



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TESIS

**PRODUCCIÓN DE BIOBUTANOL A PARTIR DE SUERO DE
QUESERÍA USANDO UNA CEPA MUTANTE DE *Clostridium
acetobutylicum***

PRESENTA

Victoria Rosalía Durán Padilla

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

Dr. Juan Jáuregui Rincón

Dr. Gustavo Dávila Vázquez

COMITÉ TUTORAL

Dra. Norma Angélica Chávez Vela

Aguascalientes, Ags. Abril de 2015.

**VICTORIA ROSALIA DURAN PADILLA
ALUMNA DEL DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.**

Estimada alumna Victoria:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“PRODUCCIÓN DE BIOBUTANOL A PARTIR DE SUERO DE QUESERÍA USANDO UNA CEPA MUTANTE DE *Clostridium acetobutylicum*”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 30 de marzo de 2015
“SE LUMEN PROFERRE”
EL DECANO


M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.
JJRG,yscd



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Viernes 27 de marzo de 2015

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio de este conducto le notifico que la alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas IBQ VICTORIA ROSALIA DURAN PADILLA, está en posibilidad de presentar el examen de grado, ya que ha cubierto los objetivos y las metas del proyecto de tesis de Doctorado **“PRODUCCION DE BIOBUTANOL A PARTIR DE SUERO DE QUESERIA USANDO UNA CEPA MUTANTE DE Clostridium acetobutylicum”**.

Además se ha revisado el escrito de la tesis y se esta de acuerdo con el contenido del mismo ya que atendió a las sugerencias hechas por el comité tutorial.

Sin más por el momento, aprovecho para enviarle un cordial saludo y quedo a sus órdenes para cualquier duda y/o aclaración.

ATENTAMENTE

Dr. Juan Jáuregui Rincón

Co-tutor



Viernes 27 de marzo de 2015

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS
PRESENTE

Por medio de este conducto le notifico que la alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas IBQ VICTORIA ROSALIA DURAN PADILLA, está en posibilidad de presentar el examen de grado, ya que ha cubierto los objetivos y las metas del proyecto de tesis de Doctorado **"PRODUCCION DE BIOBUTANOL A PARTIR DE SUERO DE QUESERIA USANDO UNA CEPA MUTANTE DE *Clostridium acetobutylicum*"**.

Además se ha revisado el escrito de la tesis y se esta de acuerdo con el contenido del mismo ya que atendió a las sugerencias hechas por el comité tutorial.

Sin más por el momento, aprovecho para enviarle un cordial saludo y quedo a sus órdenes para cualquier duda y/o aclaración.

ATENTAMENTE

Dr. Gustavo Dávila Vázquez

Cotutor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Viernes 27 de Marzo de 2015

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

Por medio de este conducto le notifico que la alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas IBQ. VICTORIA ROSALÍA DURÁN PADILLA, está en posibilidad de presentar el examen de grado, ya que ha cubiertos los objetivos y las metas del proyecto de tesis de Doctorado **“PRODUCCIÓN DE BIOBUTANOL A PARTIR DE SUERO DE QUESERÍA USANDO UNA CEPA MUTANTE DE *Clostridium acetobutylicum*”**.

Además se ha revisado el escrito de la tesis y se esta de acuerdo con el contenido del mismo ya que atendió a las sugerencias hechas por el comité tutorial.

Sin más por el momento, aprovecho para enviarle un cordial saludo y quedo a sus órdenes para cualquier duda y/o aclaración

ATENTAMENTE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Norma Chávez Vela'.

DRA. NORMA ANGÉLICA CHÁVEZ VELA
Profesor y Asesor



DICTAMEN DE REVISIÓN DE LA TESIS / TRABAJO PRÁCTICO

DATOS DEL ESTUDIANTE	
NOMBRE: Victoria Rosalía Durán Padilla	ID (No. de Registro): 46574
PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS	ÁREA: BIOPROCESOS
TUTOR/TUORES: DR. JUAN JÁUREGUI RINCÓN DR. GUSTAVO DÁVILA VÁZQUEZ DRA. NORMA ANGÉLICA CHÁVEZ VELA	
TESIS (X)	TRABAJO PRÁCTICO ()
OBJETIVO: Desarrollar un proceso de producción de biobutanol, con mayor productividad que la que se obtiene empleando cepas silvestres, utilizando una cepa mutante de <i>C. acetobutylicum</i> y, como sustrato, suero de quesería.	
DICTAMEN	
CUMPLE CON CRÉDITOS ACADÉMICOS:	(X)
CONGRUENCIAS CON LAS LGAC DEL PROGRAMA:	(X)
CONGRUENCIA CON LOS CUERPOS ACADÉMICOS:	(X)
CUMPLE CON LAS NORMAS OPERATIVAS:	(X)
CONINCIDENCIA DEL OBJETIVO CON EL REGISTRO:	(X)

Aguascalientes, Ags. a 27 de Marzo de 2015

FIRMAS


CONSEJERO ACADÉMICO DEL ÁREA


SECRETARIO TÉCNICO DEL POSGRADO


SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Código: FO-040200-23
Revisión: 00
Emisión: 21/02/11

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, asesores y evaluadores por el apoyo recibido durante el desarrollo del trabajo de tesis.

A los profesores, investigadores, técnicos de laboratorio y compañeros por sus aportaciones a este trabajo, en especial al M. en C. Héctor Araiza Velázquez por todo el apoyo brindado.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM), en especial al M.B. Raunel Tinoco Valencia y al Dr. José Leobardo Serrano Carreón, por el apoyo brindado para el análisis cromatográfico de los productos de fermentación.

A la posta zotécnica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, en especial al taller de productos lácteos y al maestro Carlos Bacco por proporcionar el suero de quesería empleando durante el desarrollo del trabajo de tesis.

A todos aquellos que de forma directa o indirecta proporcionaron su ayuda para el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi familia y amigos que siempre me han apoyado.



