

OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN ABE A PARTIR DE *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* USANDO DESECHO AGRÍCOLA DE PIÑA (*ANANAS SATIVUS*) COMO SUSTRATO

Serrano Muñoz Daniel Isai (1), Márquez Lucio María Azucena (2), Armas Garfias Claudia (3), Alejo Iturvide Francisco (4)

1 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [serrano.21@outlook.com]

2 [Ingeniería Bioquímica, Irapuato, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [mamarquez@itesi.edu.mx]

3 [Ingeniería Bioquímica, Irapuato, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [clarmas@itesi.edu.mx]

4 [Ingeniería Bioquímica, Irapuato, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [fralejo@itesi.edu.mx]

Resumen

Actualmente la producción microbiológica de butanol a partir de materias primas renovables se ha vuelto una oportunidad al emplear microorganismos del género *Clostridium sp.* Estas bacterias generalmente son: gram positivas, estrictamente anaerobias, su crecimiento se favorece a pH ligeramente ácido y a una temperatura de 37°C. Ellas pueden utilizar una gran variedad de sustratos como monosacáridos, principalmente glucosa y polisacáridos que son metabolizados y convertidos en solventes, tales como: acetona, butanol y etanol (ABE). El objetivo del presente proyecto es obtener los productos de la fermentación ABE a partir de residuos agrícolas de piña (*Ananas sativus*) por medio del *Clostridium acetobutylicum* considerando los aspectos críticos, debido a que actualmente estos procesos con los sustratos empleados son mas costosos y por ende, se están buscando alternativas mejores económicamente y con buenos rendimientos; para ello, se aisló presuntivamente el microorganismo *C. acetobutylicum*, verificado a partir de pruebas microscópicas, morfológicas y en respuesta a estrés; posteriormente se obtuvieron los metabolitos primarios de la fermentación ABE empleando el sustrato elegido, presentando mejores características tanto sustentables como para el aprovechamiento del microorganismo; finalmente fueron purificados a partir de una destilación simple e identificados a partir de diversas pruebas químicas así como organolépticas.

Abstract

Currently the microbiological production of butanol from renewable raw materials has become an opportunity to employ microorganisms of the genus *Clostridium sp.* These bacteria are generally: gram positive, strictly anaerobic, their growth favors slightly acidic pH and a temperature of 37 °C. They can use a variety of substrates such as monosaccharides, mainly glucose and polysaccharides that are metabolized and converted into solvents such as acetone, butanol and ethanol (ABE). The objective of the present project is to obtain the products of the ABE fermentation from agricultural residues of pineapple (*Ananas sativus*) by means of the *Clostridium acetobutylicum* considering the critical aspects, because at the moment these processes with the substrates used are more expensive and therefore, better alternatives are being sought economically and with good yields; for this, the microorganism *C. acetobutylicum*, verified from microscopic, morphological and in response to stress tests, was presumably isolated; subsequently, the primary metabolites of the ABE fermentation were obtained using the chosen substrate, presenting better characteristics both sustainable and the use of the microorganism; were finally purified from a simple distillation and identified from various chemical as well as organoleptic tests.

Palabras Clave

Combustible; Producción; Fermentación; Contaminación.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el consumo de energía se ha incrementado en el último siglo, ocasionado principalmente por el crecimiento de la población y por la industrialización de muchas ciudades. Aunado a esto, la crisis ecológica inminente de forma relevante y global ya observable en el calentamiento del planeta, debida sobre todo al alto consumo de petróleo como energético principal, ya que obliga al replanteamiento urgente de estructuras alternativas tanto industriales como económicas viables para sustituir, o por lo menos disminuir, el uso de éste combustible fósil y sus derivados.

En la producción microbiológica de butanol a partir de materias primas renovables se ha visto una oportunidad al emplear microorganismos del género *Clostridium* sp. Ellas pueden utilizar una gran variedad de sustratos como monosacáridos, principalmente glucosa y polisacáridos que son metabolizados y convertidos en solventes, tales como: acetona, butanol y etanol. [1] (Obando, et al. 2011)

Aunque la alternativa de microorganismos para la producción de combustibles ha existido desde hace un siglo, resurge en este tiempo con mucho mayor vigor y como una promesa factible para el futuro de dichos productos.

