y se deja de añadir tiosulfato cuando una gota de este hace pasar el líquido del azul verdoso al verde claro.

Fuente que 20 c.c. de la solución de dicromato ponen en libertad 0.2 gr. de yodo del yoduro de potasio; el número de c.c. de tiosulfato empleados corresponden a 0.2 gr de yodo y de aquí se puede deducir a cuanto yodo corresponde 1 c.c. de tiosulfato.

#### Valoración de la solución de yodo:

Con una bureta se miden 10 c.c. de solución de yodo y se deja caer con una bureta una solución valorada de tiosulfato hasta adquirir un color amarillo claro. Se agrega engrudo de almidón hasta decoloración.

Num. de c.c. de tiosulfato empleados por valor con respecto al yodo igual a cantidad de yodo contenida en los 10 c.c. de solución, entre 10, cantidad de yodo en cada c.c.

#### Modo de operar:

Tomense 25 c.c. del alcohol en examen, dejense escurrir en un matras tarado de 1 litro, que contenga unos 500 c.c. de agua y se completa el volumen. Agitese y tomense 10 c.c. de la solución (correspondientes a 0.25 c.c. del alcohol metílico) que se dejan caer en un frasco de tapón esmerilado de 500 c.c.

en el que se habrán introducido anteriormente 20 c.c. de la solución aproximadamente doble normal de sosa cáustica (solución a) y agitando se agregan mediante una bureta 50 c.c. de la solución c, agitando poco a poco de modo que no se inviertan menos de 3 minutos. Abandonese por una hora el frasco cerrado, agitando de vez en cuando; después se agregan 21 a 22 c.c. de la solución b y se valora con la solución de tiosulfato el yodo no combinado.

#### DETERMINACION DEL BUTANOL.

Este método se basa en oxidar el alcohol al ácido correspondiente mediante una solución de permanganato de potasio, y valorar el ácido con una solución de sosa de normalidad conocida.

En esta determinación se empleó una solución de sosa 1 N, una solución de permanganato de potasio al 5% y una solución de ácido sulfúrico 0.1 N.

#### Modo de operar:

Se tomaron 50 c.c. de la solución fermentada, se añadieron 25 c.c. de ácido sulfúrico 0.1N y 2 c.c. de solución de permanganato de potasio al 5%. Se calentó a ebullición y se dejó enfriar. Se valoró, empleando el potenciómetro, con sosa 1N.

## ANÁLISIS DE LA MELAZA.

A la melaza se le practicaron los siguientes análisis:

‰ de glucosa, Brix, ‰ de sacarosa y ‰ de pureza.

‰ de glucosa:

La glucosa se determinó por el método de Eynon-Lane - que emplea el licor de Fehling. Este método se basa en la acción de la glucosa sobre las disoluciones alcalinas de sales cúpricas. El azúcar se oxida y la sal cúprica se transforma en cuprosa precipitando el álcali en forma de óxido cuproso.

Licor de Fehling:

Se compone de dos soluciones que se conservan separadas porque si se juntan se descomponen con el tiempo.

Solución A.- sulfato de cobre cristalizado 34.639 gr, agua hasta completar el volumen de 500 c.c. (debe pesarse en balanza de precisión).

Solución B.- se pesan 173 gr. de sal de Seignette ( - tartrato sódico potásico); sosa 52 gr y agua hasta completar - 500 c.c. Esta solución como todas las que tienen álcali fijos se conservan en frascos tapados con corcho, pues los tapones de vidrio se pegan con el tiempo. Esta solución se prepara disolviendo separadamente la sal de Seignette y la sosa en agua; - cuando están hechas las dos soluciones se mezclan vaciando la - sosa sobre la sal de Seignette y se completa el volumen a 500 - c.c.

### Valoración de la solución de Fehling:

La solución de Fehling se valora partiendo de una solución de glucosa pura anhidra que contenga exactamente 0.5 gr. de glucosa pesada en balanza de precisión y diluida en 100 c.c. de agua.