ÍNDICE GENERAL

Índice general	1
Índice de tablas	7
Índice de figuras	9
Resumen	13
Abstract	14
Introducción	15
1. Antecedentes	17
1.1 El mundo y el consumo de energía	17
1.2 Reservas de combustibles fósiles	20
1.3 Fuentes de energía renovable	22
1.4 Biocombustibles	24
1.4.1 Clasificación de los biocombustibles	25
1.4.2 Panorama de los biocombustibles en México	26
1.4.3 El butanol como combustible	28
1.4.3.1 ¿Qué es el butanol?	28
1.4.3.2 Historia de la producción del butanol	29
1.4.3.3 Propiedades del butanol	31
1.4.3.3.1 Propiedades fisicoquímicas	31
1.4.3.3.1.1 Punto de inflamación	31
1.4.3.3.1.2 Presión de vapor	33
1.4.3.3.1.3 Solubilidad en agua e Higroscopicidad	33
1.4.3.3.2 Propiedades como carburante	34
1.4.3.3.2.1 Contenido energético	34
1.4.3.3.2.2 Octanaje	34
1.4.3.3.2.3 Viscosidad cinemática	35
1.4.3.3.2.4 Proporción aire-combustible	35
1.4.3.4 Ventajas y desventajas del butanol como combustible	36
1.4.3.5 Situación mundial actual del butanol	37
1.4.3.5.1 Producción y consumo del butanol y sus	37

Isómeros	
1.4.3.5.2 Panorama general del proceso fermentativo	39
ABE para la producción de biobutanol:	
Tecnología existente y en desarrollo.	
1.4.3.5.3 Empresas productoras de biobutanol	41
1.4.3.5.3.1 Gevo	41
1.4.3.5.3.2 Cobalt Technologies	43
1.4.3.5.3.3 Butamax Advanced Biofuels	44
1.4.3.5.3.4 Green Biologics	46
1.4.3.5.3.5 Syntec Biofuels	48
1.4.3.5.3.6 Butalco	50
1.4.4 Producción microbiológica de butanol	51
1.4.4.1 Producción de butanol empleando <i>C. acetobutylicum</i>	80
1.4.4.1.1 Bioquímica de la fermentación con	80
<i>C. acetobutylicum</i>	
1.4.4.1.2 Cinética y regulación de la producción de	86
solventes con <i>C. acetobutylicum</i>	
1.4.4.1.2.1 Factores que afectan la	89
producción de solventes con	
<i>C. acetobutylicum</i>	
1.4.4.1.3 Formación de endoesporas y su interacción	93
con la solventogénesis	
1.4.4.2 Principales problemas y limitaciones de la	95
fermentación ABE	
1.4.4.3 Posibles soluciones a la problemática de la	96
fermentación ABE	
1.4.4.3.1 Selección del sustrato	97
1.4.4.3.2 Estrategias de cultivo	97
1.4.4.3.2.1 Cultivo por lote (batch)	99
1.4.4.3.2.2 Cultivo por lote alimentado	100
(semicontínuo)	
1.4.4.3.2.3 Cultivo continuo	101
1.4.4.3.2.4 Inmovilización celular	103

1.4.4.3.3 Recuperación del butanol producido	106
1.4.4.3.3.1 Selectividad de la recuperación	109
1.4.4.3.3.2 Requerimientos energéticos	110
1.4.4.3.3.3 Ejemplos de recuperación de productos aplicados a la fermentación ABE.	112
1.5 Suero de quesería como fuente de sustrato para la producción de biobutanol.	114
1.6 Estrategias moleculares y de proceso para la generación de mutantes bacterianas	115
1.6.1 Generación de mutantes por agentes físicos y químicos.	116
2.6.1.1 Mutágenos químicos	116
2.6.1.2 Mutágenos físicos	117
1.6.2 Generación de mutantes por métodos biológicos	118
1.6.2.1 Antecedentes de generación de mutantes para mejorar la producción de butanol con <i>Clostridium</i>	119
2. Justificación	122
3. Hipótesis	123
4. Objetivos	123
4.1 Objetivo general	123
4.2 Objetivos específicos	123
5. Materiales y métodos	124
5.1 Microorganismos	124
5.1.1 <i>Clostridium acetobutylicum</i> CDBB-B-797	124
5.1.1.1 Esporas liofilizadas (CDBB-B-797 (1))	124
5.1.1.1.1 Apertura de ampolleta y rehidratación	124
5.1.1.1.2 Reactivación de esporas	125
5.1.1.1.3 Mantenimiento de cepa bacteriana	125
5.1.1.2 Células vegetativas (CDBB-B-797 (2))	125
5.1.1.2.1 Identificación de la cepa por crecimiento en medio sólido	125
5.1.1.2.2 Mantenimiento de cepa bacteriana	126

5.1.2 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	126
5.1.2.1 Apertura de ampolleta y rehidratación de cepa	126
5.1.2.2 Identificación de la cepa por crecimiento en medio Sólido	127
5.1.2.3 Mantenimiento de cepa bacteriana	127
5.2 Medios de cultivo	128
5.2.1 Medio de cultivo de rehidratación	128
5.2.2 Medio de cultivo para <i>Clostridium acetobutylicum</i> (MPC)	128
5.2.2.1 MPC adicionado con butanol	129
5.2.3 Medio reforzado para clostridios modificado (RCM)	130
5.2.4 Agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja (defibrinada)	131
5.3 Medios de fermentación	131
5.3.1 Suero de quesería desproteínizado	131
5.3.1.1 Suero de quesería adicionado con hierro (Fe ⁺³)	132
5.3.1.2 Suero de quesería adicionado con hierro (Fe ⁺²)	132
5.3.1.3 Suero de quesería adicionado con extracto de Levadura	133
5.3.1.4 Suero de quesería fortificado	133
5.3.1.5 Suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y hierro.	134
5.3.2 Medios sintéticos simulando suero de quesería	135
5.3.2.1 Caldo lactosado	135
5.3.2.2 Caldo lactosado Napoli	135
5.3.2.3 Caldo lactosado Ennis	136
5.3.2.4 Caldo glucosado Ennis	137
5.4 Mutagénesis no dirigida de <i>C. acetobutylicum</i>	137
5.4.1 Mantenimiento de cepas bacterianas mutadas	138
5.5 Producción de butanol mediante fermentación ABE	138
5.5.1 Preparación de inóculos	138
5.5.2 Cultivo por lote	139
5.6 Métodos analíticos	139
5.6.1 Medición de pH	139
5.6.2 Determinación de la concentración celular (biomasa)	140

5.6.2.1 Densidad óptica	140
5.6.2.2 Peso seco	141
5.6.2.3 Correlación entre densidad óptica y peso seco	141
5.6.3 Concentración de azúcares por el método DNS	141
5.6.3.1 Preparación del reactivo DNS	141
5.6.3.2 Preparación de la curva patrón de azúcares reductores	142
5.6.3.3 Ensayo de azúcares reductores	143
5.6.4 Concentración de productos por cromatografía de gases	143
5.6.4.1 Preparación de las muestras	143
5.6.4.2 Análisis cualitativos	144
5.6.4.3 Análisis cuantitativos	145
5.6.4.3.1 Construcción de la curva patrón de Solventes y ácidos	146
5.7 Cálculos de velocidad específica de crecimiento, rendimiento y productividad	147
5.8 Análisis estadísticos	148
5.8.1 Anova	148
5.8.2 Pruebas de rangos múltiples	148
5.9 Determinación de la presencia del plásmido pSOL1 en <i>C. acetobutylicum</i>	148
6. Resultados	150
6.1 Estándares y curvas patrón	150
6.1.1 Correlación entre densidad óptica y peso seco (CDBB-B-797)	150
6.1.2 Correlación entre densidad óptica y peso seco (ATCC 824)	151
6.1.3 Curva patrón de azúcares reductores	152
6.1.4 Tiempos de retención de productos para análisis cualitativos por cromatografía de gases	153
6.1.5 Análisis cuantitativo de productos por cromatografía de gases	153
6.2 Producción de butanol con <i>C. acetobutylicum</i> CDBB-B-797 (1)	155
6.3 Producción de butanol con <i>C. acetobutylicum</i> CDBB-B-797 (2)	159
6.3.1 Identificación por crecimiento en medio sólido.	159
6.3.2 Fermentación en medios reportados en la literatura.	161

