



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERIA

**“Producción de butanol por *Clostridium
acetobutylicum* en cultivo semicontinuo”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. LAURA JENITZIA NORIEGA MEDRANO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de la Tesis:

María del Carmen Montes Horcasitas

Ciudad de México

JUNIO, 2017

El siguiente trabajo fue realizado en el laboratorio 20 de Biocatálisis del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, con asesoría del Dr. Jaime Ortega, Dr. Roberto Ruiz Medrano, del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, la Dra. Lorena Amaya Delgado de CIATEJ, Guadalajara y el Dr. Eliseo Cristiani Urbina de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), por la beca otorgada para la realizar mis estudios de doctorado.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, por aceptarme en su grupo de trabajo, por su dirección durante el desarrollo de mi trabajo de tesis y especialmente por el apoyo personal brindado en los momentos difíciles.

Al Auxiliar de Investigación IBQ Jesús Vega estrada, por compartir sus conocimientos, experiencia y por el apoyo técnico brindado en la realización de éste proyecto.

A la Técnico del laboratorio Carmen Fontaine, por su apoyo técnico brindado.

A los doctores Jaime Ortega, Roberto Ruiz Medrano, Eliseo Cristiani y Lorena Amaya por sus comentarios, recomendaciones y correcciones a lo largo del proyecto y en especial por su paciencia y apoyo.

Al laboratorio 18, Central Analítica, a la M. en C. Elvira Ríos Leal y al auxiliar de investigación I.Q. Gustavo Gerardo Medina Mendoza por el apoyo técnico brindado con las determinaciones por Cromatografía de gases.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por darme su cariño y apoyo incondicional siempre.

A mi hermano por apoyarme en cada momento.

Al bicho por ayudarme y estar siempre presente aun cuando está ausente.

A Fer por ser excelente amigo y compañero en el posgrado.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Jesús, Carmelita, Fabiola, Fernando y Christian, por su amistad y ayuda.

A Luis por todo su apoyo académico y personal.

A los estudiantes Gabriel y Fernando, por ayudarme con el trabajo.

A todas las personas que me apoyaron a lo largo del doctorado y sobre todo que me tuvieron paciencia.

INDICE

1. RESUMEN	9
2. SUMMARY.....	10
3. INTRODUCCIÓN.....	11
GENERALIDADES.....	11
Butanol	12
Usos del butanol	13
A) Producción de butanol por vía química.....	15
B) Producción por fermentación	16
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	17
Factores que afectan la producción ABE	21
Fuentes de Carbono para la producción de butanol.....	24
Causas de la baja producción de solventes en la fermentación ABE	25
Métodos de recuperación de butanol.....	27
Métodos para cuantificar butanol	28
Avances utilizando estrategias de biología molecular.....	29
4. JUSTIFICACIÓN	31
5. HIPÓTESIS	32
6. OBJETIVO GENERAL.....	32
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
11. CONCLUSIONES	71
12. PERSPECTIVAS	72
13. BIBLIOGRAFÍA	73
14. ANEXOS	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis química de butanol. a) Síntesis Oxo, b) Proceso Reppe, c) Hidrogenación del crotonaldehído.(Lee et al., 2008).....	15
Figura 2. Ruta metabólica de <i>Clostridium acetobutylicum</i> 824 con glucosa.....	18
Figura 3. Cinética de producción de butanol por <i>Clostridium acetobutylicum</i> 824 en cultivo por lote sin control de pH y utilizando glucosa como sustrato.	40
Figura 4. Cinética por <i>Clostridium acetobutylicum</i> 824 en cultivo por lote, utilizando glucosa como sustrato, iniciando el control de pH cuando éste alcanzó un valor de 4.5.	41
Figura 5. 1) Cinética de <i>Clostridium acetobutylicum</i> 824 en cultivo por lote, utilizando glucosa como sustrato, con control de pH inicial por 5h y después se deja libre (estrategia 3). 2) Cinética de los metabolitos producidos con la estrategia 3.	43
Figura 6. Curvas de Diferentes solventes por el método de microdifusión, utilizando las condiciones para determinar etanol (60 min a 45°C).	49
Figura 7. Cinética de una solución estándar de butanol 5 g/L a diferentes temperaturas y diferentes tiempos.	50
Figura 8. Curva de calibración de butanol por el método de microdifusión modificado.	51
Figura 9. Curva de tipo de alcoholes con los estándares completos por el método de microdifusión modificado (45°C por 90 min).....	52
Figura 10. Ejemplo de intervalos de confianza para la muestra No. 8 con MAM y GCM para obtener el error de correlación	56
Figura 11. Comparación de los métodos de microdifusión adaptado (MAM) y Método de	56
Figura 12. Cinética de cuantificación de diferentes metabolitos por Cromatografía de gases de muestras de la fermentación ABE, por <i>Clostridium acetobutylicum</i> 824 en cultivo por lote.	57
Figura 13. Cinética de producción de alcoholes por <i>C. acetobutylicum</i> en cultivo semicontinuo, cosechando el 50% del volumen de caldo de cultivo.	59
Figura 14. Cinética de producción de alcoholes por <i>C. acetobutylicum</i> en cultivo semicontinuo, cosechando el 75% del volumen de caldo de cultivo.	61
Figura 15. Cinética de producción de alcoholes por <i>C. acetobutylicum</i> en cultivo semicontinuo, cosechando el 88% del volumen de caldo de cultivo	63
Figura 16. Cinética de ácidos y solventes determinados por CG, producidos por <i>C. acetobutylicum</i> en cultivo semicontinuo, cosechando el 88% del volumen de caldo de cultivo.....	63

Figura 17. Productividades de los subcultivos para los diferentes volúmenes de cosecha evaluados en cultivo semicontinuo para la producción de butanol por <i>Clostridium acetobutylicum</i>	65
Figura 18. Producción de alcoholes totales en los subcultivos para los diferentes volúmenes de cosecha evaluados en cultivo semicontinuo tipo Draw- fill utilizando <i>C. acetobutylicum</i>	66
Figura 19. Comparación de los rendimientos promedios entre los subcultivos para los diferentes volúmenes de cosecha.	67
Figura 20. Curva tipo de glucosa con una solución patrón de 5 mM.....	77
Figura 21. Cinética de inóculo con 20 mL de medio Gu modificado	78
Figura 22. Curva tipo de solventes producidos en la fermentación ABE, determinados por Cromatografía de gases.....	79
Figura 23. Ejemplo de Curva tipo de ácidos orgánicos que se producen en la fermentación ABE determinados por Cromatografía de gases	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del butanol(Lee, et al., 2008).....	12
Tabla 2. Comparación de propiedades como carburantes (Lee, et al., 2008).....	13
Tabla 3. Estructura molecular y principal aplicación de los isómeros del butanol (Jin, et al., 2011).....	14
Tabla 4. Diferentes tipos de cultivo, microorganismos y sustratos utilizados para la producción de butanol.....	23
Tabla 5. Diferentes sustratos utilizados para la producción de butanol.....	24
Tabla 6. Investigaciones de modificaciones genéticas en <i>Clostridium acetobutylicum</i>	29
Tabla 7. Datos experimentales de un estándar de 5 g/L butanol y 0.833 g/L etanol para la comparación de MAM con GCM.....	54
Tabla 9. Errores de Correlación calculados para las mediciones hechas con MAM y GCM.....	55

Tabla 10. Valores de cada subcultivo cosechando el 50% de volumen de caldo de cultivo.....	60
Tabla 11. Valores en cada subcultivo cuando se cosecha el 75% del volumen de caldo de cultivo.....	62
Tabla 12. Valores en cada subcultivo cuando se cosecha el 88% del volumen de caldo de cultivo.....	64
Tabla 13. Tabla comparativa de producción de butanol, productividad de butanol, tipo de cultivo y microorganismos utilizados.....	69

1. RESUMEN

El butanol es considerado como un biocombustible en potencia para ser utilizado como suplemento en la gasolina y por sus diversos usos en la industria. *Clostridium acetobutylicum* es la bacteria más utilizada en la biosíntesis de butanol, a pesar de que actualmente los rendimientos y su producción es muy baja quedan muchos retos por superar. Uno de los parámetros esenciales para su producción es el control de pH. Existen diversos trabajos publicados en la literatura, los cuales muestran la controversia que existe acerca de las condiciones ácidas para el inicio de la solventogénesis por lo que en este trabajo se evaluaron diferentes estrategias para el control de pH en cultivo por lote utilizando *Clostridium acetobutylicum* 824 para incrementar la producción de butanol, también se evaluó el cultivo semicontinuo, tipo Draw-fill para aumentar su productividad volumétrica

Para llevar a cabo los experimentos se utilizó un medio de cultivo reportado por Gu en 2009, con glucosa como sustrato, se realizaron determinaciones de los metabolitos más importantes en la fermentación ABE (acetona, butanol, etanol, ácido acético y ácido butírico) por cromatografía de gases (CG).

El trabajo se dividió en tres etapas: 1) estrategias de control de pH, 2) Adaptación y validación de un método para determinar alcoholes y 3) Evaluación de diferentes volúmenes de cosecha en cultivo semicontinuo. De las diferentes estrategias evaluadas en la etapa 1, con la que se obtuvo una producción mayor de butanol fue al no controlar el pH inicial, sino hasta llegar a 4.5, obteniendo de 8-9.5 g/L de butanol. En la etapa 2, el método adaptado de microdifusión (MAM) para la determinación de alcoholes totales y la determinación semicuantitativa de butanol tiene buena precisión, además es una alternativa rápida y económica, comparando con un método de cromatografía de gases. La estrategia 2 de control de pH, se estableció como condición para los cultivos semicontinuos evaluando diferentes porcentajes de cosecha (50, 75 y 88%) del caldo de cultivo, para sustituirlo con medio fresco al cosechar el 88% de cultivo se obtuvieron las productividades más altas (0.266 -0.423 g/L) en los subcultivos.

2. SUMMARY

Butanol is considered a potential biofuel regarded as a gasoline additive, and its uses in the industry are varied. *Clostridium acetobutylicum* is the most used bacteria in butanol biosynthesis, despite the low yield and production there are a lot of challenges to overcome. pH is an essential parameter in butanol production. A lot has been published, in which controversy arises when acidic conditions to start solventogenesis have to be established. Thus, in this work different pH control strategies in a batch culture using *Clostridium acetobutylicum* 824 to increase butanol production. Then, the selected strategy was evaluated in a semicontinuous culture (Draw-fill) to increase volumetric productivity.

Experiments were carried out using a culture medium reported by Gu in 2009, with glucose as substrate. Determination of the most important metabolites in an ABE fermentation (acetone, butanol, acetic acid and butiric acid) were done in gas chromatography (GC). The work was divided in three stages: 1) pH control strategies, 2) adaptation and validation of a method to determine alcohols, and 3) evaluation of different harvest volumes in a semicontinuous culture. From the strategies evaluated in stage 1, the highest butanol production (8-9.5 g/L) was obtained when at the beginning of the fermentation the pH was not control and when it reached a pH value of 4.5 pH control was implemented. In stage 2, the microdiffusion adapted method (MAM) to determine alcohols, therefore a semiquantitative determination of butanol can be done, has a good precision, being also a fast and economic alternative compared to GC. In stage 3, the selected pH control strategy was established as a culture condition in a semicontinuous culture to evaluate different harvest percentages (50, 75 and 88%) from the culture broth to be replaced with fresh medium. Harvesting 88% the highest productivity (0.266 -0.423 g/Lh) was achieved in the subcultures.

3. INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

El 80% de la energía para transportación que se obtiene a nivel mundial proviene de los combustibles fósiles, que son fuentes no renovables, por lo que a largo plazo la dependencia de ellos traerá consigo una potencial “crisis energética” a nivel mundial. Dentro de las alternativas para enfrentar esta crisis se ha pensado en la optimización de los procesos para la obtención de biocombustibles, como el biodiesel, bioetanol y biobutanol, llamados así porque pueden obtenerse por la fermentación de azúcares por microorganismos, utilizando sustratos provenientes de materiales lignocelulósicos. Países como Estados Unidos, Brasil y China han enfocado e intensificado sus esfuerzos para su producción. Uno de los procesos más antiguos de fermentación a escala industrial es la producción de acetona, butanol y etanol (ABE) a partir de esquilmos agrícolas, almidón o azúcares, estos procesos de fermentación aún no son competitivos con respecto a los procesos petroquímicos. Sin embargo en un futuro cercano será posible su implementación debido a que hoy en día, el butanol representa una mejor alternativa, por ejemplo, para su uso en máquinas de combustión interna (Jin, et al., 2011), debido a su mayor contenido energético, menor presión de vapor, lo cual lo hace menos volátil, es menos higroscópico lo que facilita su transporte, es menos corrosivo, menos soluble en agua, comparado con el bioetanol, siendo su principal desventaja su baja producción. Los rendimientos de la producción de butanol por medio de la fermentación ABE (acetona, butanol, etanol) son entre 10 y 30 veces menores que la producción de etanol por fermentación con levaduras, lo cual explica su preferencia (Jin, et al., 2011). En las últimas décadas se ha incrementado el interés sobre la producción de butanol por vía fermentativa (ABE) lo cual se ve reflejado en la bibliografía. La investigación sobre este tema se ha enfocado principalmente en tres aspectos: 1) Desarrollo de nuevas cepas, 2) Desarrollo de nuevas tecnologías de fermentación y 3) Búsqueda de materias primas alternativas.

Butanol

El butanol (IUPAC 1-butanol) es un alcohol primario de 4 átomos de carbonos, con 5 isómeros cuya fórmula molecular es C_4H_9OH ; es un líquido incoloro e inflamable, en contacto directo con la piel y los ojos puede causar irritación y en altas concentraciones tiene efecto narcótico. Algunas de sus propiedades físicas y químicas se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del butanol(Lee, et al., 2008).

General	
Otros nombres	1-Butanol; Butanol
Fórmula semidesarrollada	$H-(CH_2)_4OH$
Fórmula molecular	$C_4H_{10}O$
Identificadores	
Número CAS	71-36-3
Número RTECS	EO1400000
PubChem	263
Propiedades físicas	
Estado de agregación	Líquido
Densidad	809.8 kg/m^3 ; 0.8098 g/cm^3
Masa molar	74.121 g/mol
Punto de fusión	183.7 K ($-89 \text{ }^\circ\text{C}$)
Punto de ebullición	390.88 K ($118 \text{ }^\circ\text{C}$)
Propiedades químicas	
Solubilidad en agua	79 g/L ($20 \text{ }^\circ\text{C}$).
Viscosidad, dinámica	$2.9 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$)
Peligrosidad	
Punto de inflamabilidad	303 K ($30 \text{ }^\circ\text{C}$)
Temperatura de autoignición	413 K ($140 \text{ }^\circ\text{C}$)

Usos del butanol

El butanol es un compuesto químico importante a nivel industrial, casi la mitad de la producción mundial es convertida en ésteres de acrilato y metacrilato, butilglicol, butilacetato, butilamina, entre otros. El butilmetacrilato es utilizado en resinas, cremas dentales y aceites. El butilglicol se usa como solvente para limpiar recubrimientos y superficies sólidas. El butilacetato es usado en pinturas, así como en saborizantes sintéticos de frutas en helados, quesos y dulces. La butilamina se usa para la producción de pesticidas, medicinas y emulsificantes; también es precursor del N-butilbencenesulfonamida, un plastificante del nylon muy usado en la industria.


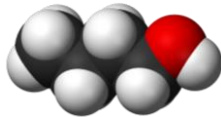
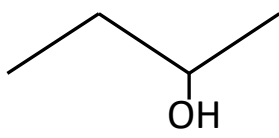

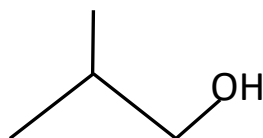

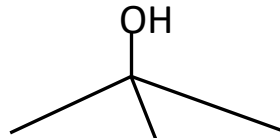

Otro isómero del butanol que tiene aplicaciones como disolvente, es el sec-butanol, es un producto químico intermedio y se utiliza en la preparación de líquidos hidráulicos de frenos, limpiadores industriales, abrillantadores, agentes de flotación para minerales, esencias de frutas, perfumes y colorantes (Dürre, 2008). En la tabla 3 se presentan los demás isómeros del butanol de importancia industrial, así como algunas de sus aplicaciones.

Otros usos del butanol dentro de la industria son como disolvente de pinturas, lacas, barnices, resinas naturales y sintéticas, gomas, aceites vegetales, tintes y alcaloides, como sustancia intermedia en la fabricación de productos químicos y farmacéuticos, y en las industrias de cuero artificial, textiles, gafas de seguridad, pastas de caucho, barnices de laca, impermeables, películas fotográficas y perfumes. En la tabla 2, podemos ver una comparación entre las propiedades carburantes entre la gasolina, butanol y etanol.

Tabla 2. Comparación de propiedades como carburantes (Lee, et al., 2008)

Propiedad	Butanol	Gasolina	Etanol
Densidad de energía (MJ/L)	29.2	32	19.6
Proporción aire-combustible	11.2	14.6	9
Calor de vaporización (MJ/kg)	0.43	0.36	0.92
Número de octano experimental	96	91-96	129

Tabla 3. Estructura molecular y principal aplicación de los isómeros del butanol (Jin, et al., 2011).

Isómeros del Butanol	Estructura Molecular	Esquema	Principal aplicación
1-Butanol			<ul style="list-style-type: none"> - Disolventes - Plastificantes - Productos químicos intermedios - Aditivo de la gasolina
2-Butanol			<ul style="list-style-type: none"> - Solvente - Productos químicos intermedios - Limpiadores industriales - Perfumes, sabores artificiales
Iso-butanol			<ul style="list-style-type: none"> - Disolvente y el aditivo para pintura - aditivo para gasolina - Limpiadores industriales - Ingrediente de tinta
Tert-butanol			<ul style="list-style-type: none"> - Solvente - Desnaturalizante para el etanol - Limpiadores industriales - Aditivo para gasolina y compuestos oxigenados - Intermedio de MTBE, ETBE, TBHP, etc.

Algunas ventajas del butanol en comparación con el etanol, y sus propiedades como carburante, las podemos observar en la tabla 3 (Lee, et al., 2008):

- Mayor contenido energético.
- Menos volátil. La volatilidad en los alcoholes disminuye a medida que aumenta su número de carbonos en su cadena. Esto representa menos problemas de cavitación y de bloqueo de vapor.
- Menos problemas de ignición.
- Intersolubilidad. El butanol puede ser mezclado con gasolina o con diésel, funcionando como aditivo y sin tener que hacer modificaciones importantes a los motores de combustión interna actuales.
- Viscosidad alta. La viscosidad en los alcoholes aumenta con el número de carbonos en su cadena.

B) Producción por fermentación

En cuanto a este proceso, el primer reporte que existe en la literatura sobre su producción, fue descrito por Louis Pasteur en 1862. El proceso de fermentación, se denominó ABE y fue desarrollado por primera vez en el Reino Unido en 1912, su comercialización se expandió rápidamente por el mundo en la primera y segunda guerra mundial. En el proceso ABE, el butanol fue considerado como un producto de desecho, el principal producto era la acetona para producir municiones, posteriormente el butanol fue utilizado para la producción de pinturas de laca.