Biocombustible

Un bio-carburante o bio-combustible es una mezcla de sustancias orgánicas que se utiliza como combustible en los motores de combustión interna. Deriva de la biomasa, materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía [2](Formanek, et al, 1997; Medina, 2013)

Para muchos autores, lo correcto para referirse a este tipo de combustibles es hablar de agrocombustibles, el prefijo "bio" se utiliza en toda la UE para referirse a los productos agrícolas en

cuya producción no intervienen productos de síntesis. [3](Rajchenberg, et al, 2009)

Al utilizar estos materiales se reduce considerablemente el dióxido de carbono que es enviado a la atmósfera terrestre ya que estos materiales lo van absorbiendo a medida que se van desarrollando, mientras que emiten una cantidad similar que los carburantes convencionales en el momento de la combustión. [4](Curr, 2012) [5](Atsumi, et al, 2008)

- **Butanol**

El butanol (alcohol butílico o 1-butanol) es un alcohol primario constituido por 4 carbonos cuya fórmula es $C_4H_{10}O$; es un líquido incoloro, flamable, con un olor característico, su vapor irrita las membranas mucosas produciendo un efecto narcótico a altas concentraciones. [6](Grisales, 2012).

La producción biológica del butanol ocurre naturalmente en algunas especies de microorganismos, como las bacterias *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium butyricum* o la arquea *Hyperthermus butylicus*. Sin embargo, el género más estudiado es el de *Clostridium* ya que son capaces de convertir diversas fuentes de carbono, como la glucosa, galactosa, celobiosa, manosa, xilosa y arabinosa, en combustibles y químicos como el butanol, acetona y etanol [7](Ezeji, et al., 2007).

En el caso de *Clostridium* su metabolismo se detiene cuando la presencia de solventes alcanza una concentración de 20g/L, lo cual limita la concentración de fuentes de carbono que pueden ser utilizados en la fermentación, ocasionando una baja productividad y baja concentración de productos. [8](Rajchenberg, et al, 2009)

Concentraciones de alrededor de 0.1 M de butanol generan un 50% de inhibición del crecimiento celular y consumo de azúcares. [9](Fuciños y Pallares, 2011)

- *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium acetobutylicum, es una bacteria comercialmente valiosa a veces llamada "Weizmann Organism", después de que el judío ruso Chaim Weizmann. Un profesor de la Universidad de Manchester, Inglaterra, los utilizó en 1916 como una herramienta bioquímica para producir al mismo tiempo, acetona y etanol, junto con el butanol del almidón. El método se ha descrito desde entonces como el proceso ABE, (proceso de fermentación de acetona butanol etanol), produciendo 3 partes de acetona, 6 de butanol y 1 de etanol. [10](Medina, 2013; Rojas y Gonzales, 2011)

A diferencia de la levadura, que puede digerir el azúcar sólo en alcohol y dióxido de carbono, *C. acetobutylicum* y otros clostridios pueden digerir el suero, azúcar, almidón, celulosa y tal vez ciertos tipos de lignina, produciendo butanol, ácido propiónico, éter y glicerina. [11](Curr, 2012) [12](Atsumi, *et al*, 2008; Heap, *et al*, 2015)

- **Ananas sativus (piña)**

La piña o ananá (*Ananas sativus*) es una planta de la familia de las bromeliáceas. Es una hierba perenne, de escaso porte y hojas duras y lanceoladas de hasta 1m de largo, que fructifica una vez cada tres años produciendo un único fruto fragante y dulce, muy apreciado en gastronomía.