6.4 Producción de butanol con <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	169
6.4.1 Identificación por crecimiento en medio sólido	169
6.4.2 Fermentación en medios reportados en la literatura	171
6.4.3 Fermentación en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y hierro.	177
6.4.3.1 Comparación de la capacidad productiva de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 en suero de quesería suplementado con diversas fuentes de hierro	181
6.4.4 Generación y selección de cepas mutantes de ATCC 824	184
6.4.5 Fermentación por lote en suero de quesería y caldo lactosado suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO ₄ empleando ATCC 824 y su mutante seleccionada M3.	187
6.4.5.1 Comparación de la capacidad productiva de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 y su mutante seleccionada M3 empleando como sustrato caldo lactosado y suero de quesería suplementado.	191
7. Discusión	195
7.1 Suero de quesería como sustrato para la fermentación ABE	195
7.2 Generación de cepas mutantes por mutagénesis no dirigida	200
Conclusión	204
Glosario	205
Referencias bibliográficas	207
Anexos	217

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Propiedades de diversos combustibles	32
Tabla 2	Ventajas y desventajas del uso del butanol Vs. Gasolina y etanol.	36
Tabla 3	El butanol y sus isómeros: producción y usos	38
Tabla 4	Microorganismos y sustratos empleados en la fermentación ABE	52
Tabla 5	Ventajas y desventajas de diversas fuentes de carbono como sustrato para la fermentación ABE	98
Tabla 6	Ventajas y desventajas de los sistemas de cultivo	102
Tabla 7	Ventajas y desventajas de algunos métodos de inmovilización celular	105
Tabla 8	Operaciones de recuperación de butanol de soluciones acuosas	108
Tabla 9	Capacidad y selectividad estimadas para diferentes operaciones de recuperación de butanol	110
Tabla 10	Comparación de varios procesos integrados de recuperación de butanol.	111
Tabla 11	Concentración de estándares para cromatografía de gases	147
Tabla 12	Tiempos de retención de compuestos de interés. Análisis cualitativo	153
Tabla 13	Tiempos de retención de compuestos de interés. Análisis cuantitativo	154
Tabla 14	Concentraciones de productos de fermentación en caldos de cultivo reportado en la literatura empleando <i>C. acetobutylicum</i> CDBB-B-797 (2).	166
Tabla 15	Rendimientos y productividades para las fermentaciones por lote con <i>C. acetobutylicum</i> CDBB-B-797 (2) empleando medios de cultivo reportados en la literatura.	167
Tabla 16	Concentraciones de productos de fermentación en caldos de cultivo reportado en la literatura empleando <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824.	175
Tabla 17	Rendimientos y productividades para las fermentaciones por lote con <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 empleando medios de cultivo reportados en la literatura.	176

Tabla 18	Desempeño fermentativo de ATCC 824 en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y hierro a 168 h.	180
Tabla 19	ANOVA para solventes totales producidos (g/L) por fuente de hierro.	182
Tabla 20	Prueba de rangos múltiples para solventes totales producidos (g/L) por fuente de hierro.	182
Tabla 21	ANOVA para butanol producido (g/L) por fuente de hierro.	183
Tabla 22	Prueba de rangos múltiples para butanol producido (g/L) por fuente de hierro.	183
Tabla 23	Desempeño fermentativo de ATCC 824 y M3 en caldo lactosado y suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO ₄ a 168h.	190
Tabla 24	ANOVA para solventes totales producidos (g/L) por sustrato por cepa.	191
Tabla 25	Prueba de rangos múltiples para solventes totales producidos (g/L) por cepa.	192
Tabla 26	Prueba de rangos múltiples para solventes totales producidos (g/L) por sustrato.	192
Tabla 27	ANOVA para butanol producido (g/L) por sustrato por cepa.	193
Tabla 28	Prueba de rangos múltiples para butanol producido (g/L) por cepa.	194
Tabla 29	Prueba de rangos múltiples para butanol producido (g/L) por sustrato.	194

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Consumo de energía comercializada en el mundo 1990-2035	18
Figura 2	Uso de la energía comercializada en el mundo por tipo de combustible 1990-2035	19
Figura 3	Estructura de las reservas de fuentes fósiles probadas por área geográfica en 2001	21
Figura 4	Reservas probadas de petróleo por región geográfica al 1° de enero de 2010	21
Figura 5	Clasificación de los biocombustibles	26
Figura 6	Historia de la producción de biobutanol	29
Figura 7	Diagrama de flujo esquemático del proceso de producción ABE	40
Figura 8	Planta de producción de isobutanol Gevo	41
Figura 9	Proceso de producción de biobutanol empleado por Cobalt Technologies	44
Figura 10	Plantas piloto de producción de biobutanol de la empresa Green Biologics	46
Figura 11	Proceso termoquímico de conversión de biomasa en azúcares empleados por Syntec Biofuel	49
Figura 12	Proceso de producción de biobutanol empleando la tecnología de Butalco	50
Figura 13	Vías fermentativas de <i>C. acetobutylicum</i>	81
Figura 14	Rutas metabólicas básicas en <i>C. acetobutylicum</i>	87
Figura 15	Cinética de crecimiento microbiano	99
Figura 16	Clasificación de los métodos de inmovilización celular	104
Figura 17	Operación de captura de butanol en el contexto del proceso	107
Figura 18	Representación esquemática de un sistema general de fermentación y recuperación de producto	109
Figura 19	Diagrama esquemático de un proceso integrado de fermentación y recuperación de butanol por arrastre con gas	113
Figura 20	Gráfico DO Vs. Peso seco. Datos registrados para las fermentaciones efectuadas con la cepa silvestre CDBB-B-797 (n=3)	150