En 1915 con la patente de Chaim Weizmann, se describió una idea clara sobre el proceso de fermentación butílica; después de 35 años, en 1950, el 66% del butanol utilizado en el mundo provenía de procesos fermentativos (Jones and Woods, 1986), pero el proceso decayó posteriormente ya que en Estados Unidos y Europa el costo de los combustibles sintéticos derivados del petróleo era mucho menor.

La producción biológica de butanol se lleva a cabo por microorganismos como: *Butyribacterium methylotrophicum*, *Hyperthermus butylicus* y bacterias sacarolíticas. El género más utilizado es *Clostridium*, como *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* y *C. saccharoperbutylacetonicum*, y de éstas la cepa más estudiada es *C. acetobutylicum*. Las bacterias de éste género pueden utilizar diversos sustratos, como la glucosa, galactosa, celobiosa, manosa, xilosa, arabinosa, etc., para llevar a cabo la fermentación ABE.

Clostridium acetobutylicum

Clostridium acetobutylicum es una bacteria Gram positiva, en forma de bacilo, mesófila, formadora de endoesporas, anaerobia estricta, quimiorganotrófica, capaz de utilizar una gran variedad de sustratos como monosacáridos (pentosas y hexosas) y polisacáridos (Jones and Woods, 1986). La secuencia completa del genoma de la cepa de *Clostridium acetobutylicum* 824 fue liberado en el 2001 por el grupo de Nöling y col.(2001). Cabe mencionar que este microorganismo libera al medio de cultivo enzimas como α y β amilasas, α y β -glucosidasas, pululanases, amilopululanases, entre otras.

El proceso de fermentación ABE se caracteriza por presentar dos fases: acidogénica y solventogénica, las cuales pueden llevarse a cabo entre 2 y 6 días en cultivo por lote, dependiendo de las condiciones y el tipo de sustrato utilizado. Generalmente se obtiene: butanol, acetona y etanol en una proporción 6:3:1 (Lee, et al., 2008).

Durante la fase acidogénica, se forman ácidos como acético y butírico, presentándose producción de hidrógeno y dióxido de carbono, normalmente ocurre durante el crecimiento exponencial. La fase solventogénica se presenta en la etapa estacionaria del cultivo, durante esta fase, los ácidos son reasimilados y utilizados para la producción de butanol, acetona y etanol, el pH del medio se hace constante y aumenta la producción de CO₂ con respecto a la de H₂, así como la producción total de otros gases, debido a la formación de acetona, y la decarboxilación del acetoacetato proveniente del acetoacetyl-CoA. Otra fracción de la acetoacetyl-CoA se convierte butiril-CoA a fin de compensar el bloqueo en la reoxidación de NADH que se produce, al transformarse parte del acetoacetyl-CoA, en acetona. Por su parte, el butiril-CoA, se reduce a butiraldehído por medio de la enzima aldehído deshidrogenasa, que es la misma enzima que reduce el acetyl-CoA a acetaldehído. Posteriormente, la alcohol-deshidrogenasa dependiente de NADH + H⁺, convierte al butiraldehído en butanol. El butirato del medio puede incorporarse transformándose en butiril-CoA y finalmente en butanol, lo cual implica un aumento en el pH del medio.

En la figura 2, se muestra la ruta metabólica de *Clostridium acetobutylicum* 824 así como una breve descripción de las enzimas involucradas.

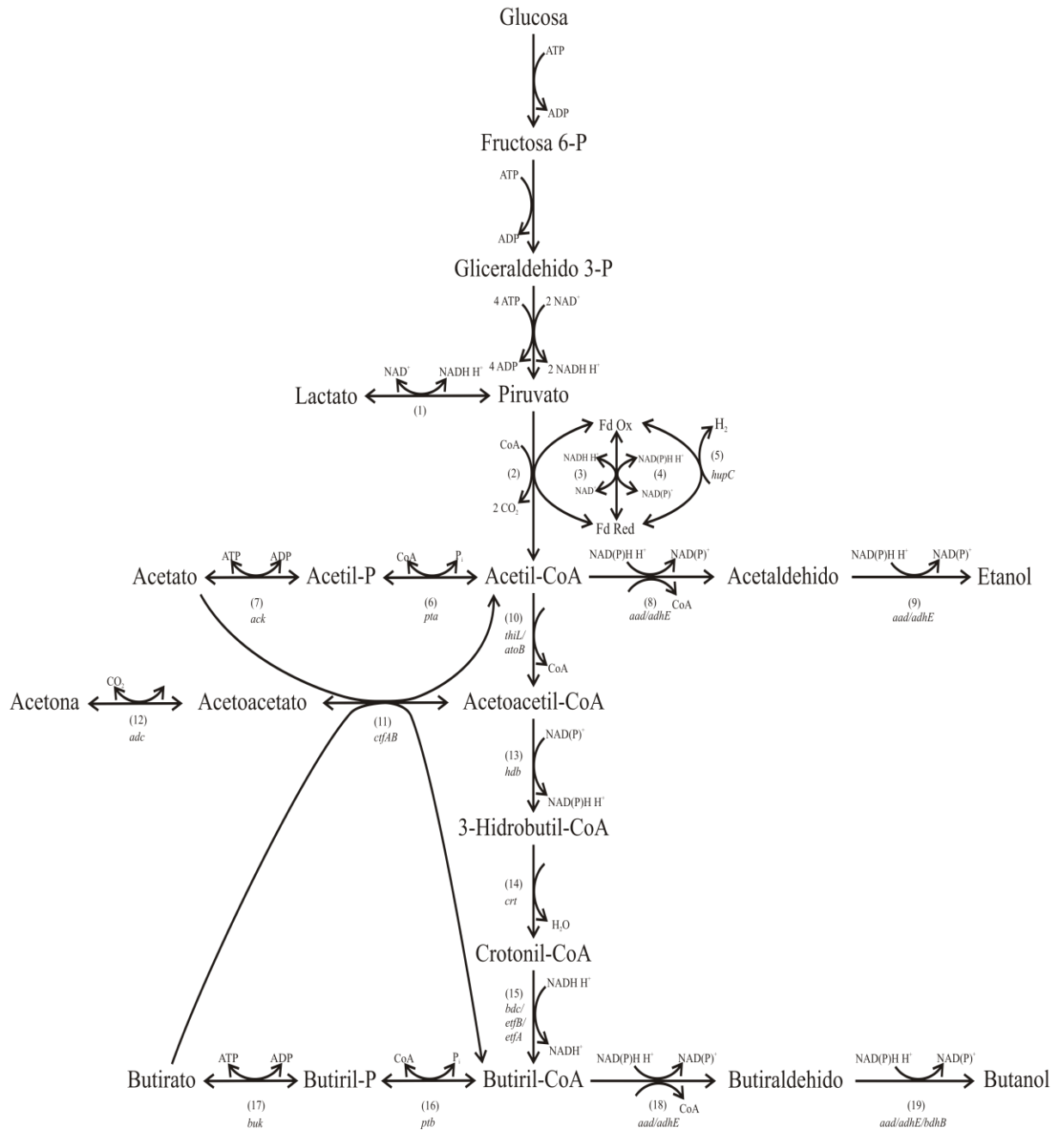


Figura 2. Ruta metabólica de *Clostridium acetobutylicum* 824 con glucosa.

A continuación, se enlistan las enzimas involucradas en la ruta metabólica de *Clostridium acetobutylicum* y su función:

- (1) Lactato deshidrogenasa (LDH): cataliza la reacción de piruvato a ácido láctico.
- (2) Piruvato-ferrodoxinoxido reductasa(PFOR): el piruvato producto de la glucólisis se rompe por la PFOR en presencia de CoA, produciendo CO_2 y acetyl CoA. Se obtiene un mol por cada mol de acetyl CoA y de CO_2 .
- (3) NADH-ferredoxinaoxidoreductasa y
- (4) NADPH-ferredoxinaoxidoreductasa: son enzimas clave para la transferencia de electrones dentro de la ruta metabólica.
- (5) Hidrogenasa: la formación o consumo de hidrogeno es catalizada por esta enzima.
- (6) Fosfato-acetiltransferasa (PTA): durante el metabolismo acidogénico ésta enzima convierte el acetyl-CoA a acetyl fosfato (acetyl-P), el cual, a su vez es convertido a acetato por la acetato-cinasa.
- (7) Acetato cinasa (AK): fosforila ADP usando acetyl-P para formar ATP y acetato. Esta reacción es importante para la conservación de energía durante la etapa de producción de ácidos en la fermentación.
- (8) Acetaldehído deshidrogenasa (AYDH): cataliza la primera reacción específica hacia etanol (o butanol). Ésta enzima puede ser distinguida en base a sus requerimientos de Coenzima.
- (9) Etanol deshidrogenasa (EDH): cataliza la reducción de acetaldehído a etanol. Son clasificadas en 2 grupos, las del grupo 1 producen alcoholes primarios como etanol y butanol; las del grupo 2 producen alcoholes primarios y secundarios como el isopropanol.
- (10) Tiolasa: ésta enzima lleva a cabo una reacción de condensación termodinámicamente desfavorable de 2 moléculas de acetyl-CoA a una molécula de acetoacetyl-CoA, el cual es el precursor de los productos de 4 carbonos. La tiolasa compite con la fosfato-acetiltransferasa durante la acidogénesis y con la acetaldehído-dehidrogenasa durante la solventogénesis por el acetyl-CoA disponible.

- (11) Acetoacetil-CoA; acetato/butirato: CoA deshidrogenasa: cataliza la formación de acetoacetato:
- (12) Acetoacetatodecarboxilasa (AADC): el acetoacetato formado, vía CoA-transferasa, es decarboxilado por esta enzima para producir acetona y CO₂.
- (13) Beta-hidroxilbutiril-CoA deshidrogenasa (BHBD): la oxidoreductasa cataliza la reducción de acetoacetil-CoA por NAD(P)H. La reacción es un paso clave hacia la producción de butirato y butanol.
- (14) Enoyl-CoA hidratasa/crotonasa (ECH): cataliza la reacción de la BHBD a crotonil-CoA.
- (15) Butiril-CoA deshidrogenasa (BCD): cataliza la reacción de crotonil-CoA a butiril-CoA, la cual es un punto clave en la formación de butirato y butanol.
- (16) Fosfato butiltransferasa (fosfobutililasa) (PTB): cataliza la interconversión de butiril-CoA y butiril-P.
- (17) Butirato cinasa (BK): cataliza la reacción por la cual butiril-Pes convertido a butirato, con la fosforilación de ADP. Esta fosforilación es importante fuente de energía durante la etapa de formación de ácidos.
- (18) Butiraldehído deshidrogenasa (BYDH): cataliza la conversión de butiril-CoA a butiraldehído con formación de CoA.
- (19) Butanol deshidrogenasa (BDH): cataliza el paso final a la síntesis de butanol, la reducción de butiraldehído a butanol.

En una revisión realizada por R. Gheshlaghi (2009), se puede encontrar una descripción y algunas investigaciones sobre varias de éstas enzimas.

Factores que afectan la producción ABE

Dentro de los factores que afectan la producción de butanol están: las condiciones de cultivo, pH, tipo de cultivo, medio de cultivo, temperatura y agitación, entre otros.

- **pH**

El control de pH es un parámetro esencial en la producción de butanol por *Clostridium acetobutylicum*. Sin embargo, aún no está claro a que valores de pH se obtiene la mayor producción. Existen diversos trabajos publicados en la literatura, los cuales muestran la controversia que existe acerca de las condiciones ácidas para el inicio de la solventogénesis (Yang, et al., 2013).

C. acetobutylicum en cultivo por lote con células en crecimiento exponencial produce ácidos orgánicos que a su vez provocan el descenso del pH del medio. Cuando el cultivo entra en fase estacionaria, el metabolismo del microorganismo cambia, los ácidos orgánicos formados y carbohidratos son convertidos a solventes orgánicos y como consecuencia del consumo de ácidos el pH del medio incrementa. Eventualmente cuando la concentración de solventes alcanza un nivel inhibitorio, todo el metabolismo cesa (Bowles and Ellefson, 1985).

- **Temperatura y agitación**

La temperatura y la agitación son 2 parámetros muy importantes para el crecimiento de *Clostridium acetobutylicum*, así como para la producción de metabolitos. Las temperaturas que se utilizan para su crecimiento son de 35 a 37 °C, por ser una bacteria mesófila. En cuanto a la agitación, esta puede ocasionar daño celular, por lo que usualmente se utilizan velocidades entre 100 y 200 rpm.

- **Tipos de cultivo y medio de cultivo**

Para la producción de butanol se han utilizado diversos tipos de cultivos siendo los más utilizados el cultivo en lote, lote alimentado y continuo. A continuación, se presentan algunas ventajas sobre los diferentes tipos de cultivos:

- 1) *Cultivo en lote*: éste tipo de cultivo tiene la ventaja de ser de fácil manejo, pero puede presentarse inhibición por producto y por sustrato.
- 2) *Cultivo continuo*: se pueden obtener grandes beneficios una vez que el cultivo está estable, sin embargo, en la producción de butanol se ha reportado la degeneración de la cepa.
- 3) *Cultivo semicontinuo*: se ha utilizado éste tipo de cultivo para prevenir problemas de inhibición por sustrato.

Entre los cultivos semicontinuos, el tipo Draw-fill (también llamado lote repetido) presenta la ventaja de ser de fácil manejo, requiere una estructura mínima y se puede obtener mayor productividad. Otras ventajas que presenta este tipo de cultivos, es que el microorganismo puede irse adaptando a ciertas condiciones de cultivo como por ejemplo, soportar una mayor concentración de solventes, se puede evitar el lavado de biomasa y es flexible en cuanto al tiempo de cosecha (hasta obtener la máxima producción o mayor consumo del sustrato).

El *medio de cultivo* es importante para el crecimiento de cualquier microorganismo y para la producción de metabolitos. El tipo de sustrato, macronutrientes, micronutrientes y otros factores de crecimiento son indispensables en las fermentaciones de todos los microorganismos, sin embargo, se ha demostrado que el hierro es un componente esencial en la dieta de *Clostridium*, ya que se requiere de una gran producción de ferredoxina en la conversión de piruvato en acetyl-CoA. Otro componente importante es el fosfato, ya que en condiciones limitantes es posible prevenir la pérdida del plásmido pSOL1, el cual es necesario para la síntesis fermentativa de butanol en cepas silvestres (Lee, et al., 2008).

Otro factor importante es la disponibilidad de nitrógeno, la cual regula la producción de solventes, se ha reportado que la limitación de nitrógeno y fosfatos favorecen la formación de ácidos, pero no la producción de solventes (Lai and Traxlert, 1994). También se ha reportado que la producción de solventes es controlada por la demanda y la disponibilidad de ATP (Roos, et al., 1985).

En la Tabla 4, se muestra un resumen de los principales sustratos y microorganismos empleados en la producción de butanol.

Tabla 4. Diferentes tipos de cultivo, microorganismos y sustratos utilizados para la producción de butanol.

Microorganismo	Sustrato	Tipo de cultivo	Producción de butanol	Referencia
<i>C. acetobutylicum</i>	Glucosa	Continuo-pervaporación	2.34 g/Lh de ABE	Izák, et al, 2008
<i>C. beijerinckii</i>	Hidrolizado de paja de trigo	Lote	8.09 g/L	Qureshi, et al., 2008
<i>C. beijerinckii</i>	Glucosa	Lote- gas stripping	8 g/L	Ezeji, et al., 2005
<i>C. acetobutylicum</i>	Lactosuero	Lote-perextracción	5.56g/L	Qureshi & Maddox, 2005
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	Glucosa	Lote-alimentado	16 g/L	Tashiro, et al., 2004
<i>C. acetobutylicum</i>	Glucosa	Continuo con reciclaje de células	5.4 g/Lh de ABE	Afschar, et al., 1985
<i>C. acetobutylicum</i>	Hidrolizado de Maíz	Lote	8 g/L	Lin & Blaschek, 1983

Fuentes de Carbono para la producción de butanol

Dentro del mejoramiento del proceso para la producción de butanol, existe un interés en aumentar el rendimiento de conversión de azúcares a butanol, minimizando la formación de subproductos y optimizando las condiciones de fermentación para alcanzar mayores concentraciones del producto y al mismo tiempo reducir costos de pre-tratamientos de sustratos, proceso de fermentación y recuperación del producto. El costo del sustrato representa un factor de impacto económico importante, por lo que se han utilizado diferentes sustratos como: melazas, maíz, puré de manzana, suero lácteo, hidrolizados, bagazo, etc. (Ezeji, et al., 2007; Jones & Woods, 1986; Qureshi, et al., 2008). Sin embargo, muchos de estos sustratos pueden causar gran controversia debido a que son importantes para la alimentación humana y esto puede propiciar una crisis alimentaria, por esto el interés de buscar fuentes de carbono alternas que no tengan un impacto tan importante en la alimentación. En la tabla 5, se resumen los diferentes sustratos que se mencionan en la literatura para este fin.

Tabla 5. Diferentes sustratos utilizados para la producción de butanol.

Microorganismo	Sustrato	Tipo de cultivo	Cantidad de butanol	Referencia
<i>C. beijerinckii</i> NCBI 8052	Residuos de mazorca	Lote	8.2 g/L	Zhang, et al., (2012)
<i>C. beijerinckii</i> IB4	Hidrolizado de fibra de maíz	Lote	9.5 g/L	Du, et al., (2013)
<i>C. acetobutylicum</i> MTCC 481	Paja de arroz	Lote	6 g/L	Ranjan, et al., (2013)
<i>C. beijerinckii</i> 8052	Jugo de tallo de maíz	Lote	11.5 g/L	Wang & Blaschek, (2011)
<i>C. acetobutylicum</i> 4259	Jugo de tuna	Lote	8.1 g/L	Noriega, (datos no publicados)

Causas de la baja producción de solventes en la fermentación ABE

Dentro de las principales causas de baja producción de butanol en la fermentación ABE, se encuentra la toxicidad producida por los solventes, productos del metabolismo celular del microorganismo (Bowles and Ellefson, 1985), así como del mismo ciclo celular, específicamente, la esporulación (Long, et al., 1984). En la literatura se mencionó que el microorganismo inhibe su crecimiento con la presencia de un 2% de solventes (Jones and Woods, 1986), teniendo en cuenta que en la producción, la concentración usual de butanol es alrededor de 12 g/L. El butanol por ser solvente lipofílico, solubiliza y desorganiza los lípidos de la bicapa de la membrana celular, lo que produce alteraciones de las actividades enzimáticas ligadas a los fenómenos de transporte. Por otro lado, el microorganismo como mecanismo de defensa para protegerse de los efectos del butanol, es capaz de alterar la composición los ácidos grasos de los lípidos de membrana, haciéndose menos sensible a los solventes.