Se coloca en un vaso de precipitados 10 c.c. de licor de Fehling (5 c.c. de la solución A más 5 c.c. de la solución B), se añaden 40 c.c. de agua, se calienta hasta ebullición y se deja caer poco a poco la disolución de glucosa contenida en una bureta sobre el líquido de Fehling, que no debe dejarse de enfriar. Este se enturbia, se observa un precipitado rojo y el color azul del líquido va desapareciendo poco a poco. La adición de la solución azucarada debe continuarse hasta el preciso momento en que todo el cobre ha sido reducido al estado de óxido cuproso y que después que el precipitado se deja reposar algún tiempo, el líquido no tiene coloración azul.

### Modo de operar:

Se prepara una solución del material por analizar, en este caso fueron 10 gr. de muestra en un matraz de 250 c.c. y aforados con agua.

En un matraz erlenmeyer de 300 c.c. se miden 10 c.c. de solución mixta de Fehling, se le agregan 40 c.c. de agua y se hace hervir, enseguida se va añadiendo la solución problema mediante una bureta y sin que deje de hervir, se mantiene la punta goticante de la bureta en la boca del matraz, de tal manera que los vapores protejan a las gotas con la solución que cae

tiene los reductores del aire, oxidante, agregando de 3 a 5 gotas de azul de metileno (al 1% en agua) como indicador. La solución de Fehling adquiere un color azul intenso. Se continúa agregando la solución problema de la bureta gota a gota. El fin de la reacción es fácil de advertir pues la solución cambia a rojo ladrillo en el matraz. Se anotan los c.c. gastados en la bureta.

**Brix:**

Para determinar el porcentaje de sólidos en solución se emplean hidrómetros graduados en grados brix.

La determinación del Bx. se efectuó haciendo una cuarta dilución (1 : 3 en agua). Se tomó la temperatura de la dilución para hacer la corrección del Bx y el resultado se multiplicó por 4.

**% de sacarosa:**

La sacarosa se determinó mediante polarización. Se pesaron 26 gr. de melaza y se pusieron en un matraz de 100 c.c. Para clarificar la solución se le añadió subacetato de plomo que produjo un precipitado, se aforó con agua y se filtró. El filtrado, completamente cristalino, se empleó para hacer la polarización.

El porcentaje de pureza se determinó mediante tablas tomando en cuenta el Bx y el % de sacarosa.



## VII.- RESULTADOS

Cálculos y resultados en la determinación de la acetona:

Titulación de la solución de tiosulfato:

Puesto que 20 c.c. de la solución de dicromato ponen en libertad 0.2 gr. de I del KI; el número de c.c. de tiosulfato corresponden a 0.2 gr. de I y de aquí se deduce a cuanto I - corresponde 1 c.c.

16 c.c. de tiosulfato empleados en la valoración

$$0.2 \quad - \quad 16$$

$$\underline{x \quad - \quad 1}$$

$$\underline{0.2 \quad x \quad 1} = 0.0125 \text{ gr. de I en cada c.c. de tiosulfato.}$$

Titulación de la solución de I:

Número de c.c. de tiosulfato empleados por valor con respecto al I es igual a la cantidad de I contenida en 10 c.c. de solución.

16.2 c.c. de tiosulfato empleados en la valoración

$$0.01 \quad - \quad 1$$

$$\underline{x \quad - \quad 16.2}$$

$$\underline{0.01 \quad x \quad 16.2} = 0.162 \text{ gr. de I en cada 10 c.c. de solución de I}$$

$$0.162 \div 10 = 0.0162 \text{ gr. de I en un c.c. de solución de I.}$$

Como se añadieron a la muestra problema 50 c.c. de solución de I habrá:

$$0.0182 \times 50 = 0.910 \text{ gr. de I (I añadido)}$$

Titulación de la muestra:

Se emplearon 90 c.c. de tiosulfato.

$$0.01 \quad - \quad 1$$

$$\underline{\quad \times \quad - \quad 90.9}$$

$$\underline{0.01 \quad \times \quad 90.9} = 0.909 \text{ gr. de I en la muestra titulada (I titulado)}$$

Gr. de I añadidos - gr. de I titulados = gr. de I que se combinaron

$$0.910 = \text{gr. de I añadido}$$

$$0.909 = \text{gr. de I titulados}$$

Por lo tanto:

$$0.910 - 0.909 = 0.001 \text{ gr. de I combinados}$$

Para el cálculo de la acetona el número de gr. de I combinados o absorbidos en la titulación se multiplica por 58.05 (P.M. de la acetona).

$$0.001 \times 58.05 = 0.05805 \text{ gr.}$$

El producto se divide por 761.52 (6 átomos de I)

$$0.05805 \div 761.52 = 0.00007 \text{ gr.}$$

Debido a la dilución se refiere a 100 multiplicando por 400 (0.25 c.c. en 1 litro).

$$0.00007 \times 400 = 0.028 \text{ gr. de acetona en 100 c.c.}$$

de solución.