Figura 21	Gráfico DO Vs. Peso seco. Datos registrados para las fermentaciones efectuadas con la cepa silvestre ATCC 824 (n=3)	151
Figura 22	Gráfico. Curva patrón de concentración de azúcares reductores (lactosa)	152
Figura 23	Curva patrón de estándares para determinación de concentración de productos por cromatografía de gases.	154
Figura 24	Determinación de la presencia del plásmido pSOL1.	158
Figura 25	Crecimiento de <i>C. acetobutylicum</i> CDBB-B-797 (2) en MPC.	159
Figura 26	Crecimiento de <i>C. acetobutylicum</i> CDBB-B-797 (2) en RCM.	160
Figura 27	Crecimiento de <i>C. acetobutylicum</i> CDBB-B-797 (2) en agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja defibrinada.	160
Figura 28	Fermentación por lote en caldo glucosado Ennis, empleando CDBB-B-797. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	162
Figura 29	Fermentación por lote en caldo lactosado Ennis, empleando CDBB-B-797. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	162
Figura 30	Fermentación por lote en caldo lactosado Napoli, empleando CDBB-B-797. Gráfico pH, concentración de azúcares y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	163
Figura 31	Fermentación por lote en suero de quesería fortificado empleando CDBB-B-797. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	164
Figura 32	Fermentación por lote en suero de quesería adicionado con extracto de levadura empleando CDBB-B-797. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	165
Figura 33	Formación de endoesporas de <i>C. acetobutylicum</i> CDBB-B-797	166
Figura 34	Recepción y rehidratación de cepa bacteriana <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	169
Figura 35	Crecimiento de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 en agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja defibrinada.	170

Figura 36	Fotografías de microscopía simple de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 a 100X.	170
Figura 37	Fermentación por lote en caldo glucosado Ennis, empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	172
Figura 38	Fermentación por lote en caldo lactosado Ennis, empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	172
Figura 39	Fermentación por lote en caldo lactosado Napoli, empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	173
Figura 40	Fermentación por lote en suero de quesería fortificado empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	174
Figura 41	Fermentación por lote en suero de quesería adicionado con extracto de levadura empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	174
Figura 42	Productos obtenidos mediante fermentación por lote en caldo lactosado Napoli empleando la cepa silvestre ATCC 824 en anaerobiosis.	177
Figura 43	Fermentación por lote en suero de quesería suplementado con extracto de levadura y carbonato de calcio, sin fuente adicional de hierro empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	179
Figura 44	Fermentación por lote en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y 20 mg/L de hierro como FeSO_4 , empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	179
Figura 45	Fermentación por lote en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y 20 mg/L de hierro como FeCl_3 , empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación.	180

Figura 46	Medias e intervalos LSD 95.0% para la producción de solventes totales por cada una de las fuentes de hierro evaluadas.	183
Figura 47	Medias e intervalos LSD 95.0% para la producción de butanol por cada una de las fuentes de hierro evaluadas.	184
Figura 48	Crecimiento de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 en MPC sólido adicionado con diferentes concentraciones de butanol.	185
Figura 49	Fermentación por lote en caldo lactosado suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO ₄ empleando ATCC 824.	188
Figura 50	Fermentación por lote en caldo lactosado suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO ₄ empleando M3.	188
Figura 51	Fermentación por lote en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO ₄ empleando ATCC 824.	189
Figura 52	Fermentación por lote en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO ₄ empleando M3.	189
Figura 53	Interacción de los factores e intervalos LSD para producción de solventes totales empleando dos cepas y dos sustratos diferentes	193
Figura 54	Interacción de los factores e intervalos LSD para producción de butanol empleando dos cepas y dos sustratos diferentes	194

RESÚMEN

El butanol es considerado un combustible líquido con potencial para remplazar a la gasolina en los motores de combustión interna. Es producido mediante la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) empleando diversos clostridios solventogénicos. El desempeño del proceso fermentativo ABE está seriamente limitado por: altos costos de sustrato, inhibición por sustrato y baja tolerancia a solventes (máximo 20 g/L), crecimiento lento y baja densidad celular viable durante la fase solventogénica; éstas limitaciones resultan en baja concentración de productos, baja productividad, bajo rendimiento, alto costo de recuperación y dificultad en el control del metabolismo del cultivo. Con la finalidad de reducir los costos por sustrato y aprovechar un desecho de la industria láctea el presente trabajo propone el uso del suero de quesería como sustrato fermentable; adicionalmente, con la finalidad de disminuir las limitaciones por baja tolerancia a solventes se propuso la generación de cepas mutantes resistentes a concentraciones de butanol superiores a las soportadas por las cepas silvestres empleadas (*C. acetobutylicum* ATCC 824 y CDBB-B-797). Tras el desarrollo experimental se determinó que el suero de quesería es un sustrato adecuado para la fermentación ABE, siempre y cuando este apropiadamente suplementado. La adición de una fuente de hierro es estrictamente necesaria para que el suero de queso pueda ser un sustrato viable debido a que la falta de hierro impide la síntesis de ferredoxina y restringe la actividad de la ferredoxina-piruvato oxidorreductasa, lo que conduce a la producción de ácido láctico en lugar de los productos deseados ABE. Se determinó que el FeSO_4 (20 mgFe/L) es la fuente de hierro idónea para mejorar la producción de butanol al emplear el suero como sustrato. Por otra parte, se lograron generar cepas mutantes resistentes a la presencia de hasta 24.3 g/L de butanol en el medio de cultivo, es decir 25% superior a la soportada por ATCC 824 y 50% superior a la soportada por CDBB-B-797. La mutante generada a partir de ATCC 824 logró producir una mayor cantidad de solventes totales que la cepa original de donde fue derivada, sin embargo, no se observó una mejora estadísticamente significativa en la producción de butanol. Este trabajo aporta valiosa información sobre cómo hacer del suero de leche un buen sustrato para la fermentación ABE resaltando que se favorece el incremento en la producción de butanol y la productividad. La máxima concentración de butanol que logró obtenerse fue de 7.13 ± 1.53 g/L, obtenida al efectuar fermentaciones por lote empleando suero de leche como sustrato y la cepa silvestre ATCC 824.

ABSTRACT

Butanol is considered a superior liquid fuel that can replace gasoline in internal combustion engines. It is produced by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using various species of solventogenic clostridia. Performance of ABE fermentation process is severely limited mostly by: high cost of substrate, substrate inhibition and low solvent tolerance (max 20 g/L), low growth and low cell density during solventogenic phase; leading to low product concentrations, low productivity, low yield, high product recovery costs and difficulty in controlling culture metabolism. In order to decrease the cost per substrate and exploit a waste generated by dairy industry, this study proposes using cheese whey as substrate for fermentation; additionally, in order to reduce low solvents tolerance limitations mutant strains generation, resistant to higher butanol concentrations than those supported by wild strains used (*C. acetobutylicum* ATCC 824 and CDBB-B-797) was proposed. After experimental work it was determined that the cheese whey is a suitable substrate for ABE fermentation, provided that this appropriately supplemented. The addition of an iron source was strictly necessary for the cheese whey to be a viable substrate because lack of iron in the cheese whey impedes ferredoxin synthesis and therefore, restricts pyruvate-ferredoxin oxidoreductase activity leading to the production of lactic acid instead of acetone, butanol and ethanol. FeSO_4 (20 mgFe/L) was determined as the ideal iron source for butanol production improvement while whey is used as substrate. Moreover, mutant strains derived from *C. acetobutylicum* ATCC 824 and CDBB-B-797 resist the presence of up to 24.3 g/L butanol in culture medium, concentration 25% higher than that supported by wild type ATCC 824 and 50% higher than that supported by CDBB-B-797. Mutant generated from ATCC 824 was able to produce a greater amount of total solvents than the parental strain from which it was derived; however, statistically significant improvement was not observed for butanol production. This work provides valuable information on how to make whey a good substrate for ABE fermentation noting that the increase in the production of butanol and productivity is enhanced. Maximum butanol concentration achieved was 7.13 ± 1.53 g/L, which was obtained performing batch fermentations using whey as a substrate and the wild strain ATCC 824.