Específicamente se ha reportado que a concentraciones de butanol mayores a 150 mM existe una caída dramática del pH intracelular, ya que *C. acetobutylicum* carece de homeostasis a nivel de pH, por lo que depende íntimamente del pH extracelular y esto causa la inhibición en un 50% del crecimiento celular (Huang, et al., 1986; Lee, et al., 2008).

Se pueden encontrar otros tres fenómenos que provocan baja producción de solventes en las fermentaciones de *C. acetobutylicum*, de los cuales 2, están relacionados con el pH:

- *Acid crash*: Ocurre en fermentaciones en lote sin control de pH y en cultivos continuos con problemas de control de pH, en donde ocurre una rápida formación de ácidos y por consiguiente una caída de pH, inhibiendo la solventogénesis. Está reportado que la adición de ácido acético, en concentraciones de 3.7-9.7 g/L, incrementa la concentración de ABE, pero concentraciones de 11.7g/L afectan la producción de solventes, en cultivos de *Clostridium acetobutylicum*; el ácido fórmico a bajas concentraciones, provoca

inhibición total de la solventogénesis, Cho, et al., 2012, observaron que *Clostridium beijerinckii*, resulta ser más tolerante a estos ácidos.

- *Fermentaciones acetogénicas*: ocurren en cultivos en lote y en continuo con control de pH cercano a la neutralidad, en donde la posible causa es la regulación metabólica.
- *Degeneración*: se presenta en cultivo continuo, en lotes repetidos y en cultivos en medio sólido, así como en las resiembras. La cepa pierde la capacidad de producir solventes, siendo una causa posible la pérdida de material genético (megaplásmido pSOL1) de la cepa *C. acetobutylicum* 824. Se ha reportado que esta cepa contiene 4 genes que son vitales en la producción de solventes; *C. acetobutylicum* 4259 presenta también éste tipo de degeneración al perder el plásmido pWEIZ, así como la capacidad de formar esporas, esto supone la idea de que los genes involucrados en la esporulación, también se encuentran en los megaplásmidos de las cepas 4259 y 824. Otra posible causa es un cambio en la selección de la población del cultivo.

Métodos de recuperación de butanol

Las técnicas más utilizadas para la recuperación del butanol son: adsorción, extracción líquido-líquido, gas stripping, osmosis inversa y pervaporación; de las anteriores gas stripping tiene numerosas ventajas y es vista como una de las técnicas más económicas (Groot and Lans, 1989), a continuación se hace una breve descripción de cada una:

- *Gas stripping*: es una técnica simple de recuperación de butanol (acetona o etanol) que consiste en burbujear gases como el CO₂, H₂ o N₂ a través del caldo de fermentación, el gas arrastra a los compuestos volátiles, los cuales se recuperan en el condensador y, el gas se recircula al fermentador.
- *Extracción líquido-líquido*: consiste en mezclar un solvente de extracción con el caldo de fermentación, los solventes producidos por la fermentación ABE, son extraídos con el solvente de extracción y posteriormente recuperados por destilación. Los solventes de extracción que más se han utilizado son decanol y alcohol oleílico.
- *Pervaporación*: es un proceso de separación con membranas (no porosas) aplicado a mezclas líquidas de compuestos miscibles, en el que a partir de una corriente de alimentación se obtienen dos corrientes. La separación se consigue mediante la aplicación de vacío en el lado de la membrana donde se recoge el permeado en forma de vapor, mientras que, por el otro lado, circula el líquido de alimentación cuya separación se busca, después se condensa éste vapor generando como producto un líquido permeado. El proceso más eficiente para remover ABE es utilizando los líquidos iónicos, en particular el polidimetilsiloxano (IL-PDMS) en el que se obtiene una productividad de 2.4 g/L/h en cultivo continuo (Izák, et al., 2008). Cai, et al., (2013), utilizando ésta técnica obtuvo hasta 201.9 g/L de butanol utilizando hidrolizado de bagazo de sorgo.

Métodos para cuantificar butanol

Los métodos analíticos más utilizados para la cuantificación de butanol son los métodos cromatográficos: HPLC y CG. Dichos métodos son capaces de determinar de forma cualitativa y cuantitativa los productos de la fermentación ABE (Buday et al., 1990, Tsuey et al., 2006, Lin et al., 2014). Éstos métodos presentan como principales ventajas: ser específicos, muy sensibles y de alta resolución. Sin embargo, también tienen desventajas como: los cromatógrafos son equipos costosos, el tiempo de corrida por muestra puede ser grande cuando hay muchos compuestos en la muestra, la inyección debe ser exacta y por lo tanto se requiere de un automuestreador el cual representa un alto costo. Debido a esto resulta necesario y conveniente contar con un método alternativo que nos permita analizar el contenido de butanol en las muestras de fermentación ABE, ya sea de forma cualitativa y cuantitativa o semi-cuantitativa, para selección de muestras y para resultados rápidos que permitan agilizar la toma de decisiones en el trabajo experimental.

En el mercado existen diversos kits para la determinación de etanol, basados principalmente en reacciones enzimáticas y de detección espectrofotométrica (Ehrlich et al., 2012). También hay un método para la detección de etanol por medio de una reacción química, basado en el método de microdifusión (Conway and Malley, 1942). Este método ha sido utilizado para la determinación de diversos compuestos volátiles.

Para la determinación de butanol no hay un método rápido, simple y económico que arroje resultados confiables, por lo que desarrollar o adaptar uno para tal finalidad es una buena propuesta que puede ser práctica e interesante para éste trabajo.

Avances utilizando estrategias de biología molecular

En los últimos años se ha trabajado con algunas estrategias de biología molecular, así como de procesos para mejorar la producción de butanol. En la Tabla 6 se presentan algunos de los trabajos más recientes y novedosos con este fin.

Tabla 6. Investigaciones de modificaciones genéticas en *Clostridium acetobutylicum*

Referencia	Investigación	Butanol
Jang, et al., (2012)	Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in <i>Clostridium acetobutylicum</i>	18.9 g/L
Ren, et al., (2012)	Pleiotropic functions of catabolite control protein CcpA in Butanol-producing <i>Clostridium acetobutylicum</i>	10 g/L
Zhu, et al., (2011)	Engineering the robustness of <i>Clostridium acetobutylicum</i> by introducing glutathione biosynthetic capability	14.8 g/L
Sillers, et al., (2009)	Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or Thiolase overexpression coupled with CoA transferase down-regulation lead to higher alcohol titers and selectivity in <i>Clostridium acetobutylicum</i> fermentations	13.2g/L

Como puede verse en la tabla anterior, Jang y colaboradores (2012) obtuvieron la mayor concentración de butanol con 18.9 g/L, el trabajo consistió en reforzar el “Hot channel”, una ruta más directa de obtener butanol por acetil-CoA y butyryl-CoA, comparado con el “Cold channel”, la ruta convencional formación de ácidos y posterior reasimilación para la formación de butanol, acetona y etanol.

El resto de los trabajos, están dentro de la producción de butanol reportada para una cepa silvestre, 12-13 g/L de butanol (Jones and Woods, 1986).

En este trabajo se evaluó una estrategia de control de pH sobre la producción de butanol por *C. acetobutylicum* ATCC 824 en un cultivo semicontinuo tipo Draw-fill y se evaluó la modificación de un método para cuantificarlo a lo largo de la fermentación

4. JUSTIFICACIÓN

El interés en la producción de butanol por fermentación ha resurgido en los últimos años como alternativa al uso de combustibles de fuentes no renovables como el petróleo, además, por su amplio uso en la industria química, farmacéutica y textil como disolvente. Actualmente el rendimiento y la producción de butanol por microorganismos son muy bajos, por lo cual es necesario incrementarlos para que éste sea un proceso competitivo en el mercado, para lograrlo se deben estudiar estrategias del control de pH, así como evaluar diferentes tipos de cultivo para aumentar la concentración y la productividad de butanol.

5. HIPÓTESIS

1-Las estrategias propuestas de control de pH permitirán incrementar la concentración de butanol en un cultivo por lote

2-El cultivo semicontinuo permitirá aumentar la productividad de butanol en comparación con el cultivo por lote

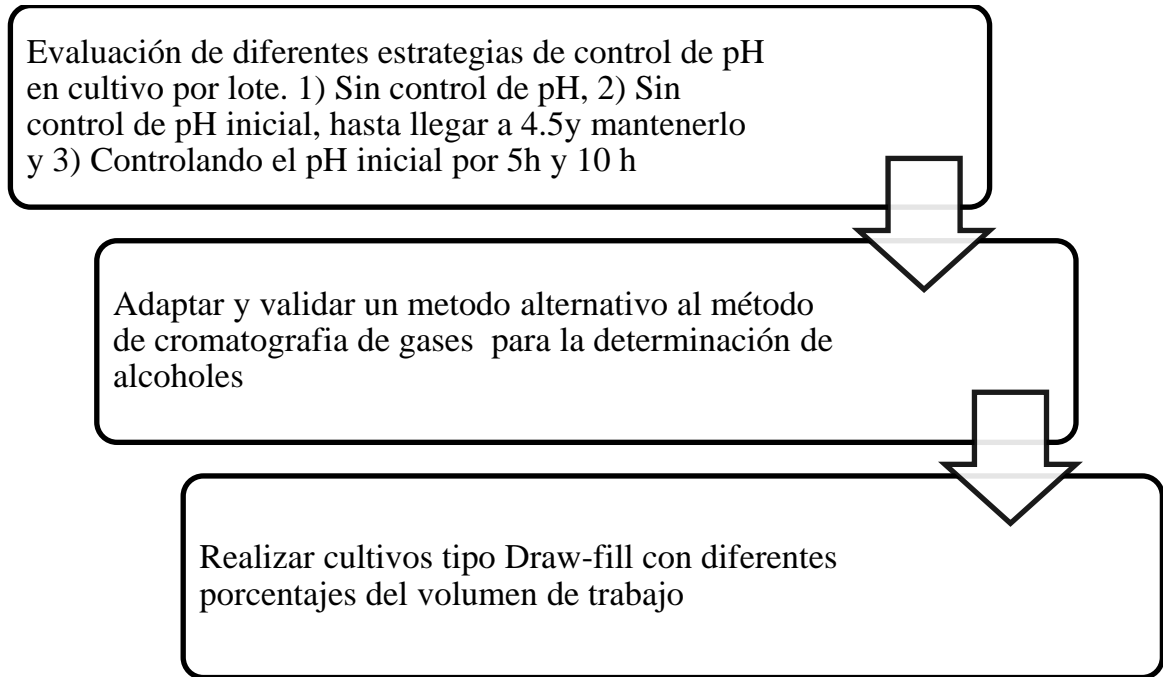
6. OBJETIVO GENERAL

Incrementar la producción y productividad de butanol por *Clostridium acetobutylicum* 824 en un cultivo semicontinuo

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la producción de butanol por *C. acetobutylicum* 824 en un cultivo por lote utilizando diferentes estrategias de control de pH
2. Adaptar y validar un método alternativo al método de Cromatografía de gases para la cuantificación de alcoholes en muestras de la fermentación ABE
3. Evaluar el cultivo semicontinuo tipo Draw-fill para la producción de butanol por *C. acetobutylicum* 824

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



9. MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Clostridium acetobutylicum ATCC 824.

Conservación de cepa

La bacteria *C. acetobutylicum* fue conservada en medio Gu modificado, GMM (sin asparagina) (Gu et al., 2009). *C. acetobutylicum* fue inoculado en una botella serológica (con salida nefelométrica) de 75 mL con un volumen de trabajo de 20 mL de GMM, la botella fue sellada y burbujeada con gas nitrógeno durante 20 min, para desplazar el oxígeno del líquido y el espacio de cabeza, y se incubó a 37°C sin agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 300 unidades Klett (UK) ($DO_{600nm} = 4$). Se adicionó un 20 % v/v de glicerol al 80% v/v, y se repartió 1 mL del inóculo en viales de 1.5 mL, los cuales fueron inmediatamente congelados y almacenados en un ultra-congelador a -70 °C, hasta su uso.

Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado para realizar los experimentos es el reportado por Gu, (Gu et al., 2009), con una modificación, que consistió en no adicionar asparagina (GMM, medio Gu modificado) quedando el contenido por litro: 50 g de glucosa, 0.75 g de KH_2PO_4 , 0.75 g de K_2HPO_4 , 0.4 g de $MgSO_4$, 0.01 g de $MnSO_4$, 1 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 2 g de $(NH_4)_2SO_4$, y 0.01 g de $FeSO_4$.

Inóculo

C. acetobutylicum fue inoculado (1 mL) en una botella serológica (con salida nefelométrica) de 75 mL con un volumen de trabajo de 20 mL de GMM, la botella fue sellada y burbujeada con gas nitrógeno durante 20 min, para desplazar el oxígeno del

líquido y el espacio de cabeza, y se incubó a 37°C sin agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 300 unidades Klett (UK).

Fermentaciones en cultivo por lote

Para llevar a cabo cada una de las fermentaciones en lote realizadas en la etapa 1 del proyecto, se utilizó un reactor tipo tanque agitado con un volumen de 0.75 L. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: volumen de operación de 0.4 L de medio GMM, previamente esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Gas nitrógeno fue utilizado antes de inocular el reactor y durante todo el experimento, agitación magnética de 200 rpm. El pH inicial del cultivo fue de 6.5 y se controló con NaOH 2N de acuerdo a cada una de las estrategias establecidas en la primera etapa del proyecto. La temperatura del proyecto se mantuvo a 37°C durante todas las fermentaciones. A lo largo de cada experimento se tomaron muestras de 5 mL para determinar la concentración de sustrato consumido, la concentración de biomasa y la producción de productos: butanol, etanol, acetona, ácido butírico y ácido acético.

Fermentaciones en cultivo semicontinuo: tipo draw-fill

Las fermentaciones en cultivo semicontinuo se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones utilizadas para los cultivos por lote, con la mejor estrategia de control de pH obtenida de la etapa 1 del proyecto de investigación. Se evaluaron diferentes volúmenes de cosecha (88%, 75% y 50%) del caldo de cultivo fermentado.

Métodos analíticos

1. Densidad óptica

La densidad óptica se midió con un espectrofotómetro Jenway 7315 a una longitud de onda de 600 nm, realizando diluciones apropiadas.

2. Determinación de consumo de sustrato

La determinación de consumo de sustrato (glucosa) se realizó mediante la determinación de azúcares reductores por DNS el método de Miller, (1959).

La determinación se realizó utilizando una curva tipo de glucosa (para cada lote de reactivo DNS), se colocaron 10 µL de muestra en un tubo de ensaye, se agregaron 990 µL de agua y 1.5 mL de la solución reactivo DNS, se agitó y colocó 5 min en agua en ebullición, utilizando un blanco, la reacción se detuvo colocando los tubos en hielo, posteriormente se adicionaron 5 mL de agua, se agitó en vortex y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

3. Determinación de ácidos y solventes por Cromatografía de gases

La determinación de ácidos orgánicos (ácido acético y ácido butírico) y solventes (butanol, etanol y acetona) se realizó con un Cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Auto System), equipado con una columna 2B-FFAP (30 m x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm), siendo el gas acarreador nitrógeno: 9 psi. Las condiciones de operación: 70°C por 5 minutos con un incremento de 15°C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 148°C incrementando 3°C por minuto hasta 200°C y se mantiene por 8 minutos, después se incrementa 10°C por minuto hasta alcanzar 240°C y se mantiene por 15 minutos. El tiempo de la corrida es de 40 minutos en el equipo. Detector de ionización de flama (FID) y las temperaturas del inyector y el detector fueron 220°C y 250°C, respectivamente. Volumen de inyección 2 microlitros, las

muestras son centrifugadas (Sorvall MC 12) a 12000 rpm x 15 minutos y filtradas (0.22 micrómetros). Las muestras se inyectaron por triplicado.

4. Ensayo del método de microdifusión modificado para la determinación de butanol

Se realizó en 2 tubos los cuales se colocan uno dentro del otro. En el tubo ancho se colocaron 0.5 mL de solución saturada de carbonato de sodio lo que hará que el alcohol sea menos soluble en la solución acuosa y se adicionaron con 0.05 mL de muestra o estándar; el tubo pequeño contenía 1 mL de una solución de dicromato de potasio 0.145% en ácido sulfúrico 10 N, este tubo se colocó dentro del tubo ancho, se tapó con un tapón de goma y se incubó por 60 min a 45°C, al final de este tiempo se sacó el tubo pequeño y se agregó 1 mL de agua, se leyó a 450 nm.

- ***Reactivos para microdifusión***

Solución saturada de Na₂CO₃: 30.7 g de Na₂CO₃ + 100 mL de H₂O

Solución de H₂SO₄ 10N: pureza 97.9%, densidad 1.84 g/mL 1eq= 98/2=49g

1L (10 eq/ 1L) (49g H₂SO₄/1 eq) (100g/97.9 g H₂SO₄)(1mL/ 1.84 g)= 272 mL H₂SO₄

Solución de K₂Cr₂O₇: 0.145g de K₂Cr₂O₇ + 100 mL de H₂SO₄ 10N

5. Método de microdifusión adaptado (MAM)

Se realiza en un cámara de Conway modificada que consiste en dos tubos, en el tubo ancho se colocan 0.5 mL de solución saturada de carbonato de sodio que causará que el alcohol sea menos soluble en la solución acuosa con 0.05 mL de muestra o 0.1 mL estándar, el tubo pequeño contendrá 1 mL de una solución de dicromato de potasio 0.145% en ácido sulfúrico 10 N y se coloca dentro del tubo ancho, se tapa con un tapón

de goma. Se incubó por 90 min a 45°C, se sacó el tubo pequeño, se agregó 1 mL de agua y se leyó a 450 nm. (Noriega-medrano et al., 2016)

- *Preparación de estándar y curva estándar*

Los estándares de referencia fueron preparados con reactivos grado cromatográfico y las concentraciones fueron las siguientes: butanol 10 g/L, etanol 1 g/L, acetona 4 g/L, ácido acético 4 g/L y ácido butírico 10 g/L. 1 g de butanol, 0.1 g de etanol, 0.4 g de acetona, 0.4 g de ácido acético y 1 g de ácido butírico se aforan a 100 mL con agua bidestilada.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1- Evaluación del efecto de diferentes estrategias de control de pH sobre la producción de butanol por C. acetobutylicum en cultivo por lote

Con objeto de lograr un incremento en la producción de butanol, se establecieron tres estrategias de control de pH:

1. Sin control de pH durante la fermentación
2. Sin control de pH inicial hasta llegar a 4.5, de aquí en adelante se mantiene en ese valor a lo largo de la fermentación
3. Controlando el pH inicial durante las primeras 5 h, a partir de las cuales se deja bajar libremente.