Si se quieren obtener los c.c. de acetona se divide - el resultado anterior por 0.7966 (densidad de la acetona anhidra).

$$0.028 \div 0.7966 = 0.03 \text{ c.c. de acetona en } 100 \text{ c.c. de solución.}$$

Puesto que la solución estaba al 1% de melaza, el % de acetona obtenido será:

$$\begin{array}{r} 1 \text{ gr. melaza} - 0.028 \\ \hline 100 - x \end{array}$$
  
$$\frac{100}{x} = \frac{0.028}{1} = 2.8 \text{ gr. de acetona en } 100 \text{ gr. de melaza o sean } 2.8\%$$

Cálculos en la determinación del butanol:

Se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{c.c. de NaOH gastados} \times \text{M. e. del butanol}}{\text{cantidad de melaza empleada}} = \frac{\text{gr. de butanol en 100 gr de melaza}}$$

Se hizo una prueba testigo para restar los c.c. de NaOH gastados en los ácidos que pudieran haberse formado durante la fermentación, de los c.c. gastados en la titulación final.

Se empleó cosa 1H.

1.4 c.c. de NaOH empleados en la titulación de 50 c.c. de solución problema.

1.3 c.c. de NaOH empleados en la titulación de la prueba testigo.

0.088 gr. de butanol/c.c. de solución

2.5 gr. de melaza en 50 c.c. de solución

Por lo tanto el resultado será:

$$\frac{0.1 \times 0.088}{2.5} \times 100 = 0.35\%$$

**Cálculos de los análisis de la melaza:**

**Glucosa:**

**Titulación del licor de Fehling:**

10 c.c. de licor fueron reducidos por 11.5 c.c. de -  
glucosa.

10 c.c. de glucosa = 0.05 gr. de glucosa

10 - 0.05

11.5 - x

$\frac{11.5 \times 0.05}{10} = 0.0575$  factor de Fehling

Peso de la muestra de melaza 4 gr. en 100 c.c. de  
agua. Se gastaron 16 c.c. de esta solución para reducir 10 c.c.  
del licor de Fehling.

$$\% \text{ de glucosa} = \frac{100 f}{\text{ml} \times P} \times 100$$

f.- factor de Fehling

ml.- c.c. gastados

P.- peso de la muestra tomada en 100 ml.

$$\% \text{ de glucosa} = \frac{100 \times 0.0575}{4 \times 16} \times 100 = 8.9\%$$

## % DE ACETONA Y BUTANOL OBTENIDOS

Variando la concentración de la melaza, a 37°C, corriente de CO<sub>2</sub>, sin agitación y pH 7.5

% de melaza	Bx	% de acetona	% de butanol
1%	0.96	2.8	0
5%	4.8	5.6	7
10%	9.6	2.4	7.7
15%	14.5	5.3	5.9
20%	19.3	2.8	3.9
25%	24.2	3.2	3.3
30%	29.0	2.7	3.8
35%	33.9	2.5	3.3
40%	38.7	2.2	3.9

Variando la temperatura a 37°C, 4.7°Bx, corriente de CO<sub>2</sub>, pH 7.5, sin agitación.

Temperatura	% de acetona	% de butanol
19°C	4.0	0.17
37°C	5.6	7.0
65°C	3.6	0.35

Aireación, a 37°C, 4.7°Bx, sin agitación, pH 7.5

	% de acetona	% de butanol
Corriente de CO <sub>2</sub>	5.6	7.0
Corriente de CO <sub>2</sub> y corriente de aire	1.6	2.7

Con agitación, a 37°C, 4.7°Bx, corriente de CO<sub>2</sub> - pH 7.5.