INTRODUCCIÓN

El consumo de energía a nivel mundial se ha incrementado en el último siglo principalmente por el crecimiento de la población y por la industrialización de las ciudades. A pesar de contar con diversas fuentes de energía, el ser humano se ha vuelto dependiente de los combustibles derivados del petróleo. Desde los años 70's, cuando el petróleo encareció, comenzó a resurgir el interés por la obtención de productos derivados de fuentes renovables; dando especial atención a la obtención de productos con gran potencial para ser empleados como combustibles.

De los productos con mayor auge destacan el biodiesel, producido por transesterificación de grasas y aceites de diversas fuentes, el etanol, producido principalmente por procesos fermentativos, y otro proceso fermentativo importante, aunque menos conocido: la fermentación ABE (acetona:butanol:etanol).

La demanda de los productos generados mediante la fermentación ABE, hasta hace unos años, era cubierta en su totalidad por los derivados de procesos petroquímicos; los procesos fermentativos se habían vuelto obsoletos por ser económicamente incosteables al incrementarse el valor comercial de sus insumos: principalmente granos y melazas, e incrementar el costo por la disposición de efluentes. Sólo una fábrica dedicada a la fermentación ABE había logrado mantenerse en funcionamiento: la National Chemical Products Ltd, ubicada en Germiston, Sudáfrica, la cual subsistió debido a los bajos costos de su principal sustrato: la melaza de caña, aunado a las dificultades de este país para importar petróleo debido a problemas políticos. Ésta última fábrica fue cerrada en 1983 al no poder competir más con los precios de la acetona, etanol y butanol derivados del petróleo.

De los productos generados en la fermentación ABE el de mayor interés en la actualidad es el butanol, ya que es un importante químico industrial considerado como un combustible líquido superior con capacidad para remplazar a la gasolina en los motores de combustión interna, presentándose como una mejor opción que el etanol. Sin embargo, la tecnología tradicional existente para efectuar la fermentación ABE sufre de una serie de limitaciones, en comparación con la fermentación del etanol. La fermentación

ABE presenta bajos rendimientos y baja concentración de productos debido al carácter heterofermentativo, sus costos de recuperación y purificación son elevados y además el butanol es altamente tóxico para los sistemas biológicos que lo producen, aun en concentraciones bajas.

La producción biológica del butanol ocurre naturalmente en algunas especies de microorganismos, como las bacterias *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium butyricum* o la arquea *Hyperthermus butylicus*. Sin embargo, el género más estudiado es el de *Clostridium* ya que son capaces de convertir diversas fuentes de carbono en combustibles y químicos como el butanol, acetona y etanol. Otras especies, que de manera natural no poseen la capacidad de producir este solvente, están siendo modificadas genéticamente para ser empleadas en la producción de biobutanol a nivel industrial y comercial.

Como en todos los biocombustibles, la producción económicamente viable del biobutanol está determinada principalmente por el costo de la materia prima empleada para su producción (la cual representa alrededor de un 60-70% del costo total) y los costos de recuperación del producto.

Por ello este trabajo busca implementar un sistema fermentativo que utiliza un abundante desecho de la industria láctea: suero de leche, de bajo costo y alto contenido de azúcares (alrededor de 50 g/L de lactosa) reduciendo así los costos de la materia prima; además busca modificar genéticamente al microorganismo productor para lograr que la presencia del butanol en el medio de cultivo no inhiba su crecimiento y le permita seguir trabajando, consiguiendo así mayores concentraciones de producto en el caldo de cultivo que permitan abaratar los costos de recuperación y mejorar los rendimientos fermentativos.

1. ANTECEDENTES

1.1 EL MUNDO Y EL CONSUMO DE ENERGÍA

Actualmente existen dos formas básicas de producción y consumo de energía: la comercial y la tradicional. La primera de ellas es objeto de transacciones comerciales normales, mientras que la tradicional no se factura ni se contabiliza por lo que las estimaciones acerca de su consumo son muy inciertas. Los datos recogidos en las estadísticas sobre producción de energía primaria a gran escala hacen referencia, normalmente, a la extracción y elaboración de las materias primas que constituyen los principales recursos energéticos primarios: crudo de petróleo, carbón, gas, etc. Las cifras de consumo de energía primaria se suelen dar en unidades de energía Tep (tonelada equivalente de petróleo, aproximadamente $41.89 \cdot 10^9$ J).

Durante los últimos siglos, el consumo mundial de energía primaria ha crecido en progresión geométrica (comportamiento exponencial), habiendo mantenido uno de los niveles mínimos hasta principios del siglo XIX, cuando se inicia una escalada que lo ha llevado a valores por encima de los 8.4 GTep/año (GTep: gigatoneladas equivalentes de petróleo), en el año de 1998. Los dos factores que en mayor medida contribuyen a tirar de la demanda de energía son el crecimiento demográfico y, particularmente, el crecimiento económico.

El carbón suministró la energía para la revolución industrial en los siglos XVIII y XIX. Con la llegada del automóvil, los aviones y con la generalización del uso de la electricidad, el petróleo se convirtió en el combustible dominante durante el siglo XX. Según la U.S. Energy Information Administration (EIA, 2010) el crecimiento del petróleo como principal combustible fósil fue reforzado por el descenso continuado de su precio entre 1920 y 1973. Tras las crisis del petróleo de 1973 y 1979, en las cuales el precio del petróleo se incrementó desde los 5 hasta los 45 dólares estadounidenses por barril, se produjo un retraimiento del consumo de petróleo. El carbón y la energía nuclear pasaron a ser los combustibles elegidos para la generación de electricidad y las medidas de conservación incrementaron la eficiencia energética.

En los últimos años se ha estabilizado la distribución del consumo de las distintas fuentes quedando distribuido aproximadamente en un 38.5% de petróleo, 24.7% de carbón, 23.7% de gas natural, 6.6% energía nuclear y 6.5% energía hidráulica.