- 1) Estrategia sin control de pH y utilizando glucosa como fuente de carbono, los resultados se muestran en la figura 3. Como se puede observar, el pH disminuyó hasta alcanzar valores de 3.6, manteniéndose en este valor a lo largo de la fermentación; la producción de butanol se inició alrededor de las 15 h y alcanzó un valor casi constante a partir de las 20 h, de 0.79 g/L; el crecimiento máximo alcanzado fue de $DO_{600nm} = 4.9$. En éste experimento no se pudo cuantificar la cantidad de glucosa consumida debido al pH de las muestras, por el método de DNS. El ácido butírico fue el que mostró la mayor concentración, 3.0 g/L. En la fermentación se encontró una relación ABE de 6.4:3:0.6, no se encuentra en la relación que se reporta de 3:6:1, hay el doble de acetona que de butanol.

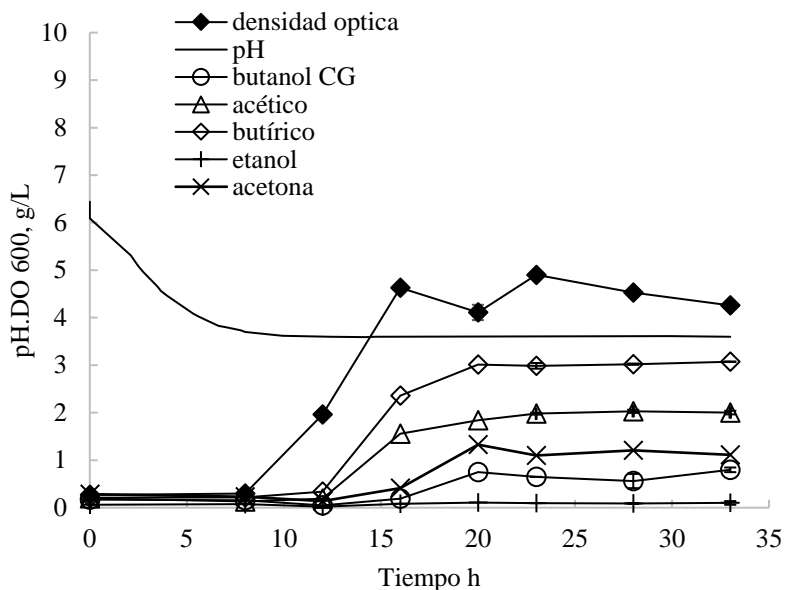


Figura 3. Cinética de producción de butanol por *Clostridium acetobutylicum* 824 en cultivo por lote sin control de pH y utilizando glucosa como sustrato.

Como con estas condiciones se obtuvo una producción de butanol menor a un 1 g/L, se optó por controlar el pH en base al pH mínimo registrado 3.6, aumentándose a un valor de 4.5, de acuerdo con lo que está reportado en literatura.

- 2) Estrategia 2, los resultados obtenidos con esta estrategia, se muestran en la figura 4. La concentración máxima de ácidos obtenidos en la fase acidogénica, fue acético 4.2 g/L y butírico 3.4 g/L y durante la fase solventogénica, se obtuvieron acetona, butanol y etanol (3.4 g/L, 8 g/L y 0.65 g/L, respectivamente), la productividad de butanol fue de 0.29 g/Lh y $Y_{P/S} = 0.16$ g/g. El crecimiento se mantuvo entre $DO_{600nm} = 8.9 - 9.9$ y el consumo de glucosa empezó a disminuir a partir de las 6 h, dejando como glucosa residual 0.05 g/L.

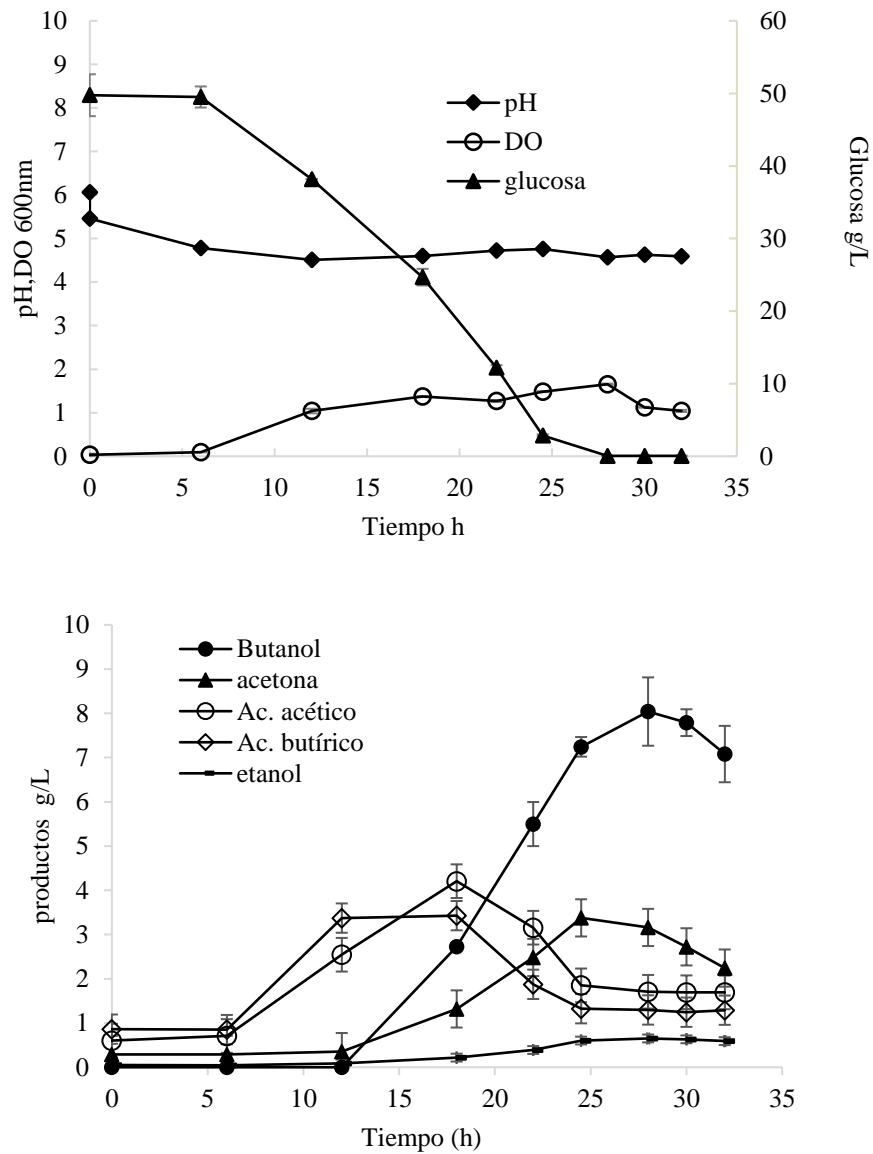


Figura 4. Cinética por *Clostridium acetobutylicum* 824 en cultivo por lote, utilizando glucosa como sustrato, iniciando el control de pH cuando éste alcanzó un valor de 4.5.

Como se puede ver el butanol aumentó 10 veces más con respecto a la estrategia 1, controlando el pH, cuando su valor llegó a 4.5. La producción de butanol con respecto a lo reportado en literatura está dentro del rango y la relación ABE (3.2:6:0.8) fue muy cercana a la reportada en literatura (3:6:1). En la fermentación se vio una disminución

en la concentración de ácidos, los cuales son reasimilados por el microorganismo para la producción de solventes.

- 3) Con la estrategia 3 (figura 5), al controlar el pH durante las primeras 5 h, se obtuvo una concentración máxima de butanol de 1.8 g/L a las 28 h de cultivo y un crecimiento de $DO_{600nm} = 5.6$. El pH se mantuvo en un valor de 4, no descendió más; a las 20 h de cultivo la bacteria dejó de consumir sustrato, quedando 15.6 g/L de glucosa residual.

Los resultados de los metabolitos producidos al controlar el pH inicial por 5 horas, como se muestra en la figura 5 (2), se observa que los productos de mayor concentración fueron el ácido acético con 6.7 g/L y el ácido butírico con 4.2 g/L a las 24 h de tiempo de fermentación. La producción de butanol fue de 1.8 g/L, acetona 1 g/L y etanol 1.1 g/L, todas concentraciones máximas en el cultivo. La productividad máxima de butanol fue 0.064 g/Lh, con un $Y_{\text{butanol/glucosa consumida}} = 0.05$ g/g. La producción máxima de solventes fue de 3.3 g/L con una productividad máxima 0.103 g/Lh, a las 32 h. Con ésta condición se obtuvo una baja producción de solventes y la relación de ABE que se obtuvo fue 2.6:3.7:3.7, la misma relación para butanol-etanol.

El experimento fue una fermentación acetogénica al ser el ácido acético el principal metabolito producido, de acuerdo a lo que está reportado en literatura un pH cercano a la neutralidad promueve la formación de ácidos, sin embargo, en concentraciones altas resultan tóxicos para la célula y se frena el metabolismo de la misma.

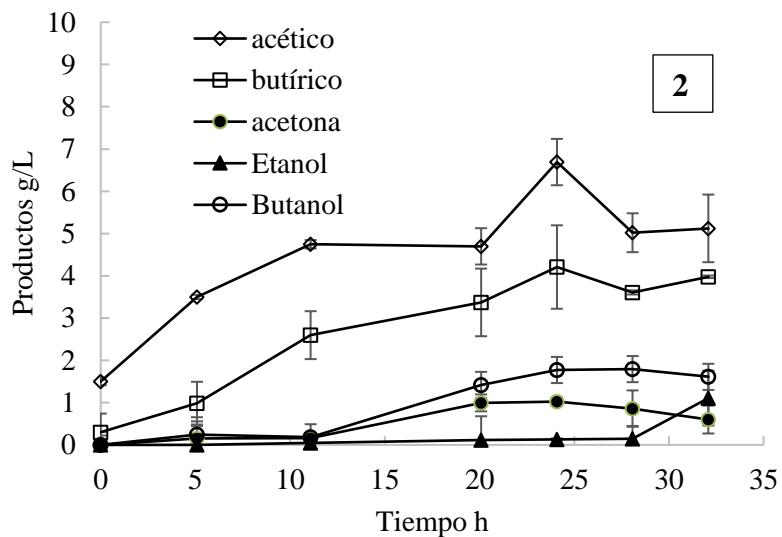
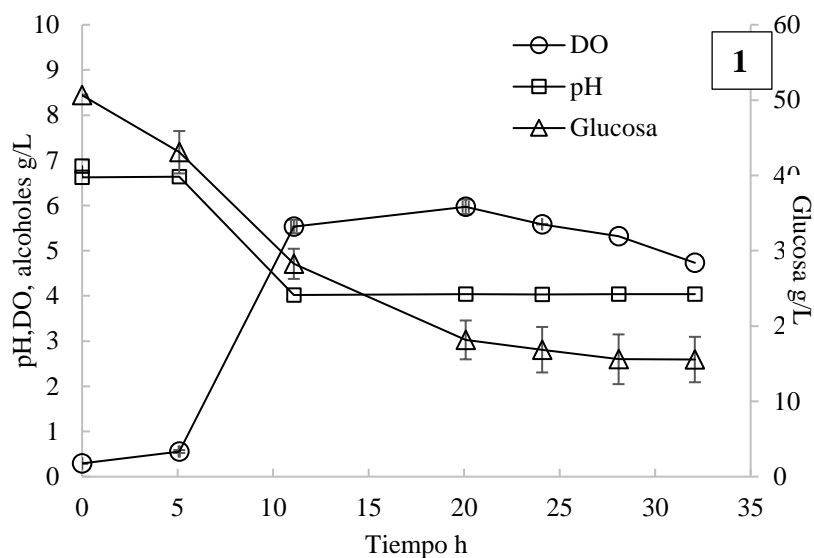


Figura 5. 1) Cinética de *Clostridium acetobutylicum* 824 en cultivo por lote, utilizando glucosa como sustrato, con control de pH inicial por 5h y después se deja libre (estrategia 3). 2) Cinética de los metabolitos producidos con la estrategia 3.

La finalidad de la estrategia 3, fue favorecer el crecimiento de la bacteria a un pH cercano a la neutralidad y el consumo de glucosa para la producción de ácidos, para

después entrar a la segunda fase del cultivo, fase de solventogénesis controlando el pH inicial del cultivo.

En literatura se encuentran reportes, que indican que la solventogénesis comienza cuando el pH llega a un valor crítico, de tal manera, que un pH bajo es prerequisite para la producción de solventes. La influencia del pH ha sido correlacionada con la concentración de ácido butírico no disociado (Hüsemann & Papoutsakis, 1988; Monot, et al., 1984).

En un trabajo realizado para determinar la causa del fenómeno "acid crash" (Maddox et al., 2000), los resultados indican que éste fenómeno ocurre cuando la concentración de ácidos no disociados rebasa 57-60 mmol/L. En la primera estrategia de control el valor alcanzado por los ácidos fue de 67 mmol/L, esto podría explicar la baja concentración de solventes.

Las "fermentaciones acidogénicas", que se producen cuando se realizan fermentaciones en lote a valores de pH cercanos a la neutralidad, se deben a la rápida producción de ácidos seguida por la inhibición de la solventogénesis, cuando la concentración total de ácido alcanza 240-250 mmol/L.

Monot et al., 1984, encontraron que al mantener el pH entre 4.5 y 6 en cultivo por lote para *Clostridium acetobutylicum*, a pH bajo se presenta las dos fases: acidogénica y solventogénica y pH alto la única fase que se presenta en el cultivo es la acidogénica; así como la influencia del pH puede ser correlacionado con un rol crítico de la concentración de ácido butírico no disociado en el medio: el crecimiento celular es inhibido cerca del 0.5 g/L y la producción de solventes inicia cuando hay un nivel de ácido no disociado de 1.5 g/L.

Huang et al., 1986, demostraron que el acetato y butirato se concentran dentro de la célula en condiciones ácidas y por lo tanto tienden a disminuir el pH intracelular. La alta concentración de butirato intracelular presumiblemente conduce a la inducción de

la producción de solventes, evitando así una disminución del pH intracelular lo suficientemente grande como para ser perjudicial para la célula.

Con lo anterior, se puede deducir que un pH tan bajo durante la fermentación con la estrategia 1 y al ser los mayores productos del metabolismo celular el ácido acético y ácido butírico, el pH intracelular fue muy bajo y fue la causa del cese de la solventogénesis.

En literatura se puede encontrar una investigación realizada para ver el efecto del pH interno de la célula de *Clostridium acetobutylicum*, se observó que es necesario mantener un pH interno de 5.5 para iniciar la solventogénesis, lo cual equivale a un pH externo de 4.5 y en el cual se observa que a valores de 4.3 de pH externo ya no hay producción de butanol. El switch de ácido a solvente podría no ser el resultado del bajo pH externo directamente, pero si un resultado de la caída del pH interno (Gottwald and Gottsechalk, 1985). Lo cual es un antecedente del porqué en éste trabajo la mayor producción de butanol (8 ± 1.6) se obtuvo cuando se controló el pH en 4.5.

En un trabajo realizado por Li et al., 2011, con la finalidad de comparar lote, fed-batch y continuos con control de pH en 4.5, los resultados obtenidos para lote fue una productividad de butanol de 0.37 g/Lh, una producción de 11 g/L y un $Y_{P/S} = 0.23$ g/g. Sin embargo, en cultivo continuo obtuvieron la mayor productividad (0.86 g/L/h).

Comparando los resultados obtenidos (productividad de butanol 0.34 g/Lh y un $Y_{P/S} = 0.19$ g/g) con éste trabajo los resultados de productividad y rendimiento están muy cercanos, a los encontrados en la literatura utilizando cultivo por lote.

Los cultivos a pH neutral sin adición de butirato a acetato no producen solventes, Condiciones ácidas no son obligatorias para la producción de butanol (George, 1983).

Otro trabajo dónde se reporta que el switch para la producción de solventes es una respuesta de adaptación de la célula a el bajo pH del medio resultante por la producción de ácidos. En cultivo continuo a pH neutro y limitación de glucosa, variando la tasa de dilución, los únicos productos de fermentación son butirato, acetato, CO₂ e H₂. Cuando el pH es menor a 5 (4.3 óptimo), los principales productos de la fermentación, fueron

acetona y butanol; cuando se adicionó ácido butírico (20-80 mM) a un pH de 4.3, el resultado fue positivo para la producción de solventes (Bahl, et al., 1982).

Holt et al., 1984, demostraron que, si se añaden altas concentraciones de acetato o de butirato, o los dos al cultivo en lote de *C. acetobutylicum* manteniendo un pH neutral, el cultivo podrá iniciar la producción de solventes. En cultivo por lote a pH 7, observaron una producción de ácidos baja (butírico 44 mM y acético 40 mM) y la producción de solventes fue casi nula (butanol 0.7 mM y acetona 0.4 mM). Al suplementar el medio con 100 mM de butirato y acetato, a un pH de 5.0, la producción de butanol se incrementó a 51 mM y la acetona a 31 mM. En estudios actuales sobre trabajos con pH se reporta lo siguiente:

- En un estudio realizado en 2013, se logró una producción de 11.7g/L de butanol con una productividad de 0.18 g/Lh, sin control de pH en cultivo por lote, con una cepa adaptada, derivada de *C. acetobutylicum* 824 (Wu et al., 2013).
- En un trabajo realizado por Tsai et al., 2014, se reporta que manteniendo el pH en 4.8 resulta apropiado para la fermentación ABE, resultando como mejor condición mantenerlo en 4.5, obteniendo 11.1 g/L de butanol, en cultivo continuo utilizando *C. acetobutylicum* BCRC 10639. También observaron que al controlar el pH en 5.5, la ruta metabólica se movió hacia la producción de biohidrógeno (12.5 L/L).
- M. Jiang et al., 2014, reportaron que a un pH de 5.5 se favorece la producción de butanol 15.7 g/L para una cepa de *C. beijerinckii* IB4 en cultivo por lote, y sin control de pH obtuvieron 11 g/L de butanol.
- Los resultados de Wei Jiang et al., 2014, indicaron que mantener el pH a 4,8, el valor de pH óptimo para solventogénesis, podría aumentar el consumo de D-xilosa cuando fue la única fuente de carbono, utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824 en cultivo por lote.

- Wu et al., 2017, encontraron que manteniendo el control de pH en 5.2 se favorece la producción de hidrogeno (5.76 L/L) y la producción de butanol fue de 12.06 g/L, con una cepa de *C. beijerinckii* en cultivo por lote.

En éste trabajo para obtener una mayor concentración de butanol, la estrategia 2 resultó ser la mejor opción, para obtener valores como los anteriormente mencionados de literatura.

Etapa 2. Adaptación y validación un método alternativo al método de Cromatografía de gases para la cuantificación de alcoholes en muestras de la fermentación ABE

Con la finalidad de poder cuantificar el butanol a lo largo de la fermentación de manera que nos permitiera analizar resultados de manera rápida y precisa, para agilizar la toma de decisiones, se adaptó y validó el método de microdifusión para la cuantificación de los alcoholes presentes en las muestras de fermentación ABE. el método se basa en la oxidación de los compuestos volátiles en una muestra o matriz compleja y fue descrito por Conway en 1942.

Para llevar a cabo la modificación del método, primero se realizaron las curvas tipo de etanol, butanol y una mezcla de ambos, así como se evaluó el tiempo necesario para la incubación del ensayo. También se determinó el límite de detección, límite de cuantificación, la linealidad, el rango de trabajo, repetibilidad y reproducibilidad.