La piña tropical proviene de Sudamérica, concretamente de Brasil. Se conocen tres variedades botánicas de piña tropical: *Sativus* (sin semillas), *Comosus* (forma semillas capaces de germinar) y *Lucidus* (permite una recolección más fácil porque sus hojas no poseen espinas. [13](García, 2013) [14](Conesa, *et al*, 2015)

Justificación

De la fermentación ABE, se puede obtener bio-butanol, además de acetona y etanol que pueden ser usados en especial el butanol, como biocombustible de segunda generación con el potencial de ser usado como aditivo de la gasolina

al tener una alta densidad energética, un octanaje bajo y con bajos niveles de impurezas, además de que la acetona así como el etanol, al ser metabolitos primarios de este proceso se les puede implementar para obtener un mayor beneficio económico.

El *Clostridium acetobutylicum* tiene un amplio abanico de sustratos; sin embargo, no todos los consume de igual manera, esta ventaja se puede aprovechar usando como sustrato los amplios azúcares contenidos en la cascara y bagazo de piña; debido a que, este es un desecho que va en aumento, debido a los grandes usos que tiene la fruta desde mermeladas hasta bebidas, en donde ni la cubierta e interior de esta son desechados, por no tener ninguna utilidad "aparente" en la industria ni labores locales, pero mediante una extracción adecuada puede servir de alimento ideal para el *Clostridium acetobutylicum* el cual nos metabolizara los productos de la fermentación ABE; [15](García, Reynoso, 2005) otro beneficio es que estos productos pueden ser usados como biocombustible de segunda generación este no compite con los requerimientos alimentarios de la población como los biocombustibles de primera generación hacen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo el muestreo del agua residual de la PTAR institucional del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato de acuerdo a la PROY-NMX-AA-003-1-SCFI-2008 para aislar e identificar el microorganismo de interés; continuando con la preparación del medio de cultivo *C. acetobutylicum* (denominado así por convención).

Se efectuaron diversas tinciones (Gram y Schaeffer-Fulton) para identificación estructural y de resistencia del microorganismo para posteriormente parar a la incubación de la cepa en una Jarra Gaspek para preservar y asegurar las condiciones estrictas de anaerobiosis y atmosféricas con una temperatura de 30°C.

Seguidamente se llevaron a cabo la realización de las cinéticas de crecimiento a escala laboratorio y

nivel biorreactor empleando un un espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm en un medio de sustrato de jugo de piña y en un biodigestor anaerobio Armfield W8 como se muestra en las IMÁGENES 1 y 2.

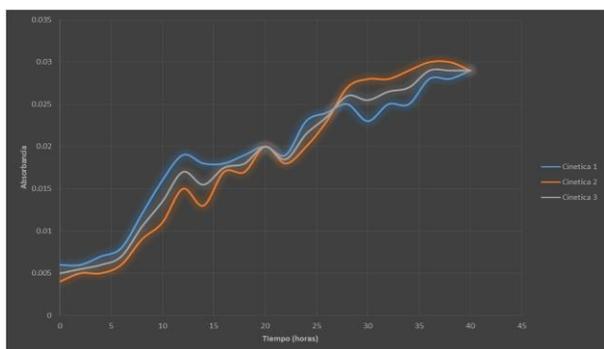


IMAGEN 1: Gráfica de la cinética a pH 7 mostrando las 3 réplicas realizadas, graficando tiempo en horas contra absorbancia.

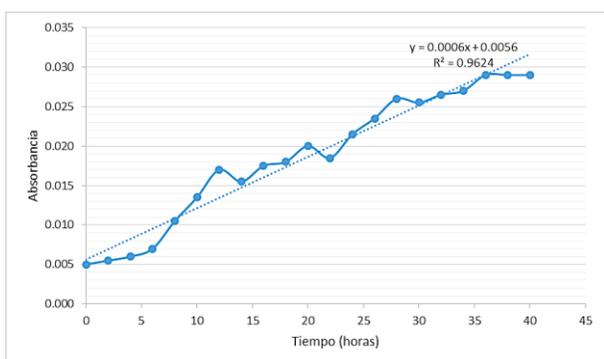


IMAGEN 2: Gráfica de las medias de la absorbancia de las cinéticas realizadas a pH de 7 graficando tiempo en horas contra absorbancia.