En una proyección realizada por la EIA (2010) se ha estimado que el consumo energético mundial se incrementará en un 49% del 2007 al 2035, 1.4% por año. Dicha proyección se describe gráficamente en la figura 1.

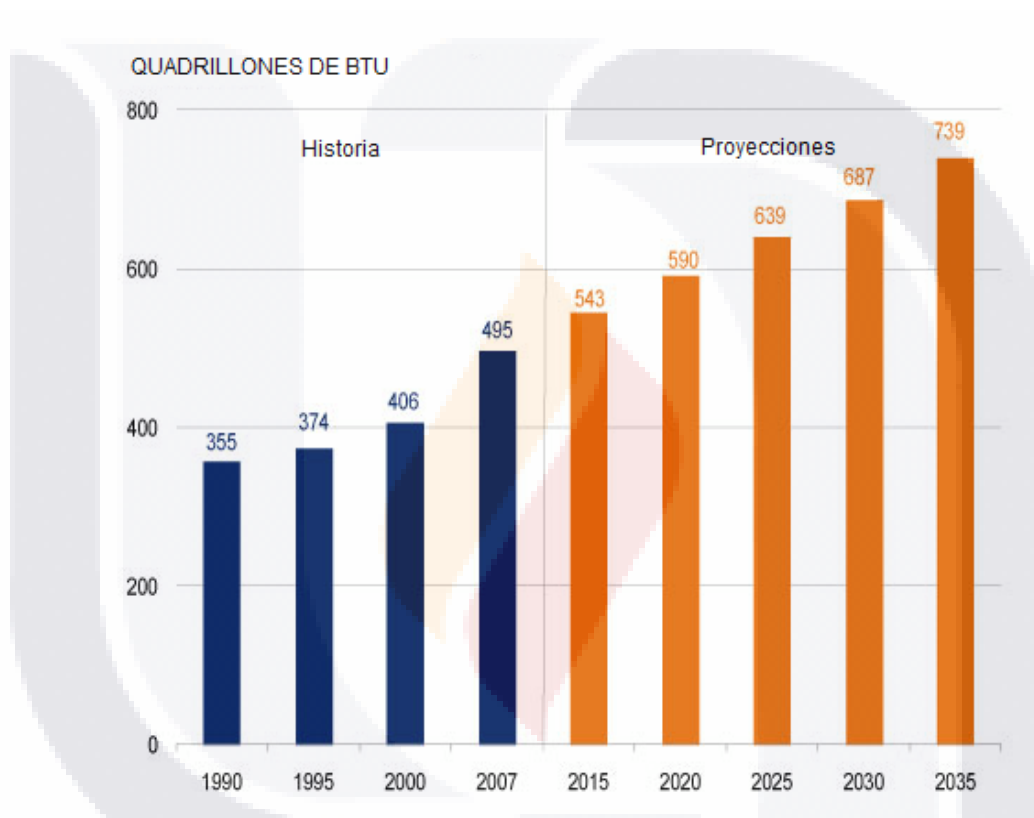


Figura 1. Consumo de energía comercializada en el mundo, 1990-2035 (Modificado de EIA, 2010).

De igual manera se ha realizado una proyección sobre los tipos de combustible que serán empleados en los próximos años (figura 2). Teniendo en cuenta las expectativas de que los precios mundiales del petróleo se mantendrán relativamente altos durante la mayor parte del período de proyección, los combustibles líquidos y derivados del petróleo son la fuente de más lento crecimiento en el mundo de la energía. El consumo de combustibles líquidos aumentará a una tasa promedio anual de 0.9% desde 2007 hasta el 2035. Las energías renovables son la fuente de más rápido crecimiento, con el aumento del consumo en un 2.6% anual. La proyección de los precios del petróleo,

así como la preocupación sobre el impacto ambiental del uso de combustibles fósiles y fuertes incentivos del gobierno para aumentar el uso de energías renovables en muchos países alrededor del mundo, mejoran las perspectivas de las fuentes de energía renovables. Aunque se espera que los combustibles líquidos se mantengan como la mayor fuente de energía, su comercialización mundial disminuirá de un 35 % en 2007 a 30 % en 2035. En el sector de la energía eléctrica, disminuirá el consumo de combustibles líquidos como generadores de electricidad debido a la constante subida de los precios mundiales del petróleo. Los combustibles líquidos utilizados en el sector del transporte, por el contrario, seguirán aumentando a pesar de los crecientes precios del petróleo. El consumo mundial de combustibles líquidos para el transporte crecerá un 1.3% anual, y en la ausencia de importantes avances tecnológicos, los combustibles líquidos seguirán dominando los mercados mundiales de transporte hasta el año 2035 (EIA, 2010).