El principio de microdifusión, se basa en que, si una sustancia es volátil y un solvente es puro, se mantienen en compartimentos separados, pero en contacto con la misma atmosfera, el soluto volátil tiende a disolverse en el solvente puro, lo que implicará una difusión del soluto desde la solución original al solvente. Este proceso ocurrirá hasta alcanzar el equilibrio, pero si en lugar del solvente puro utilizamos una sustancia que convierta al soluto volátil en no volátil, la difusión ocurrirá hasta que la presión de vapor en la atmosfera compartida tienda a cero. Este método es una forma simple de separar compuestos volátiles sin necesidad de trabajar a altas temperaturas, también se le conoce como destilación isotérmica. En el mercado existen algunos kits para la detección de alcoholes, principalmente etanol, la mayoría se basan en una reacción enzimática y posterior lectura espectrofotométrica.

Para la determinación de diferentes alcoholes se utilizó el método de microdifusión con las condiciones para determinar etanol, como se muestra en la figura 7.

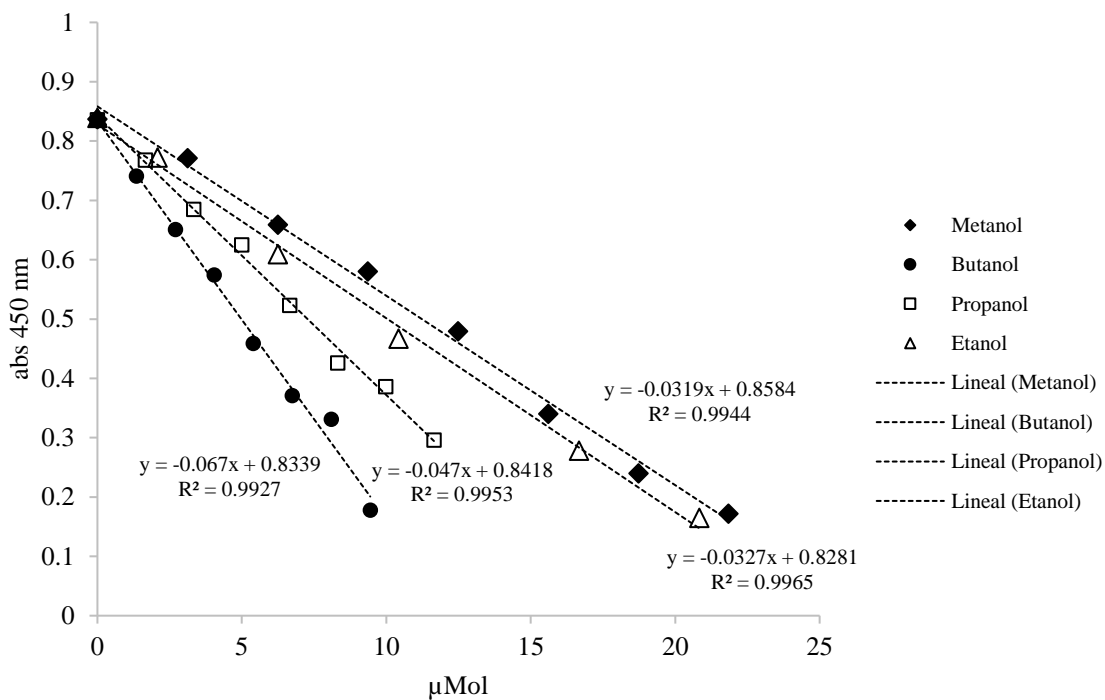


Figura 6. Curvas de Diferentes solventes por el método de microdifusión, utilizando las condiciones para determinar etanol (60 min a 45°C).

En la figura 6 se muestran las curvas de calibración para distintos alcoholes de cadena lineal y se reportan en concentraciones molares.

Partiendo del ensayo para la determinación de butanol, se realizaron varios ensayos a distintos tiempos y temperaturas tomando como estándar de butanol una solución de 5 g/L, como se muestra en la figura 8. Se probaron tres temperaturas, 35, 45 y 55 °C y diferentes tiempos, 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min.

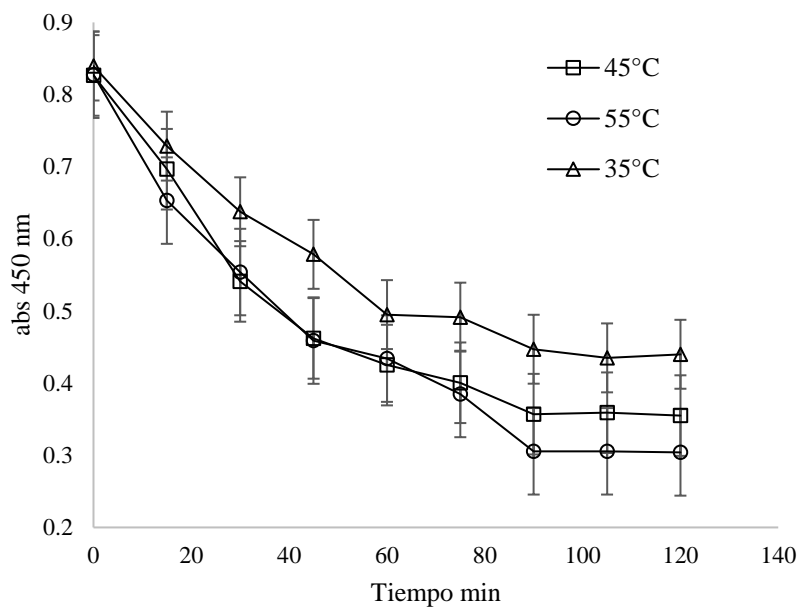


Figura 7. Cinética de una solución estándar de butanol 5 g/L a diferentes temperaturas y diferentes tiempos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las condiciones óptimas para la determinación son 45°C y 90 minutos. Después de los 90 minutos, para las tres temperaturas, ya no hay reacción. Con estas condiciones se evaluó la curva de butanol de 1 a 10 g/L.

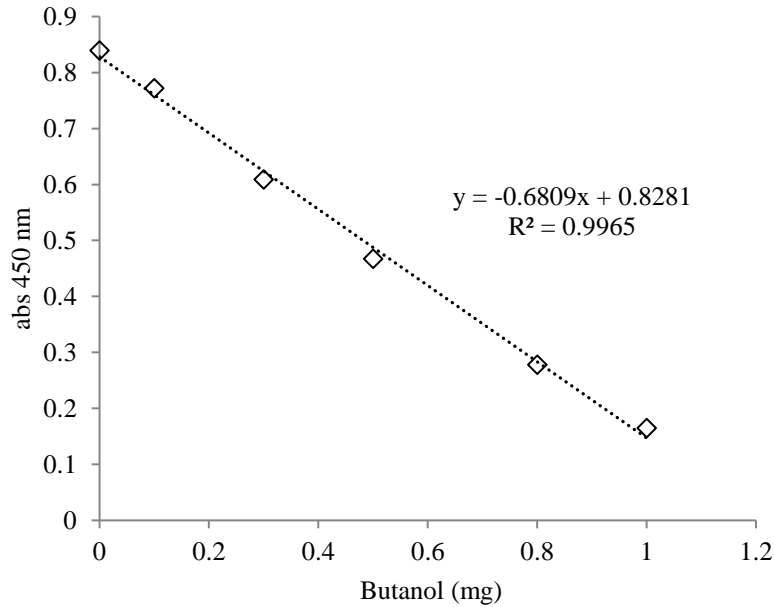


Figura 8. Curva de calibración de butanol por el método de microdifusión modificado.

En la figura 8 se muestra la curva de calibración con las nuevas condiciones obtenidas de las condiciones evaluadas, 90 minutos a 45 °C.

Determinación de la linealidad del sistema, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión y selectividad.

La selectividad del método de microdifusión adaptado fue determinado por la reacción del reactivo 2 ($K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$) con los principales metabolitos presentes en las muestras de la fermentación ABE (acetona 4 g/L, ácido acético 4 g/L y ácido butírico 10g/L), así como el medio de cultivo GMM.

La linealidad del sistema fue determinada usando el método de mínimos cuadrados, el criterio de aceptación fue $r^2 \geq 0.99$.

El rango lineal de operación fue establecido entre el más alto valor de concentración y el más bajo valor de concentración con una precisión y exactitud satisfactoria. La precisión del método fue evaluada para determinar la reproducibilidad y repetibilidad. La reproducibilidad fue determinada con la realización de una curva de calibración por

triplicado durante 3 días y la repetibilidad fue determinada con una curva de calibración por 6 veces, realizadas el mismo día. Para los dos ensayos de precisión el criterio de aceptación fue un coeficiente de variación (CV) $\leq 5\%$ para la repetibilidad y de 10 % para la reproducibilidad.

El límite de cuantificación (LOQ) es la cantidad más pequeña de analíto que puede ser determinada cuantitativamente en una muestra con una exactitud y una precisión, fue determinada con 10 blancos reactivos. La ecuación para $LOQ = x - 10s$, donde $x =$ media y s la desviación estándar de las mediciones. El límite de detección (LOD) es la cantidad de analíto que puede ser detectada y fue determinada con la siguiente ecuación: $LOD = x - 3s$.

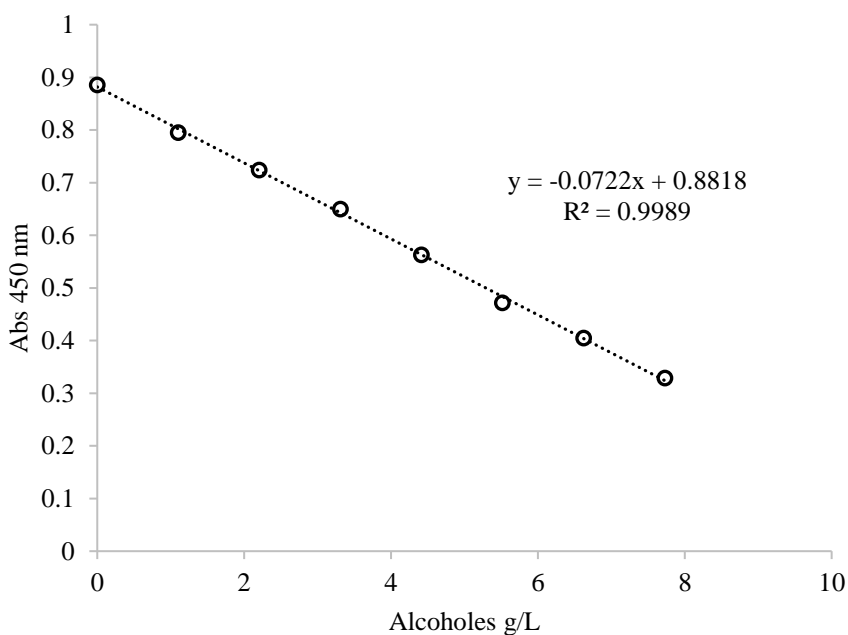


Figura 9. Curva de tipo de alcoholes con los estándares completos por el método de microdifusión modificado (45°C por 90 min).

En la figura 9 se puede ver la curva de calibración para alcoholes (butanol-etanol) en una relación 6:1, para esta curva se utilizaron los estándares completos, mismos que fueron utilizados para las curvas de cromatografía de gases.

La linealidad se obtuvo graficando los estándares (abs vs concentración) y se obtuvieron en rangos de coeficientes de correlación de 0.9961–0.9998. El rango lineal de operación para los estándares completos fue de 1-7 g/L. Los coeficientes de variación (CV) que se obtuvieron para la repetibilidad y reproducibilidad fue de 4.9 % y 8.08 % respectivamente como son menores a los criterios establecidos la precisión es considerada aceptable. El LOD calculado fue 0.11 g/L y el LOQ fue de 0.4 g/L.

Comparación de los métodos de microdifusión adaptado (MAM) y Cromatografía de gases (GCM)

Para la comparación de los Métodos de MAM y GCM se utilizaron dos estrategias:

1) Usando una solución estándar de concentración conocida de butanol-etanol (en una relación molar 6:1) con una concentración de 5 g/L de butanol y 0.833 g/L de etanol, fue probada 8 veces por los dos métodos y una prueba de ANOVA que fue utilizada para comparar las medias de las mediciones para buscar diferencia significativa para un nivel de significancia de 5 %.

2) Se utilizaron las muestras de una fermentación de ABE, las cuales se determinaron por triplicado y se calculó el error de correlación entre los métodos para cada una de las muestras con un intervalo de confianza de 95%. Este error fue obtenido cuando los intervalos de confianza para los dos métodos fueron graficados y el área no traslapada fue considerada como el error de correlación, el cual es la variación que existe entre métodos para cada muestra. Estos análisis se realizaron usando el software MATLAB (The MathWorks INC,2016).

Con la estrategia 1 antes mencionada, donde se utilizó una prueba de ANOVA (tabla 8), se busca que la F calculada < F de tablas para aceptar la hipótesis nula (H_0), donde la F calculada es la prueba estadística y la F de tabla es el valor crítico. Los estados de la hipótesis nula que las medias de las mediciones hechas con MAM (μ_1) es igual a las medias de las mediciones hechas con GCM (μ_2), por lo tanto, $H_0 = \mu_1 = (\mu_2)$. Usando las medidas hechas por los dos métodos (tabla 7) el valor para F calculada = 0.0086 es más bajo que el valor crítico de las tablas de distribución T (F de tabla = 4.6), por lo tanto,

H_0 es aceptada. Por lo que no hubo una diferencia significativa entre las medias de cada método, con un nivel de confianza de 95%. Los coeficientes de variación para cada método fueron calculados para cada concentración indicando una buena precisión para los dos métodos, con coeficientes de variación de 3.80 % y 7.82 %, para MAM y para GCM para la determinación de alcoholes respectivamente (ver tabla 7).

Para la estrategia 2, el error de correlación fue calculado para cada muestra de la fermentación ABE, analizada por los dos métodos. El intervalo de confianza fue de 95 % para cada muestra fue calculado, éste intervalo de confianza tiene un área llamada área de correlación. Las dos áreas de correlación fueron graficadas y el área que no se sobrepone se considera el error de correlación. El error de correlación (CE) indica el error que la medición tendrá entre los métodos, como ejemplo está la muestra 8 en la figura 10 y los errores de correlación para cada una de las muestras de la fermentación ABE se muestran en la tabla 9.

Tabla 7. Datos experimentales de un estándar de 5 g/L butanol y 0.833 g/L etanol para la comparación de MAM con GCM.

n	Estándar 5 g/L butanol-0.833 g/L etanol		
	MAM alcoholes	GCM butanol	GCM alcoholes
1	5.77	4.92	5.39
2	5.69	5.39	5.93
3	6.13	5.56	6.15
4	5.66	4.67	5.13
5	5.54	5.55	6.09
6	5.83	5.86	6.47
7	5.99	4.96	5.45
8	5.48	5.10	5.61
Mean	5.76	5.25	5.78
SD	0.22	0.40	0.45
CV (%)	3.80	7.65	7.82

* n=8, muestra con 5 g/L de butanol y 0.833 de etanol

Tabla 8. Tabla de ANOVA test para comparar MAM con GCM usando una solución con una concentración conocida (estándar de 5 g/L butanol-0.833 g/L etanol)

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad(GL)	Suma de cuadrados (SS)	Cuadrado de medias (MS)	F _{calculada}	F _{tabla}
Medidas de alcohol	2-1=1	SS_{med} = 532.5721 - 532.571 = 0.0011	$MS_{med} = \frac{0.0011}{1}$ = 0.0011	F_C = $\frac{0.011}{0.127}$ = 0.0086	$F_{0.95,1,14}$ = 4.6
Error	16-2=14	SS_{Error} = 1.7815 - 0.0011 = 1.7804	$MS_E = \frac{1.7804}{14}$ = 0.12717		

Tabla 9. Errores de Correlación calculados para las mediciones hechas con MAM y GCM

n	Intervalo de confianza		Error de correlación(%)
	MAM alcoholes	GCM alcoholes	
1	[0.0604, 0.0996]	[0.0016, 0.1584]	<1
2	[0.0600, 0.0620]	[0.0204, 0.0596]	<1
3	[0.2, 0.28]	[0, 0.3060]	<1
4	[0.06012, 4.6388]	[2.3192, 3.2208]	26
5	[5.1644, 5.5956]	[5.1036, 5.4564]	2
6	[7.9936, 8.2664]	[7.444, 8.816]	10
7	[8.7932, 10.0868]	[9.2444, 10.6556]	10
8	[8.9216, 11.0384]	[9.2780, 11.0420]	8
9	[9.0308, 11.0692]	[9.4252, 10.9148]	9

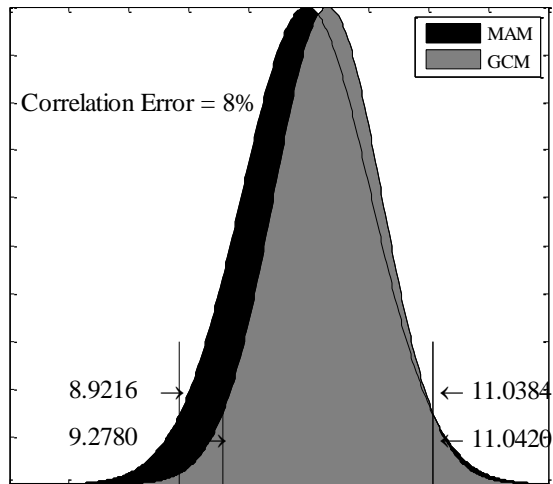


Figura 10. Ejemplo de intervalos de confianza para la muestra No. 8 con MAM y GCM para obtener el error de correlación

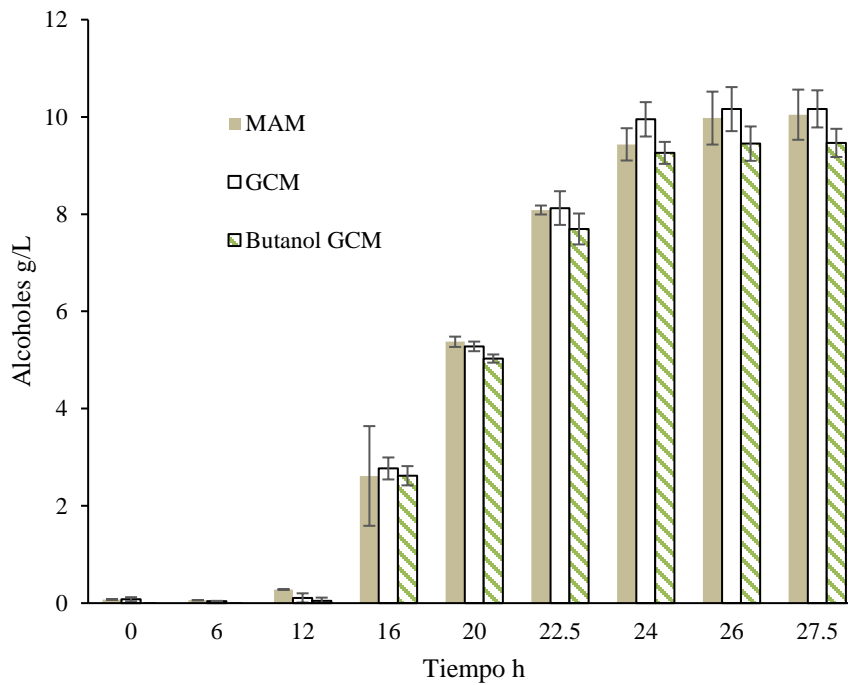


Figura 11. Comparación de los métodos de microdifusión adaptado (MAM) y Método de Cromatografía de gases en la determinación de alcoholes (etanol-butanol) y butanol en muestras de la fermentación ABE.