Finalmente se obtuvo el metabolito y purificó mediante una esterificación de alcoholes para posteriormente identificarlos mediante pruebas químicas colorimétricas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtenida la cepa DCPEM-045 (presuntivamente *Clostridium acetobutylicum*), se procedió a conocer su crecimiento durante el tiempo; es decir, determinar su cinética de crecimiento, por lo que se de acuerdo a lo comparado en la literatura

coincidiendo que para *Clostridium acetobutylicum* es más recomendado reportar su crecimiento durante el tiempo, mediante el uso de un espectrofotómetro, midiendo la absorbancia, a una longitud de onda de 600nm en la mayoría de los artículos consultados y en otros a 490nm; sin embargo, la diferencia radica en que para un sustrato puro, como sería una disolución de glucosa, se usa la longitud de onda menor, que para cuando es un sustrato complejo, es decir con más de una azúcar consumible por el *C. acetobutylicum*; el sustrato anteriormente mencionado; por lo que se optó emplear una infusión o un té a base de cáscara y bagazo de piña, esto debido a que esos componentes son el desperdicio de la mayoría de las frutas, lo cual implica cierto grado de contaminación ya que aunque es desecho degradable, la cantidad es alarmante, tanto que no se da tiempo a que se reintegre a la tierra además que de acuerdo a lo consultado, la piña posee en su cáscara y bagazo contiene: glucosa, fructosa, sacarosa, hemicelulosa, y xilosa, de las cuales todas y cada una son consumibles por el *C. acetobutylicum*.

Una vez realizadas las consideraciones a las cinéticas de crecimiento se consideró una variable más a considerar, el pH, debido a que el *C. acetobutylicum* al iniciar con un pH neutro durante el transcurso del tiempo, termina con un pH ácido, el cual es el óptimo para iniciar la fermentación ABE. Por lo que a este proceso se denomina acidogénesis; considerando lo anterior, se consideraron 4 pH, los cuales fueron: 7, 6, 4 [1] concentración sencilla de sustrato y 4 [2] concentración doble de sustrato, realizado primeramente en tubos de ensayo de 15 ml con rosca usando el medio en forma de caldo logrando la anaerobiosis mediante una capa de vaselina, teniendo en cuenta que en los últimos 2 pH's se usarían 10ml de medio con 2ml de sustrato y 8ml de medio con 4ml de sustrato.

Las cinéticas, debido a que el tiempo de estadía reportado en la mayoría de la literatura es de mínimo 6 días indicando la producción de

metabolito al 3 día; por lo que, se optó por monitorearlo durante cuatro días.

Se observó una mayor concentración de biomasa cuando el pH era de 7, esto gracias a que a un pH neutro se le da tiempo de aumentar su número de células para después acidificar y posteriormente fermentar; por lo que, si se siembra a un pH menor el número de células producidas disminuirá ya que se les obliga más rápido la producción metabolito.



IMAGEN 4: Metabolitos obtenidos mediante pruebas de Yodoformo y 2,4-dinitrofenilhidrazina.



IMAGEN 3: Purificación de los metabolitos mediante esterificación de alcoholes.

Una vez obtenido todo el metabolito (IMAGEN 3) posible se procedió a la purificación mediante una

esterificación para separación de la mezcla líquida para evitar la formación del azeótropo entre el ácido acético, butanol, ácido butírico y agua. Dicha esterificación con ácido acético nos permitió destilar la mayoría de los compuestos; sin embargo, hubo pérdida en forma de gas de cierto volumen de los productos debido al escape de gases del equipo de destilación. Finalmente se identificaron los productos obtenidos mediante la prueba del yodoformo y 2,4-dinitrofenilhidrazina para la acetona, en donde en el primer caso se formó un polvo amarillo llamada yodoformo, oxidando la acetona, y en el segundo caso, ocurrió una reacción similar a diferencia de que ahí precipitara la hidracina; para el ácido acético se probó con una prueba de colorimetría de pH; sin embargo, no se logró, ya que esto se atribuye a que la concentración en líquido de este ácido carboxílico fue insuficiente para una coloración, sin embargo por su característico olor se puede saber su existencia; finalmente para los alcoholes que ahora son acetatos, solo se pueden encontrar la típica prueba cualitativa organoléptica, mediante la detección de un dulce olor (IMAGEN 4).