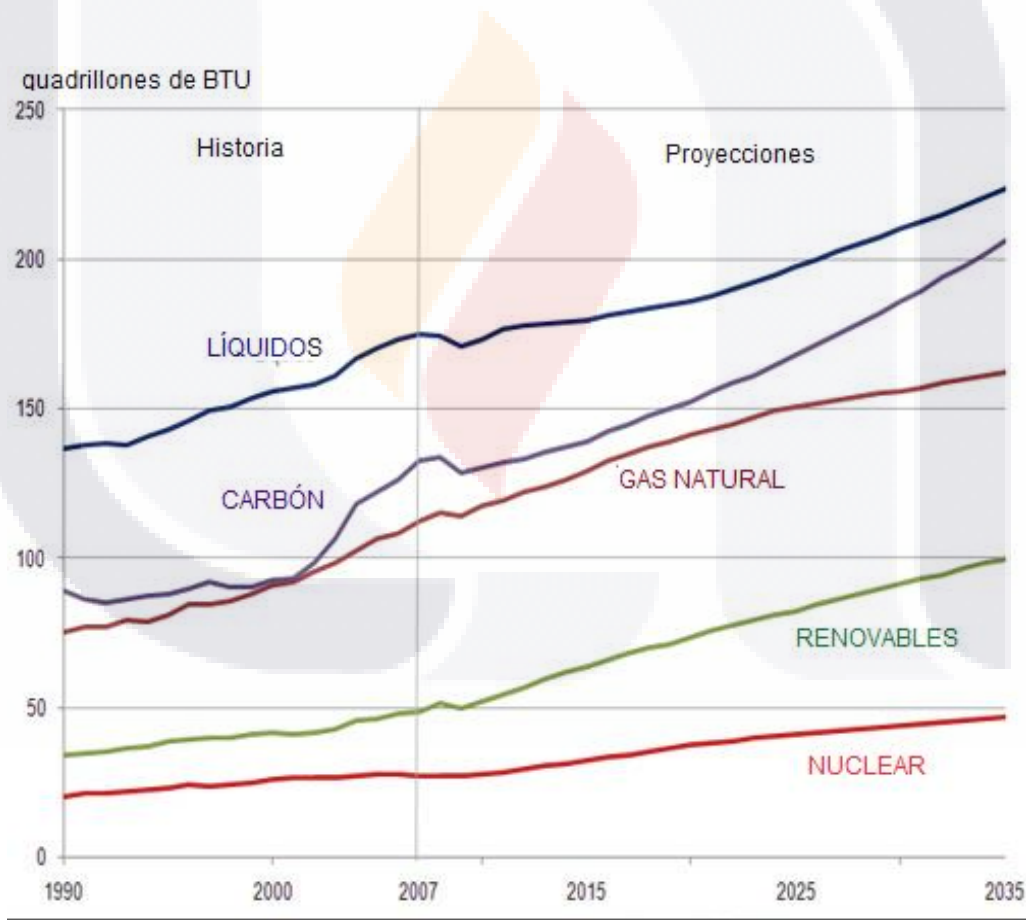


Figura 2. Uso de energía comercializada en el mundo por tipo de combustible, 1990-2035 (Modificado de EIA, 2010).

El gas natural seguirá siendo un importante combustible para la generación de electricidad en todo el mundo. Se calcula que el consumo mundial de gas natural incrementará 1.3% al año, su uso en el sector de la energía eléctrica incrementará 1.6% de forma anual. Se prevé que entre 2007 y 2020, en todo el mundo aumentará la demanda de gas natural un 1.8% al año, pero entre 2020 y 2035 la tasa de crecimiento será sólo el 0.9% al año, ya que los consumidores recurrirán a fuentes alternativas de generación, en particular, las fuentes renovables de energía, la energía nuclear, y, en ausencia de políticas que limiten su uso, al carbón. El consumo mundial de carbón se incrementará en un 1.6% anual en promedio desde 2007 hasta 2035, pero la mayor parte del crecimiento de la demanda se producirá a partir de 2020 (EIA, 2010). La proyección descrita sobre el consumo de las diversas fuentes de energía se muestra gráficamente en la figura 2.

Las mayores reservas de combustibles fósiles son de carbón, de ellas la mayor parte se encuentran en Asia y Oceanía, Antigua URSS y América del Norte. Los países con mayores reservas son Estados Unidos, ex URSS y China. Los niveles de reservas de petróleo y gas natural son similares en cantidad y las reservas de carbono son dos veces superiores a la suma de las otras dos. En cuanto a la concentración de las reservas de petróleo, éstas se encuentran mayoritariamente en Medio Oriente y en mucha menor medida en América del Norte, América del Sur y Central y África. Por su parte las reservas de gas natural se concentran principalmente en la antigua URSS y Medio Oriente (Sancho et al., 2006).

1.2 RESERVAS DE COMBUSTIBLES FÓSILES

La distribución de las reservas probadas de combustibles fósiles existentes hasta el año 2001 en todo el mundo se describen gráficamente en la figura 3. De igual manera, las reservas mundiales de petróleo probadas, al 1° de enero de 2010, se muestran en la figura 4.

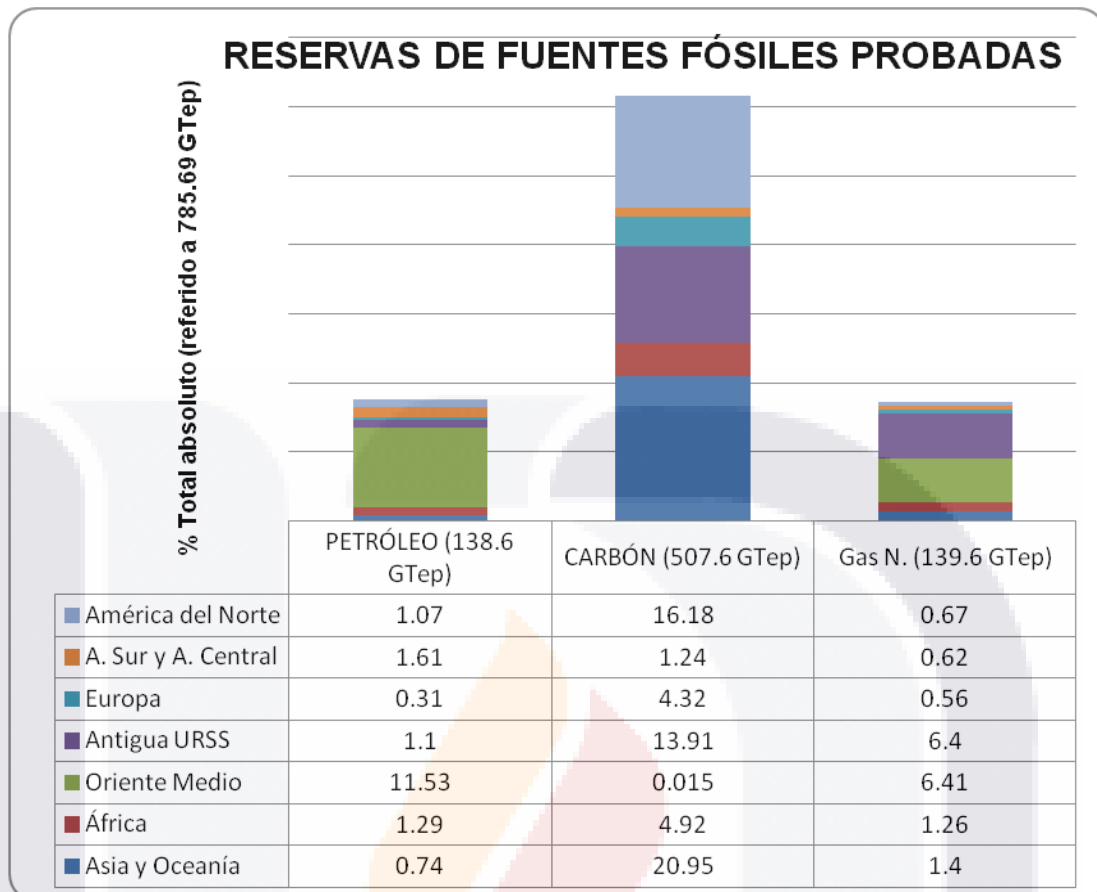


Figura 3. Estructura de las reservas de fuentes fósiles probadas por área geográfica en 2001 (Sancho García et al., 2006).