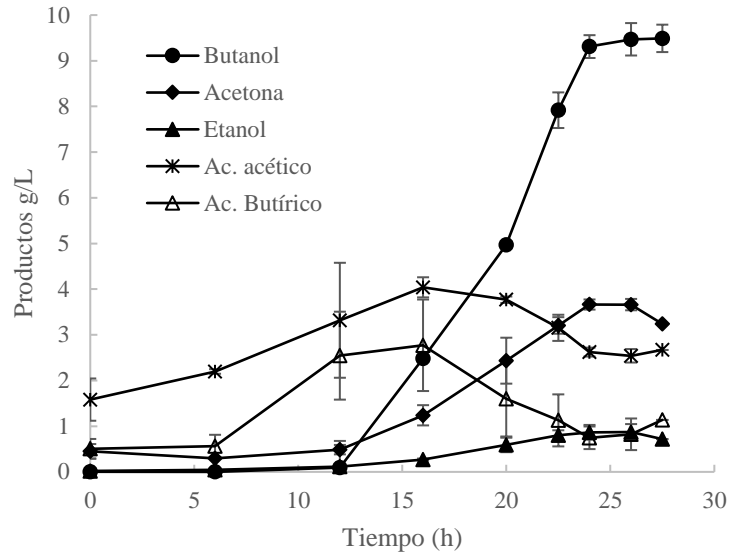


Figura 12. Cinética de cuantificación de diferentes metabolitos por Cromatografía de gases de muestras de la fermentación ABE, por *Clostridium acetobutylicum* 824 en cultivo por lote.

Las determinaciones hechas para butanol por CGM (figura 11) soportan la idea de que MAM puede ser utilizado para una determinación indirecta de butanol, ya que es el alcohol que se encuentra en mayor proporción en las muestras de la fermentación ABE y las concentraciones máximas de etanol fueron de 0.87 g/L, por lo que se puede considerar a MAM como un método semi-cuantitativo para la determinación de butanol. En la figura 12 se muestra una cinética de producción de metabolitos en una fermentación de *Clostridium acetobutylicum* en cultivo por lote utilizando la segunda estrategia de control de pH, logrando una mayor concentración de butanol al utilizar un inóculo más joven. La producción de butanol fue de 9.47 g/L, acetona 3.66 g/L y 0.87 g/L de etanol. Las concentraciones máximas de ácido butírico y ácido acético fueron de 2.77 g/L y 4.04 g/L, respectivamente. Resultando en un consumo de glucosa de 48 g/L y un rendimiento de butanol de 0.19 g/g y una productividad de butanol 0.34 g/Lh. La relación molar ABE que se obtuvo es de 3:6: 0.9.

El método de microdifusión mostró una buena precisión con respecto a los resultados con CG, para la determinación de butanol de manera indirecta (semi-cuantitativo), por lo que se utilizará como método de referencia en la tercera etapa del proyecto.

Etapa 3: Producción de butanol por C. acetobutylicum, en un cultivo semicontinuo tipo Draw-fill bajo la estrategia de control de pH establecida previamente

Uno de los aspectos de la investigación sobre este tema, se ha enfocado al desarrollo de nuevas tecnologías de fermentación, en esta etapa se realizaron cultivos semicontinuos tipo Draw-fill. La fermentación se llevó a cabo siguiendo la estrategia 2 (donde se obtuvo una mayor concentración de butanol) que consiste en no controlar el pH al inicio del cultivo sino hasta que llega a un valor de 4.5, evaluándose diferentes volúmenes de cosecha (50, 75 y 88%).

Durante esta etapa, la cuantificación de alcoholes totales (butanol-etanol) se llevo a cabo por el método de microdifusión adaptado (MAM), teniendo como antecedente que bajo la estrategia 2, se mantiene una relación ABE muy cercana a la reportada 3:6:1 y la concentración máxima de etanol en los cultivos se encuentra en promedio al rededor de 0.8 g/L, por lo que se puede tener una concentración aproximada de butanol y se utilizó como método de selección de muestras, para analizar por cromatografía de gases y conocer la cinética de los ácidos en el cultivo.

Para la realización del experimento primero se cosechó el 50 % del volumen de operación del reactor, retirándose 210 mL de caldo de cultivo y adicionándose 210 mL de medio Gu modificado, de tal manera que el volumen total de medio utilizado fue 1.47 L. Para cosechar cada subcultivo se tomó en cuenta el aumento del pH y el consumo de glucosa, al término de éste último se realizó el recambio, tomándose muestras para las posteriores determinaciones (D.O, glucosa residual, alcoholes totales, etc.).

Al cosechar el 50% del caldo de cultivo se inició con cada subcultivo teniendo en cuenta que había cierta cantidad de metabolitos acumulados en el medio de cultivo posiblemente algunos de ellos inhibidores para las células, observándose que el pH tardó más tiempo en descender y el consumo de glucosa fue más lento, como puede verse en la figura 13. La concentración de glucosa inicial para los subcultivos fue de

25 ± 0.5 g/L, también se observó que, aunque el pH, no se controló inicialmente, (estrategia 2) aumentó por la asimilación de los ácidos del medio, dicho aumento es más evidente en los primeros subcultivos. La densidad óptica alcanzada en el primer lote fue de $D.O_{600\text{nm}} = 8.8 \pm 0.3$ y la DO inicial en los subcultivos fue de $DO_{600\text{nm}} = 4.2 \pm 0.2$.

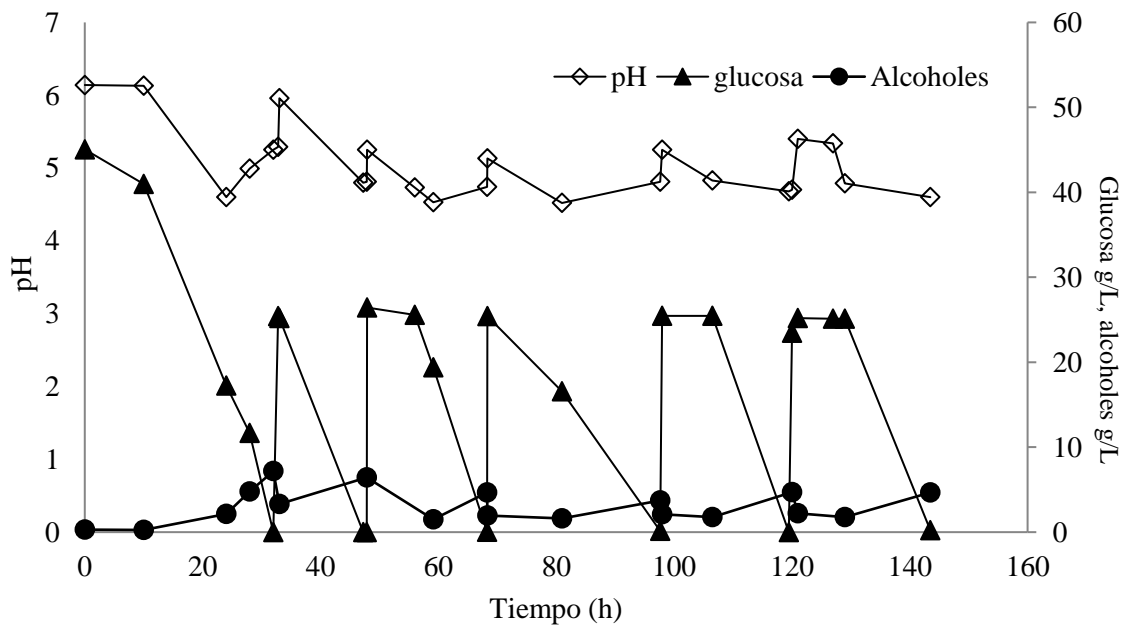


Figura 13. Cinética de producción de alcoholes por *C. acetobutylicum* en cultivo semicontinuo, cosechando el 50% del volumen de caldo de cultivo.

En la tabla 10, se muestran los valores de productividad, alcoholes totales y rendimiento de alcoholes sobre sustrato consumido. La producción de alcoholes se calculó restando la concentración inicial en cada subcultivo a la concentración final de alcoholes.

Tabla 10. Valores de cada subcultivo cosechando el 50% de volumen de caldo de cultivo.

No. de Subcultivo	Alcoholes (g/L)	Productividad (g/Lh)	Y P/S
1	7.17	0.224	0.158
2	3.13	0.198	0.095
3	3.2	0.157	0.121
4	2.1	0.072	0.083
5	2.9	0.130	0.114
6	2.9	0.123	0.115

*Los valores presentados en la tabla se basan en la determinación de alcoholes por MAM.

Cuando se aumentó el volumen de cosecha al 75% del caldo de cultivo figura 15, se puede observar la fermentación fue viable por 139.5 horas, la producción mayor de butanol, se alcanzó en el tercer subcultivo y fue de 7.5 g/L y productividad máxima de 0.408 g/Lh (estos datos se muestran en la tabla 11). Esta fermentación se llevó a cabo durante 139.5 horas, la fermentación podría continuar, pero el tiempo de fermentación por subcultivo es mayor y eso baja la productividad.

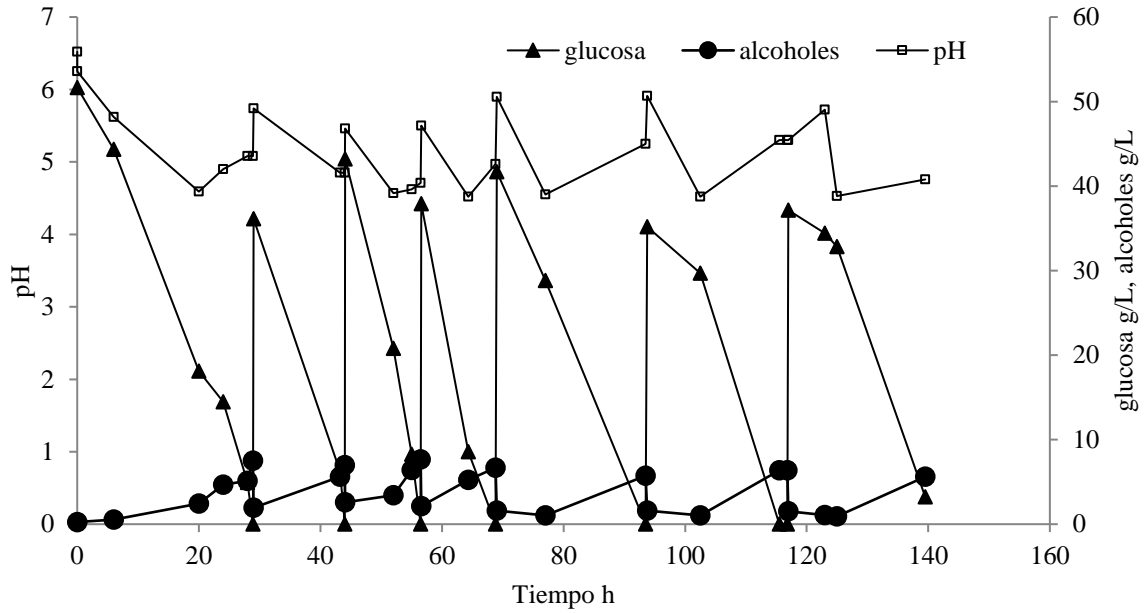


Figura 14. Cinética de producción de alcoholes por *C. acetobutylicum* en cultivo semicontinuo, cosechando el 75% del volumen de caldo de cultivo.

En esta figura, también se observa el comportamiento del pH (estrategia 2), en el cual también hubo un aumento, lo cual indica que se está produciendo butanol. El valor inicial de glucosa en el primer lote es de 50 ± 2 g/L y el valor inicial promedio de glucosa en el resto de subcultivos fue de 38.1 ± 3.9 , en total se utilizaron 2.31 L de medio Gu modificado. La densidad óptica alcanzada en el primer lote fue de $D.O_{600\text{nm}} = 9 \pm 0.5$ y la DO inicial en los subcultivos fue de $DO_{600\text{nm}} = 2.1 \pm 0.4$.

Los valores de productividad, producción de alcoholes y tiempos de subcultivos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Valores en cada subcultivo cuando se cosecha el 75% del volumen de caldo de cultivo.

No. de subcultivo	Alcoholes (g/L)	Productividad (g/Lh)	Y _{P/S}
1	7.5	0.259	0.147
2	5.0	0.335	0.140
3	5.1	0.408	0.118
4	4.6	0.371	0.121
5	4.7	0.191	0.113
6	5.4	0.245	0.153
7	4.6	0.194	0.125

*Los valores presentados en la tabla se basan en la determinación de alcoholes por MAM.

Cuando se cosechó el 88% del caldo de cultivo, se obtuvo una concentración máxima de alcoholes de 8.7 g/L. El cultivo semicontinuo se mantuvo viable durante 129 h y la productividad se aumentó de 0.223 a 0.423 g/Lh. El volumen total de medio de cultivo utilizado fue 2.27 L y el volumen de medio fresco para cada subcultivo fue de 370 mL.

En la figura 15, se puede observar que al final de la fermentación se detuvo el consumo de glucosa a las 175 h y a partir de las 151 h el pH no aumenta de manera significativa, después de 49 h, lo cual indica una baja producción de alcoholes como se observa.

Al cosechar una mayor cantidad de caldo de cultivo el comportamiento de la fermentación es como un cultivo en lote por lo que se esperaría una mayor concentración de alcoholes, con respecto a los anteriores volúmenes de cosecha.

En éste cultivo se obtuvieron mejores resultados en comparación con los anteriores volúmenes de cosecha por lo que resulta interesante analizar estas muestras también por cromatografía de gases, como se muestra en la figura 16.

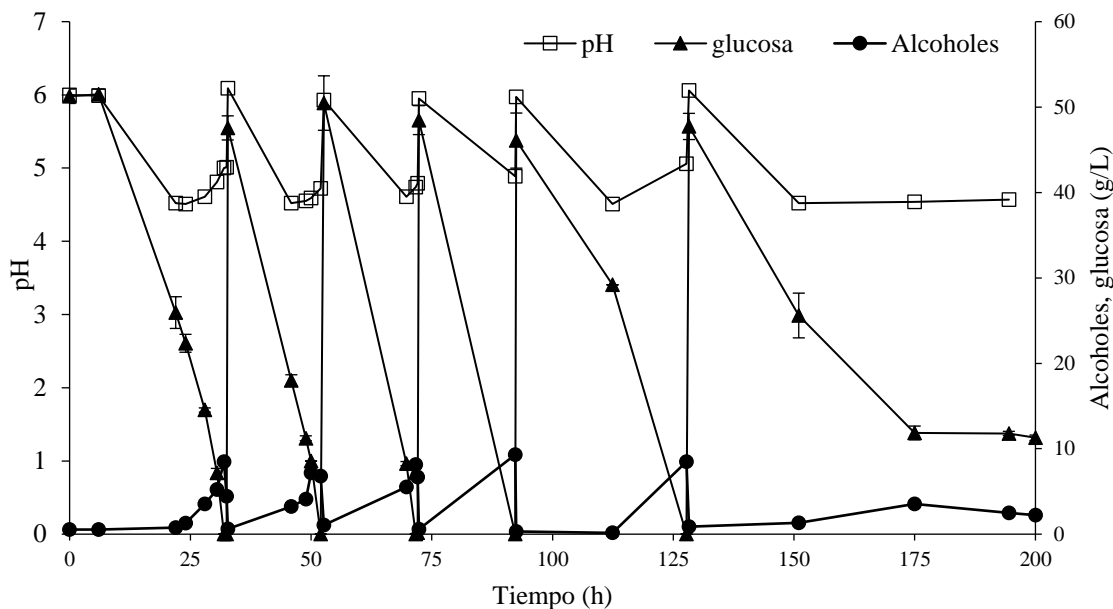


Figura 15. Cinética de producción de alcoholes por *C. acetobutylicum* en cultivo semicontinuo, cosechando el 88% del volumen de caldo de cultivo

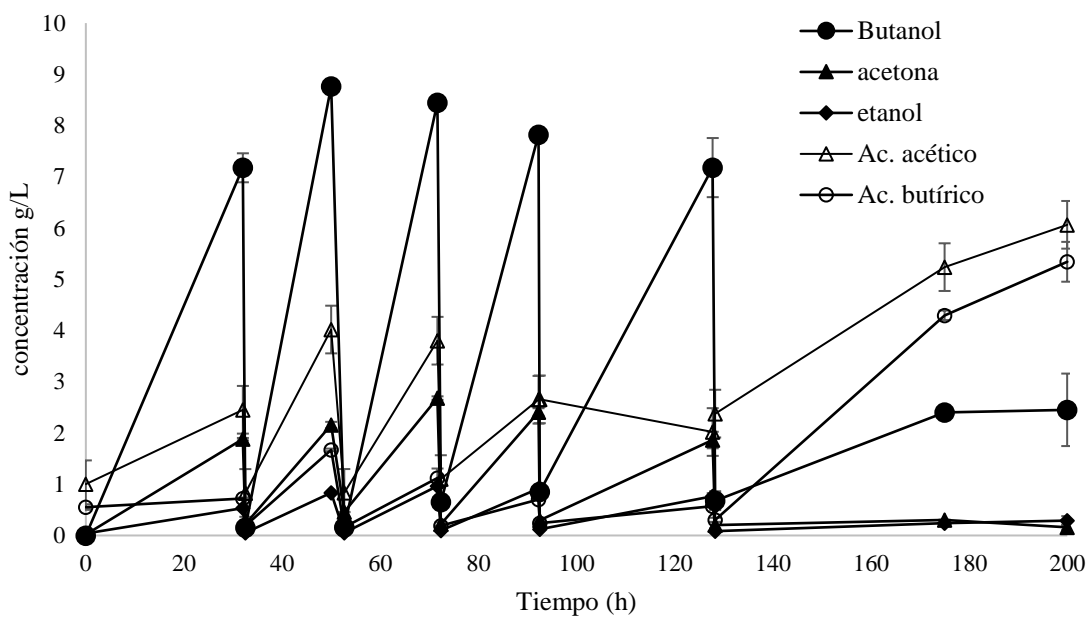


Figura 16. Cinética de ácidos y solventes determinados por CG, producidos por *C. acetobutylicum* en cultivo semicontinuo, cosechando el 88% del volumen de caldo de cultivo

De acuerdo a los resultados obtenidos por cromatografía de gases la concentración inicial de butanol en los subcultivos estuvo entre 0.76- 1 g/L, para de etanol estuvieron entre 0.53- 0.96 g/L, para ácido acético entre 2-4 g/L, para ácido butírico 0.57- 1.6 g/L y finalmente para acetona 1.8- 2.6 g/L. Las concentraciones mayores de butanol fueron de 8.6 y 8.4 g/L en segundo y tercer subcultivo, ligeramente más alto a lo obtenido por MAM. También se puede observar al final de la fermentación después de las 150 horas que el consumo de glucosa disminuyó y hubo una acumulación de ácidos acético y butírico, 6.1 g/L y 5.3 g/L respectivamente y por lo tanto una baja producción de butanol y baja productividad, probablemente se debe al tiempo que tenían las células conservadas (No se ha evaluado las estabilidades a corto y largo plazo del microorganismo). Ballongue et al., 1987, reportaron que concentraciones de ácidos de alrededor de los 5 g/L son tóxicas para *C. acetobutylicum*.