	% de acetona	% de butanol
Sin agitar	5.6	7.0
Con agitación	35.0	2.7

Variando el pH, a 37°C, 4.8°Bx, corriente de CO<sub>2</sub>, - sin agitación.

pH	% de acetona	% de butanol
9	24.0	0
5	20.0	8.3
7.5	5.6	7.0

Añadiendo diversas sustancias, a 37°C, 4.8°Bx, corriente de CO<sub>2</sub>, sin agitación.

Substancias al 1%	% de acetona	% de butanol
NaCl	8.0	0.35
KCl	24.0	0.59
Mg '3	16.0	4.32
Ca' 2	8.0	2.8
Sin añadir nada	5.6	7.0

ANALISIS DE LA MELAZA :

Reductores totales	33.9 %
Polarización	25
Brix	96.96
% de pureza	23.5%

Glucosa.- Reductores parciales .

Glucosa + azucar invertido.- Reductores totales.



### VIII.- CONCLUSIONES

Por los datos obtenidos se saca en conclusión que el rendimiento de acetona mejora al añadir al sustrato algunas - sustancias tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, - carbonato de magnesio y cloruro de calcio; efectuando la fermentación a 37°C, pH ácido, agitando y atmósfera excenta de aire - (corriente de CO<sub>2</sub>). La concentración de la melaza no varía mucho, aunque en este caso dió mejores resultados una concentración al 5%.

En lo que respecta al butanol se obtuvo un mejor rendimiento efectuando la fermentación a 37°C, a un pH ácido y sin añadir ninguna sustancia. En cuanto a concentración de la melaza dieron mejores resultados las soluciones al 5% y al 10%.

Por lo tanto las mejores condiciones deducidas de los datos experimentales serán: Bx 7.8, temperatura de 37°C, - corriente de CO<sub>2</sub> y pH ácido, cercano a 5.

Una de las condiciones a la que pueden atribuirse los bajos rendimientos en la fermentación probablemente se deba al haber utilizado una melaza envejecida, como sustrato.

### VIII.- CONCLUSIONES

Por los datos experimentales obtenidos se observa la falta de paralelismo en el rendimiento respectivo de acetona y butanol, pues, mientras el máximo rendimiento de acetona se obtiene a unas determinadas condiciones, el correspondiente máximo para el butanol se obtiene a condiciones de reacción diferentes en algunos factores como se puede ver en el cuadro siguiente:

Factores	Máximo rendimiento de acetona	Máximo rendimiento de butanol
Ex	7.8	7.8
Temperatura	37°C	37°C
Aireación	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
Agitación	si	--
pH	9	5
Aditivos	KCl	--

Por tanto, las condiciones de cultivo y reacción deberán variarse según sea el producto que se desee obtener, aunque por supuesto, siempre habrá una obtención del otro producto que dado que es en menor escala se considerará como subproducto.

Una de las condiciones a la que pueden atribuirse los bajos rendimientos en la fermentación probablemente se deba el haber utilizado una melaza envejecida, como substrato.

Por último, ya que según se puede observar, los mejores rendimientos fueron: 24% para la acetona y 8.3% para el butanol y tomándose en cuenta que el proceso está llevado a cabo partiendo de mieles incristalizables de ingenio, que se derivan hacia procesos poco remunerativos (alimentos para ganado, carga para insecticidas agrícolas), se puede considerar que la utilización de dichas mieles en el proceso tema de esta tesis, podría ser económicamente ventajoso para muchos ingenios y permitiría el ahorro de divisas que se reflejaría en la Economía de la Nación ya que en la actualidad un gran porcentaje de la acetona y butanol utilizados principalmente como solventes industriales es importado.

## IX.- BIBLIOGRAFIA

- Breed S. Robert, Murray E.G.D., Smith R.N. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Company. 1957.
- Giral-Rojahn. Productos Químicos y Farmacéuticos. -- Atlante. 1946.
- Prescott y Dunn. Industrial Microbiology. McGraw-Hill Book Company Inc. 1959.
- Rainbow-Rose. Biochemistry of Industrial Microorganisms. Academic. Press. 1963.
- Rose, A y E. Diccionario de Química y de Productos Químicos. Omega. 1959.
- Volásquez Fuentes Ignacio. Control Químico en la Fabricación de Azúcar. Estaya S. C. 1964.
- Villavecchia V. Química Analítica Aplicada. Gustavo Gili S.A. 1949.