CONCLUSIONES

Se logró aislar presuntivamente el microorganismo *C. acetobutylicum*, verificado a partir de pruebas microscópicas, morfológicas y en respuesta a estrés. Una vez obtenido el microorganismo, se empleó el sustrato con las mejores características, tanto sustentables como para el aprovechamiento del microorganismo en comparación con los reportados en la literatura.

Se obtuvieron los metabolitos primarios de la fermentación ABE, los cuales fueron purificados a partir de una destilación simple e identificados a partir de diversas pruebas químicas así como organolépticas; de la misma manera, se obtuvieron rendimientos menores a los reportados en la literatura; sin embargo, son los rendimientos esperados de acuerdo a las condiciones del proceso.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Alejo Iturvide Francisco

Flandes Avilés Mosiah Benjamín

Hortelano Carrera Ana María Paloma

León García Carlos Antonio

M.C. Armas Garfias Claudia

M.C. Márquez Lucio María Azucena

Sánchez Salazar Luis Enrique

REFERENCIAS

- [1] Obando J, Cardona C. (2011). Análisis de la producción de biobutanol en la fermentación acetobutilica con *Clostridium saccharoperbutyl acetonicum* N1-4 ATCC 13564. Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia. 2011; 58:36 – 45.
- [2] [11] Formanek J, Mackie R, Blaschek HP. (1997). Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2306-2310.
- [3] [8] Etienne Rajchenberg Ceceña, José Alberto Rodríguez-Ruiz, Katy Juárez López, Alfredo Martínez Jiménez*, Sandra Morales Arrieta* . (2009). Producción Microbiológica de Butanol. 3/02/17, de Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Sitio web: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Butanol.pdf.
- [4] [11] Curr O. (2012). Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. Biotechnol. (2012) 18: 220-227.
- [5] [12] Atsumi S, Cann AF, Connor MR, Shen CR, Smith KM, Brynildsen MP, Chou KJY, Hanai T & Liao JC .(2008). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for 1- butanol production. Metabol. Eng. 10: 305–311.
- [6] Grisales Díaz V. H.. (2012). Separación de butanol por pervaporación a partir de soluciones acuosas diluidas. 3/02/17, de Universidad Nacional de Colombia Sitio web: <http://www.bdigital.unal.edu.co/51939/1/1053764433.2012.pdf>.
- [7] Ezeji TC, Qureshi N & Blaschek HP. (2014). Acetone Butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: Reduction in substrate inhibition by fedbatch technique and product inhibition by gas stripping. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63: 653-658.
- [9] Fuciños V, Pallares A. (2011). Selección de un modelo matemático y diseño de un sistema de control para la fermentación ABE a partir de glucosa empleando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Trabajo de Grado. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Colombia. 53 p.
- [10] Rojas C, Gonzales N. (2011). Diseño conceptual de un fermentador para la producción de n- butanol a partir de glucosa empleando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Trabajo de Grado. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Colombia. 63 p.
- [12] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP & Minton NP. (2015). The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. J. Microbiol. Methods. 70: 452-464.
- [13] [15] Daniela García. (2013). Más de 13 millones de toneladas de desecho de piña se podrían aprovechar en producción de energía. 07/04/17, de crhoy.com Sitio web: <http://www.crhoy.com/archivo/mas-de-13-millones-de-toneladas-de-desecho-de-pina-se-podrian-aprovechar-en-produccion-de-energia/ambiente/>.
- [14] Claudia Conesa, Lucía Seguí, Pedro Fito. (2015). SACARIFICACIÓN DE RESIDUOS INDUSTRIALES DE PIÑA CON MEZCLAS DE ENZIMAS COMERCIALES. 07/04/17, de 1 Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo Sitio web: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/28121/TESIS%20DE%20MASTER%20CLAUDIA.pdf?sequence=1>.