En la tabla 12 se observan los resultados de productividad, cantidad de alcoholes por MAM y los rendimientos, para cada subcultivo al cosechar el 88%.

Tabla 12. Valores en cada subcultivo cuando se cosecha el 88% del volumen de caldo de cultivo.

No. de Subcultivo	Alcoholes (g/L)	Productividad (g/Lh)	Y P/S
1	8.5	0.266	0.166
2	6.6	0.367	0.139
3	7.2	0.332	0.143
4	8.7	0.423	0.179
5	8.4	0.235	0.182
6	2.16	0.046	0.060

*Los valores presentados en la tabla se basan en la determinación de alcoholes por MAM.

En la figura 17 observa una comparación de las productividades obtenidas con cada porcentaje de cosecha en los cultivos semicontinuos.

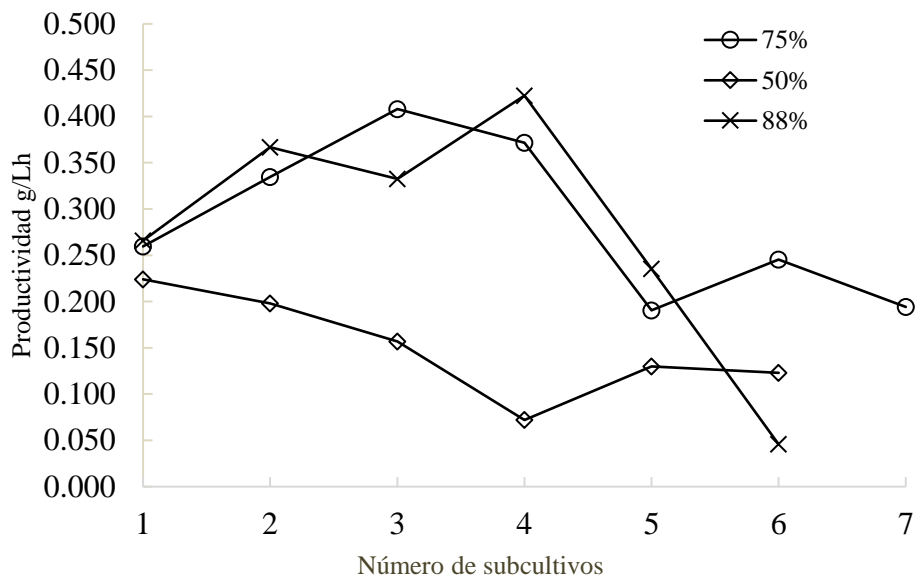


Figura 17. Productividades de los subcultivos para los diferentes volúmenes de cosecha evaluados en cultivo semicontinuo para la producción de butanol por *Clostridium acetobutylicum*.

Las productividades más bajas que se obtuvieron al cosechar el 50% del caldo de cultivo y cuando se cosecharon el 88% y 75% del caldo de cultivo se obtuvieron las más altas, en ambos casos se observó una caída en la productividad en el tercer subcultivo, sin embargo, al cosechar el 75%, en el quinto subcultivo se mantuvo estable durante dos subcultivos más. Con el 88% en el sexto subcultivo se cayó la productividad hasta 0.046 g/Lh, hubo una baja producción de alcoholes por la acumulación de ácidos y se detuvo el consumo de sustrato. Por lo que se considera recomendable cosechar el 88% del volumen de cultivo para obtener productividades mayores solo durante 3 subcultivos, además del lote normal.

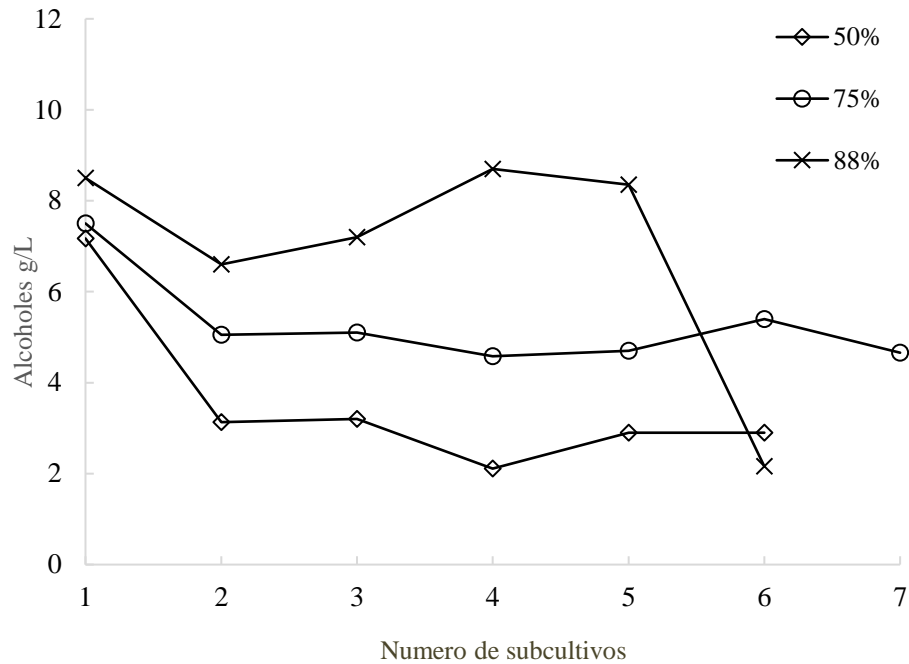


Figura 18. Producción de alcoholes totales en los subcultivos para los diferentes volúmenes de cosecha evaluados en cultivo semicontinuo tipo Draw- fill utilizando *C. acetobutylicum*.

En la figura 18 se muestran las diferentes concentraciones de alcoholes totales para cada uno de los subcultivos para los tres volúmenes de cosecha evaluados, en la cual se observa que cuando se cosecho el 88% del caldo de cultivo se obtuvieron los valores más altos en la concentración de alcoholes totales (8.7 g/L) y en promedio 7.9 ± 0.9 g/L para 4 subcultivos, sin embargo, al cosechar el 75% del caldo de cultivo se obtuvo en promedio por subcultivo 5.28 ± 1.0 g/L de alcoholes totales para 7 y si se compararan éstos resultados cuando se cosecho el 50% se obtuvo una concentración en promedio de 3.6 ± 1.8 g/L de alcoholes totales para 6 subcultivos, lo cual es menor que las anteriores pero también la concentración inicial de sustrato fue menor.

El objetivo de elegir un cultivo semicontinuo tipo draw-fill fue buscar un incremento en la productividad en comparación con un cultivo convencional en lote, por lo que de acuerdo al resultado obtenido desde el punto de vista de productividad cosechar el 88%

y 75% del caldo de cultivo es una mejor opción, pero solo para 3 subcultivos. Además, cuando se cosechó el 50% del caldo de cultivo la productividad y producción disminuyó de forma considerable con respecto al lote normal.

En la figura 19 se presentan los rendimientos de producto sobre la concentración de sustrato consumido, un promedio de los rendimientos en los subcultivos.

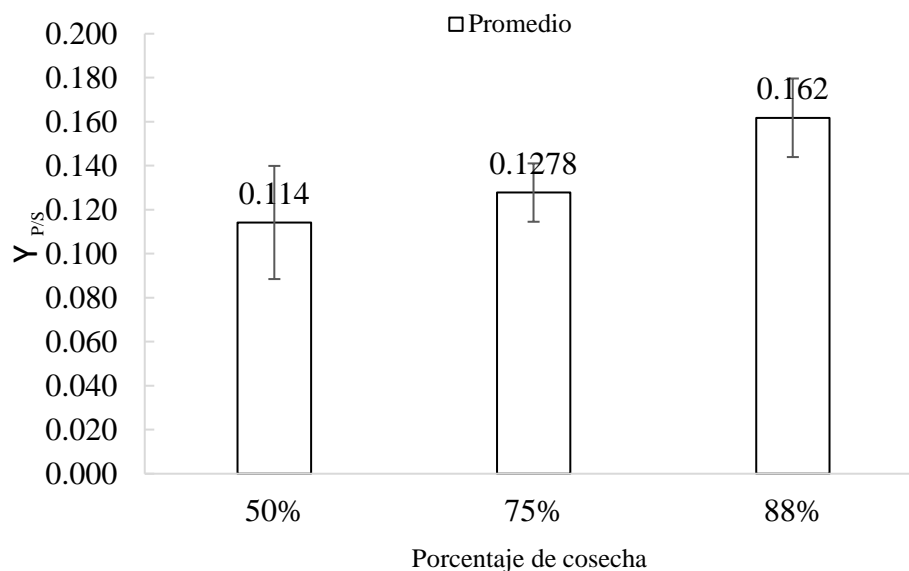


Figura 19. Comparación de los rendimientos promedios entre los subcultivos para los diferentes volúmenes de cosecha.

Se observa que los mayores rendimientos se obtuvieron al cosechar el 88% del caldo de cultivo, en tanto que el rendimiento promedio al cosechar el 50% y el 75% fueron de 0.114 g/g y 0.128 g/g, respectivamente.

Al comparar los resultados obtenidos en la segunda etapa del proyecto se encontró que las productividades de butanol reportadas para los lotes repetidos del trabajo de Jiang y colaboradores (Wenyan Jiang et al., 2014) oscilan entre 0.2-0.38 g/Lh por 19 lotes para una cepa mutante que no esporula, *C. acetobutylicum* JB200, con producción de butanol de 16.2-18.5 g/L, teniendo un rendimiento de butanol sobre sustrato de 0.15-0.22 g/g, utilizando como sustrato. En éste trabajo se obtuvieron productividades

mayores (de 0.26- 0.423 g/Lh) al cosechar el 88% del caldo de cultivo, pero un menor número de sub-cultivos.

En un estudio realizado por Dolejš et al., 2014, donde se comparan diferentes modalidades de cultivo: lote, continuo y lote repetido y lote repetido con fed- batch, para la producción de butanol utilizando células inmovilizadas de *C. acetobutylicum* DSM 1731. Para la modalidad de lote repetido la productividad, producción y rendimiento de butanol fueron: 0.58 g/Lh, 2.23 g/L y 0.13 g/g, respectivamente. Estos resultados se aumentaron al combinar lote repetido con fed-batch, lo cual se reporta por 3 subcultivos obteniendo hasta 9.12 g/L de butanol y una productividad butanol de 1.21 g/Lh. En éste trabajo, se obtiene una mayor producción de butanol en cada subcultivo y comparando con los 3 volúmenes de cosecha evaluados, se tiene una mayor variación de las productividades en cada subcultivo en éste trabajo, ya que son células libres, en el trabajo de Dolejš, obtienen una mayor productividad al combinar con fed-batch, pero con células inmovilizadas, utilizaron glucosa como sustrato teniendo rendimientos de butanol de 0.13-0.15 g/g y en esté trabajo obtuvimos rendimientos en promedio más altos 0.16 g/g.

Comparando los resultados obtenidos en éste trabajo con lo reportado por Setlhaku et al., 2012, en el que se realizan fermentaciones en dos etapas, en la primera se utiliza un cultivo continuo y en la segunda un cultivo en lote repetido combinado con fed-batch, mantienen el pH en 4.5, utilizan *C. acetobutylicum* 824, obtienen una productividad de butanol de 0.92 g/Lh y una producción de 12 g/L y casi 20 g/L de solventes totales con una productividad de 1.47 g/Lh. Lo cual es mucho mayor que lo que se obtuvo en éste trabajo (0.26- 0.423 g/Lh).

En la tabla 13 se pueden resumir y comparar algunos trabajos que aparecen en la literatura

Tabla 13. Tabla comparativa de producción de butanol, productividad de butanol, tipo de cultivo y microorganismos utilizados.

Microorganismo	Sustrato	Tipo de Cultivo	Butanol g/L	Productividad de butanol g/Lh	pH	Referencia
<i>C. acetobutylicum</i> 824	Glucosa	Continuo: dos etapas	9.4	0.38	4.5	Mpho Setlhaku, 2012
<i>C. acetobutylicum</i> 824	Glucosa	Continuo, lote repetido con alimentación	12	0.92	4.5	Mpho Setlhaku, 2012
<i>C. acetobutylicum</i> JB200	Glucosa	Lote, células libres	21.2	0.43	< 5.1	Jiang 2014
<i>C. acetobutylicum</i> JB200	Sacarosa	Lote repetido, células inmovilizadas FBB	16.2-18.5	0.2-0.38	< 5.1	Jiang, 2014
<i>C. acetobutylicum</i> JB200	Jugo de caña	Lote repetido células inmovilizadas FBB	16.6	0.33	< 5.1	Jiang, 2014
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1731	Glucosa	Lote, células libres	2.66	0.1	5	Igor Dolejs 2014
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1731	Glucosa	Lote repetido células inmovilizadas	1.86 + 0.24	0.57 ± 0.05	5	Igor Dolejs 2014
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1731	Glucosa	Continuo células libres	3.03+ 0.48	0.33 ± 0.055	5	Igor Dolejs 2014
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1731	Glucosa	Continuo células inmovilizadas	7.8 ± 0.95	0.42 ± 0.05	5	Igor Dolejs 2014
<i>C. acetobutylicum</i> 824	Glucosa	Lote	9.47	0.34	4.5	Este trabajo
<i>C. acetobutylicum</i> 824	Glucosa	Semicontinuo: Draw-fill, lote repetido	6.6-8.7	0.26-0.423	4.5	Este trabajo

De forma general en literatura se encuentran resultados ligeramente más altos que los que se obtienen en éste trabajo, sin embargo, estos se obtienen al trabajar con células inmovilizadas y en combinación con otro tipo de cultivo, el fed-batch. No hay un trabajo

donde se evalúen los diferentes volúmenes de cosecha para células libres. Se podría realizar una evaluación del sustrato inicial combinado con las diferentes cosechas, para mejorar los resultados obtenidos.

Comparando los resultados con el lote normal, solo en el caso de algunos subcultivos al cosechar el 88% del volumen de cultivo se logra mantener o incrementar ligeramente la producción de butanol, del mismo modo sucede con la productividad.

11. CONCLUSIONES

- El control de pH siguiendo la estrategia 2, resulto ser la mejor estrategia para aumentar el rendimiento y la producción del butanol (9.47 g/L), alcanzándose valores dentro del rango reportados en literatura para el cultivo por lote y una cepa parental (Concentración máxima 12 g/L de butanol)
- La adaptación y validación del método de microdifusión (MAM) para determinar butanol, nos permitió analizar un gran número de muestras de forma simultánea en un tiempo de 90 minutos, en los cultivos en lote y los semicontinuos. Este método fue semicuantitativo, permitiendo cuantificar el butanol de forma indirecta. No hubo diferencia significativa con el método de determinación de alcoholes por Cromatografía de gases.
- Con el cultivo semicontinuo (lote repetido ó tipo Draw-fill) se logró incrementar la productividad de butanol por *C. acetobutylicum*, bajo las condiciones de cultivo establecidas para un cultivo por lote, cosechando 88% del caldo de cultivo resultó ser la mejor condición para mantener la producción de butanol y el cultivo fue viable durante 3 subcultivos.

12. PERSPECTIVAS

- Para trabajo futuro, es primordial en la conservación del microorganismo, ya que con la técnica tradicional (20 % de glicerol al 80% y mantener a -70°C), la viabilidad de las células se ve afectada con el tiempo.
- Se recomienda establecer y optimizar un nuevo sistema para crecimiento de inóculo.
- Implementar métodos de monitoreo en línea.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Afschar, A.S., Biebl, H., Schaller, K., Schiigerl, K., 1985. Production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture with cell recycle 824, 1985.
- Bahl, H., Andersch, W., Braun, K., Gottschalk, G., 1982. Effect of pH and Butyrate Concentration on the Production of Acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* Grown in Continuous Culture A ~ " 101, 17–20.
- Ballongue, J., Masion, E., Amine, J., Petidmange, H., Gay, R., 1987. Inhibitor effect of products of metabolism on growth of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 568–573. doi:10.1007/BF00253034
- Bowles, L.K., Ellefson, W.L., 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1165–70.
- Buday, Z., Linden, J.C., Karim, M.N., 1990. Improved acetone-butanol fermentation analysis using subambient HPLC column temperature 12, 24–27.
- Cai, D., Zhang, T., Zheng, J., Chang, Z., Wang, Z., Qin, P., Tan, T., 2013. Biobutanol from sweet sorghum bagasse hydrolysate by a hybrid pervaporation process. *Bioresour. Technol.* 145, 97–102. doi:10.1016/j.biortech.2013.02.094
- Cho, D.H., Shin, S.-J., Kim, Y.H., 2012. Effects of acetic and formic acid on ABE production by *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17, 270–275. doi:10.1007/s12257-011-0498-4
- Conway, B.E.J., Malley, E.O., 1942. Microdiffusion Methods. Ammonia and Urea Using Buffered Absorbents (Revised Methods for Ranges Greater than 10 μ g. N) 36, 655–661.
- Dolejš, I., Krasňan, V., Stloukal, R., Rosenberg, M., Rebroš, M., 2014. Butanol production by immobilised *Clostridium acetobutylicum* in repeated batch, fed-batch, and continuous modes of fermentation. *Bioresour. Technol.* 169, 723–730. doi:10.1016/j.biortech.2014.07.039
- Du, T.-F., He, A.-Y., Wu, H., Chen, J.-N., Kong, X.-P., Liu, J.-L., Jiang, M., Ouyang, P.-K., 2013. Butanol production from acid hydrolyzed corn fiber with *Clostridium beijerinckii* mutant. *Bioresour. Technol.* 135, 254–61. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.033
- Dürre, P., 2008. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 353–62. doi:10.1196/annals.1419.009
- Ehrlich, D., Pirchl, M., Humpel, C., 2012. Effects of long-term moderate ethanol and cholesterol on cognition, cholinergic neurons, inflammation, and vascular impairment in rats. *Neuroscience* 205, 154–166. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.12.054
- Ezeji, T., Qureshi, N., Blaschek, H.P., 2007. Butanol Production From Agricultural Residues : Impact of Degradation Products on *Clostridium beijerinckii* Growth and Butanol Fermentation 97, 1460–1469. doi:10.1002/bit
- Ezeji, T.C., Karcher, P.M., Qureshi, N., Blaschek, H.P., 2005. Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from *Clostridium beijerinckii* fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27, 207–14. doi:10.1007/s00449-005-0403-7
- George, H.A. and C.J.S., 1983. ACID CONDITIONS ARE NOT OBLIGATORY FOR ONSET OF BUTANOL FORMATION *CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII*.pdf. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Gottwald, M., Gottschalk, G., 1985. on the shift from acid to solvent formation 42–46.
- Groot, W.J., Lans, R.G.J.M. Van Der, 1989. *Applied Microbiology Biotechnology* © 305–308.
- Gu, Y., Hu, S., Chen, J., Shao, L., He, H., Yang, Y., Yang, S., Jiang, W., 2009. Ammonium acetate

- enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1225–32. doi:10.1007/s10295-009-0604-1
- Holt, R. a, Stephens, G.M., Morris, J.G., 1984. Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1166–70.
- Huang, L., Forsberg, C.W., Gibbins, L.N., 1986. Influence of External pH and Fermentation Products on *Clostridium acetobutylicum* Intracellular pH and Cellular Distribution of Fermentation Products. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1230–4.
- Hüsemann, M.H., Papoutsakis, E.T., 1988. Solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum* fermentations related to carboxylic acid and proton concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 843–52. doi:10.1002/bit.260320702
- Izák, P., Schwarz, K., Ruth, W., Bahl, H., Kragl, U., 2008. Increased productivity of *Clostridium acetobutylicum* fermentation of acetone, butanol, and ethanol by pervaporation through supported ionic liquid membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 597–602. doi:10.1007/s00253-008-1354-0
- Jang, Y.-S., Lee, J.Y., Lee, J., Park, J.H., Im, J.A., Eom, M.-H., Lee, J., Lee, S.-H., Song, H., Cho, J.-H., Seung, D.Y., Lee, S.Y., 2012. Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*. *MBio.* doi:10.1128/mBio.00314-12
- Jiang, M., Chen, J., He, A., Wu, H., Kong, X., Liu, J., Yin, C., Chen, W., Chen, P., 2014. Enhanced acetone / butanol / ethanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH control strategy. *Process Biochem.* 49, 1238–1244. doi:10.1016/j.procbio.2014.04.017
- Jiang, W., Wen, Z., Wu, M., Li, H., Yang, J., Lin, J., Lin, Y., Yang, L., Cen, P., 2014. Chinese Journal of Chemical Engineering The Effect of pH Control on Acetone – Butanol – Ethanol Fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 with Xylose and D -Glucose and D -Xylose Mixture ☆. *CJCHE* 22, 937–942. doi:10.1016/j.cjche.2014.06.003
- Jiang, W., Zhao, J., Wang, Z., Yang, S.T., 2014. Stable high-titer n-butanol production from sucrose and sugarcane juice by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in repeated batch fermentations. *Bioresour. Technol.* 163, 172–179. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.047
- Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C.F., Ji, J., 2011. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 4080–4106. doi:10.1016/j.rser.2011.06.001
- Jones, D.T., Woods, D.R., 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 50, 484–524.
- Lai, M., Traxler, R.W., 1994. A coupled two-stage continuous fermentation for solvent production by *Clostridium acetobutylicum* 16, 0–4.
- Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J., Jung, K.S., 2008. Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 209–28. doi:10.1002/bit.22003
- Li, S.-Y., Srivastava, R., Suib, S.L., Li, Y., Parnas, R.S., 2011. Performance of batch, fed-batch, and continuous A-B-E fermentation with pH-control. *Bioresour. Technol.* 102, 4241–50. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.078
- Lin, X., Fan, J., Wen, Q., Li, R., Jin, X., Wu, J., Qian, W., Liu, D., Xie, J., Bai, J., Ying, H., 2014. Optimization and Validation of a GC – FID Method for the Determination of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation Products 264–270.
- Lin, Y.L., Blaschek, H.P., 1983. Butanol Production by a Butanol-Tolerant Strain of *Clostridium acetobutylicum* in Extruded Corn Broth. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 966–73.
- Long, S., Jones, D., Woods, D., 1984. Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20, 256–261. doi:10.1007/BF00250635
- Maddox, I.S., Steiner, E., Hirsch, S., Wessner, S., Gutierrez, N. a, Gapes, J.R., Schuster, K.C., 2000.

- The cause of “acid-crash” and “acidogenic fermentations” during the batch acetone-butanol-ethanol (ABE-) fermentation process. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*
- Monot, F., Engasser, J., Petitdemange, H., Biologique, D.C., Nancy, U. De, Nancy, F.-V., 1984. Short communication Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum* 1984.
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V, Kira, S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H.M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., Sequencing, G.T.C., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Sabathe, F., Soucaille, P., Daly, M.J., Bennett, G.N., Koonin, E. V, Smith, D.R., 2001. Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum* Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. doi:10.1128/JB.183.16.4823
- Noriega-medrano, L.J., Vega-estrada, J., Ortega-lópez, J., Ruiz-medrano, R., Cristiani-urbina, E., Montes-horcasitas, C., 2016. Alternative non-chromatographic method for alcohols determination in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *J. Microbiol. Methods* 126, 48–53. doi:10.1016/j.mimet.2016.05.001
- Qureshi, N., Ezeji, T.C., Ebener, J., Dien, B.S., Cotta, M. a, Blaschek, H.P., 2008a. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresour. Technol.* 99, 5915–22. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.087
- Qureshi, N., Maddox, I.S., 2005. Reduction in Butanol Inhibition by Perstraction. *Food Bioprod. Process.* 83, 43–52. doi:10.1205/fbp.04163
- Qureshi, N., Saha, B.C., Hector, R.E., Hughes, S.R., Cotta, M. a., 2008b. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I—Batch fermentation. *Biomass and Bioenergy* 32, 168–175. doi:10.1016/j.biombioe.2007.07.004
- Ranjan, A., Mayank, R., Moholkar, V.S., 2013. Development of semi-defined rice straw-based medium for butanol production and its kinetic study. *3 Biotech* 3, 353–364. doi:10.1007/s13205-013-0120-x
- Ren, C., Gu, Y., Wu, Y., Zhang, W., Yang, C., Yang, S., Jiang, W., 2012. Pleiotropic functions of catabolite control protein CcpA in Butanol-producing *Clostridium acetobutylicum*. *BMC Genomics* 13, 349. doi:10.1186/1471-2164-13-349
- Roos, J.W., McLaughlin, J.K., Papoutsakis, E.T., 1985. The effect of pH on nitrogen supply, cell lysis, and solvent production in fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 681–94. doi:10.1002/bit.260270518
- Setlhaku, M., Brunberg, S., Villa, E.D.A., Wichmann, R., 2012. Improvement in the bioreactor specific productivity by coupling continuous reactor with repeated fed-batch reactor for acetone-butanol-ethanol production. *J. Biotechnol.* 161, 147–52. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.04.004
- Sillers, R., Al-Hinai, M.A., Papoutsakis, E.T., 2009. Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 38–49. doi:10.1002/bit.22058
- Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., Yoshino, S., 2004. High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed-batch culture with pH-Stat continuous butyric acid and glucose feeding method. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 263–8. doi:10.1016/S1389-1723(04)00279-8
- Tsai, T., Lo, Y., Chang, J., 2014. Effect of medium composition and pH control strategies on butanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum*. *Energy Procedia* 61, 1691–1694. doi:10.1016/j.egypro.2014.12.193
- Tsuey, L.S., Arif, A. Bin, Mohamad, R., Rahim, R.A., 2006. Improvements of GC and HPLC analyses in solvent (acetone-butanol-ethanol) fermentation by *Clostridium saccharobutylicum* using a mixture of starch and glycerol as carbon source. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 11, 293–298.

doi:10.1007/BF03026243

- Wang, Y., Blaschek, H.P., 2011. Optimization of butanol production from tropical maize stalk juice by fermentation with *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Bioresour. Technol.* 102, 9985–90. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.038
- Wu, H., Wang, C., Chen, P., He, A., Xing, F., Kong, X., Jiang, M., 2017. ScienceDirect Effects of pH and ferrous iron on the coproduction of butanol and hydrogen by *Clostridium beijerinckii*. *Int. J. Hydrogen Energy* 1–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.02.094
- Wu, Y.-D., Xue, C., Chen, L.-J., Bai, F.-W., 2013. Effect of zinc supplementation on acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *J. Biotechnol.* 165, 18–21. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.02.009
- Yang, X., Tu, M., Xie, R., Adhikari, S., Tong, Z., 2013. A comparison of three pH control methods for revealing effects of undissociated butyric acid on specific butanol production rate in batch fermentation of *Clostridium acetobutylicum*. *AMB Express* 3, 3. doi:10.1186/2191-0855-3-3
- Zhang, W.L., Liu, Z.Y., Liu, Z., Li, F.L., 2012. Butanol production from corncob residue using *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 240–6. doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03283.x
- Zhu, L., Dong, H., Zhang, Y., Li, Y., 2011. Engineering the robustness of *Clostridium acetobutylicum* by introducing glutathione biosynthetic capability. *Metab. Eng.* 13, 426–34. doi:10.1016/j.ymben.2011.01.009

14. ANEXOS

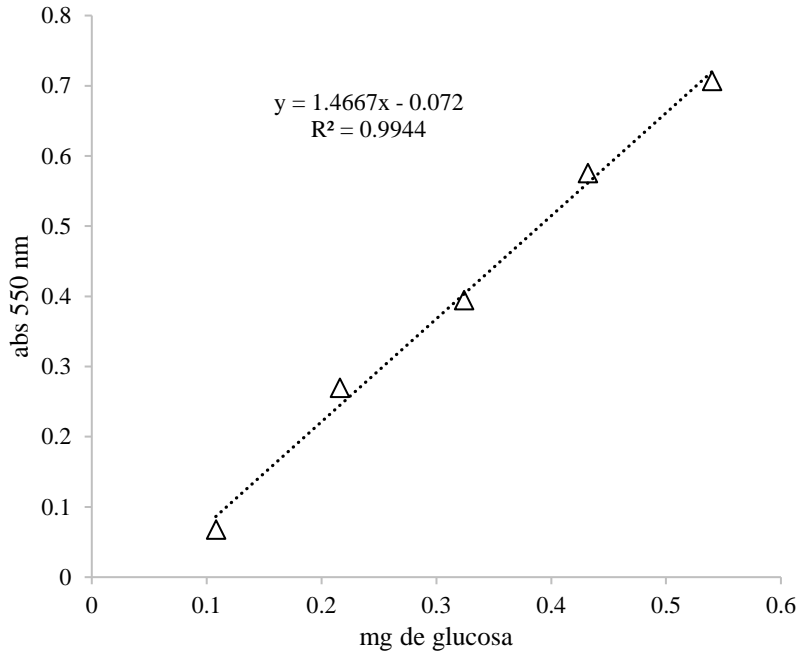


Figura 20. Curva tipo de glucosa con una solución patrón de 5 mM

Sol. de glucosa μL	mg de glucosa	Agua μL	Abs 550 nm
0	0	1000	0
20	0.108	980	0.068
40	0.216	960	0.27
60	0.324	940	0.395
80	0.432	920	0.576
100	0.54	900	0.707

Nota: La curva tipo de glucosa se realiza cada vez que se prepara el lote nuevo de reactivo DNS (Ácido dinitrisalicílico).

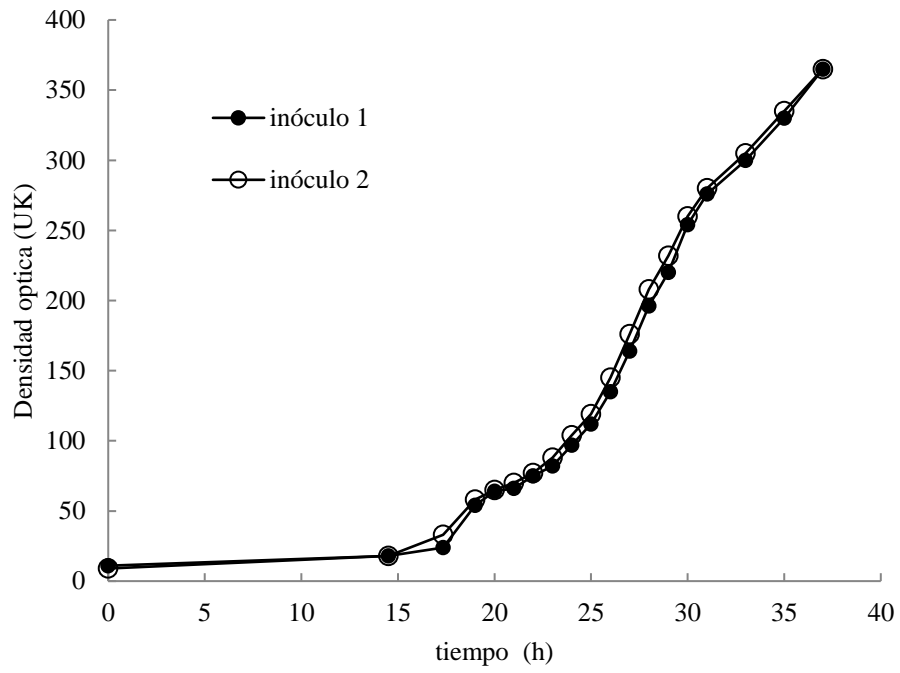


Figura 21. Cinética de inóculo con 20 mL de medio Gu modificado

Nota: Al conservar la cepa se tiene que estandarizar la cinética para el inóculo.

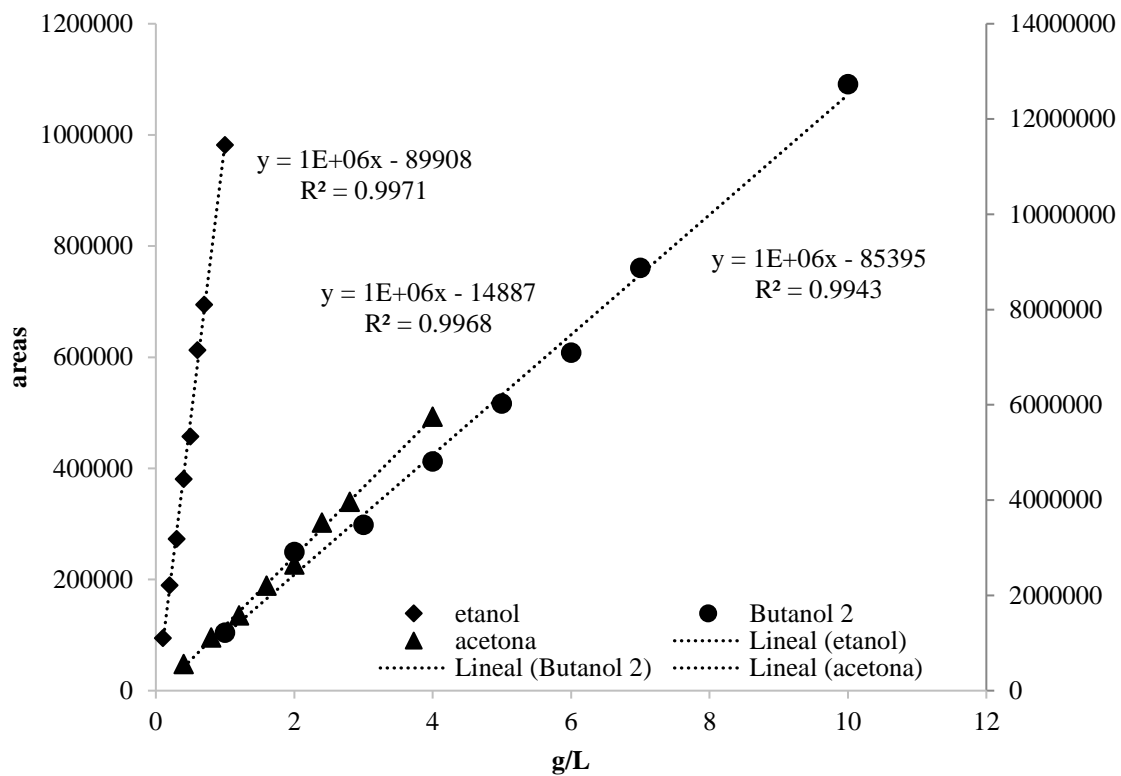


Figura 22. Curva tipo de solventes producidos en la fermentación ABE, determinados por Cromatografía de gases

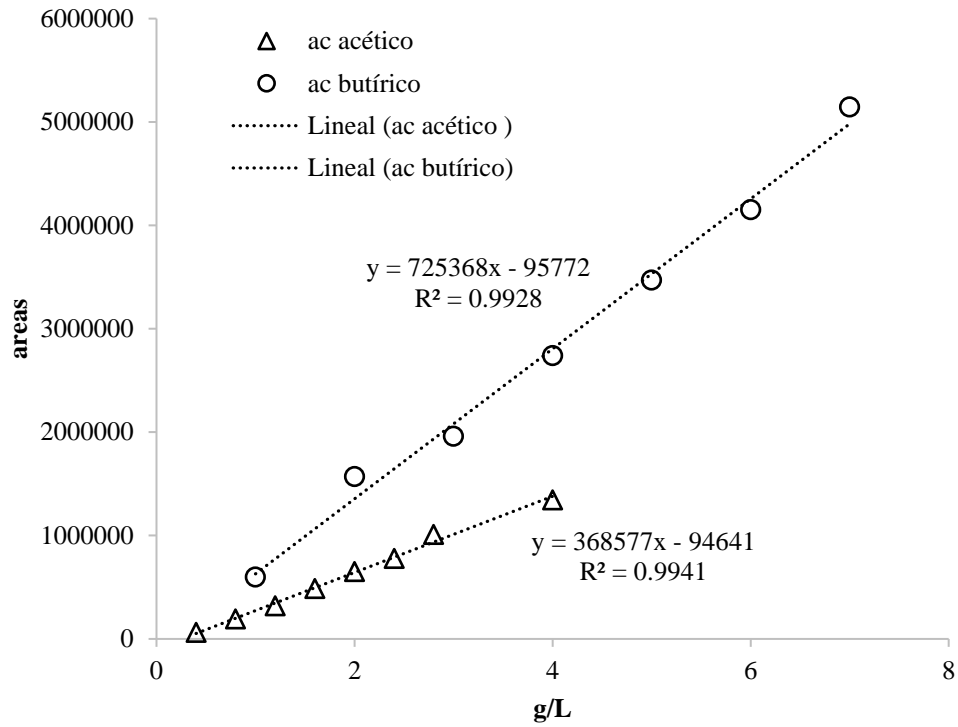


Figura 23. Ejemplo de Curva tipo de ácidos orgánicos que se producen en la fermentación ABE determinados por Cromatografía de gases

Nota: las áreas en la curva de calibración pueden variar dependiendo del equipo cromatográfico utilizado.