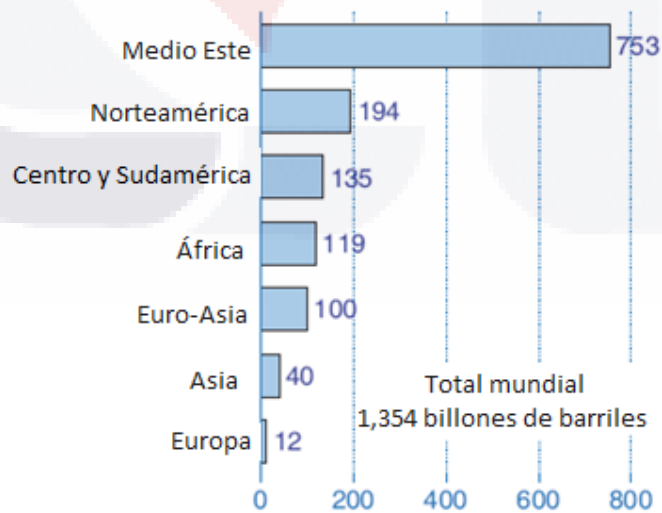


Figura 4. Reservas probadas de petróleo por región geográfica al 1° de enero de 2010. (EIA, 2010).

1.3 FUENTES DE ENERGÍA RENOVABLE

Como se mencionó anteriormente, las proyecciones de consumo de energía en los próximos años prevén un aumento en el consumo de energías renovables en un 2.6% por año (EIA, 2010). El agotamiento de las reservas de combustibles fósiles, aunado a la preocupación por el impacto ambiental del uso de dichos combustibles, ha llevado a los países a desarrollar nuevas tecnologías que permitan el aprovechamiento de energías renovables que no dependan de la existencia del petróleo u otros combustibles fósiles, además de que sean amigables con el ambiente.

Como energía renovable se entiende cualquier tipo de energía obtenida de fuentes naturales virtualmente inagotables, ya sea por la inmensa cantidad de energía que contienen, o bien, por su capacidad de regenerarse por medios naturales (Menéndez-Pérez, 2001).

Existe una gran variedad de energías renovables que son actualmente explotadas o se encuentran en investigación, las principales descritas por Menéndez-Pérez (2001) se muestran a continuación:

- 1) Energía hidráulica: los ríos y otros cauces de agua suponen una manifestación energética utilizada por el hombre tanto para transporte de personas y mercancías como para la molienda de grano o el acondicionamiento de mazos metalúrgicos u otros útiles industriales. Desde finales del siglo pasado la energía hidráulica se utiliza para la producción de electricidad. Para conducir el agua, se realizan obras desde un nivel superior a otro inferior, en el cual se dispone una turbina acoplada a un motor eléctrico donde se transforma la energía cinética del agua en movimiento en energía eléctrica. La cantidad de electricidad que se puede producir en una instalación depende de forma directa de la altura del salto hidráulico y de la masa de agua que pasa a través de la turbina. Las instalaciones hidráulicas tienen un buen rendimiento energético, alrededor del 90%, aunque varía en función del diseño y del régimen de carga.

2) Energía eólica: la energía del viento es directamente proporcional al cubo de su velocidad. La energía también es función del flujo de viento considerado, es decir, de su masa. La energía que se recupera en un aerogenerador es directamente proporcional a la superficie barrida por las palas del mismo, pero está afectada por la curva característica correspondiente a cada diseño de máquina. Los aerogeneradores se agrupan en parques eólicos que aprovechan un terreno libre. Cada máquina se conecta a un centro de transformación o subestación principal, desde esa subestación parte una línea que evacua la electricidad producida a la red de alta tensión. Los aerogeneradores han evolucionado incrementando su potencia unitaria, con ello se consigue recuperar más energía en una misma superficie.

3) Biomasa: se considera biomasa a toda aquella materia de carácter orgánico que se origina mediante mecanismos de fijación de la energía de la radiación solar, incluyendo cualquier tipo de materia vegetal obtenida específicamente de cultivos y la de origen residual. En los países desarrollados la biomasa se usa de forma marginal y con tendencia decreciente. En el tercer mundo la biomasa sigue siendo la base energética de una parte de la población. En general se utiliza con equipos de baja eficiencia, es decir, con un mal aprovechamiento. Los procesos de obtención y suministro de biomasa son el punto crucial de esta energía renovable y de ahí el interés por el desarrollo de los cultivos energéticos. Las aplicaciones energéticas de la biomasa pueden agruparse en cuatro formas básicas:

- Combustibles sólidos de uso directo como fuente de calor.
- Transformación en gas de biomasa residual para aplicaciones térmicas o de generación eléctrica.
- Plantas de producción de vapor y electricidad.
- Producción de biocombustibles líquidos con destino a la automoción.

4) Energía solar térmica: el aporte térmico de la radiación solar se ha utilizado desde antiguo en diferentes aprovechamientos energéticos: climatización de viviendas, secaderos agrícolas, producción de sal, etcétera. La energía de la radiación solar varía mucho de un sitio a otro con la latitud y el estado de la

atmósfera. Se han desarrollado paneles solares capaces de captar la energía solar y utilizarla para el calentamiento de sustancias, principalmente para calentamiento de agua. El rendimiento de un panel solar depende de forma directa de la radiación incidente.

- 5) Electricidad de origen solar térmico: La radiación solar se puede utilizar para la generación de electricidad. Existen tres alternativas principales para la utilización de los aspectos térmicos de la radiación solar, estas son los colectores cilíndricos parabólicos; los espejos planos en torre y los discos y motor Stirling. Los dos primeros están basados en ciclos térmicos que emplean fluidos que se comprimen, calientan y expanden.
- 6) Energía fotovoltaica: la acción de los fotones de la radiación solar sobre placas de silicio u otros materiales provoca el movimiento de electrones en dichos materiales generando una corriente eléctrica. La energía eléctrica se genera en forma de corriente continua.
- 7) Energía geotérmica: el geotermismo es un fenómeno que presenta condiciones adecuadas de recuperación de energía como electricidad o como foco de calor. Es una fuente de energía empleada en países como México e Italia.

Para fines de este trabajo se retomará la importancia de la generación de fuentes alternas de energía renovable que emplea a la biomasa para la generación de biocombustibles.

1.4 BIOCOMBUSTIBLES

En México, conforme a la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, se define a los biocombustibles como los combustibles obtenidos de la biomasa provenientes de materia orgánica de las actividades agrícola, pecuaria, silvícola, acuacultura, algacultura, residuos de la pesca, domesticas, comerciales, industriales, de microorganismos y de enzimas, así como sus derivados producidos por procesos tecnológicos sustentables (SAGARPA, 2011).

Para el planeta, los combustibles de origen vegetal o animal tienen dos ventajas: ayudan a combatir el calentamiento global, porque son más limpios; y son una alternativa para disminuir los riesgos provocados por el agotamiento de las reservas de petróleo a nivel mundial, dado su carácter de recurso renovable. Para México representan una forma de impulsar el desarrollo de sectores de la agricultura y la ganadería, ofreciéndoles oportunidades de negocio tanto a las grandes empresas como a los pequeños agricultores. También son importantes para el país porque son una alternativa de largo plazo para el petróleo que, como recurso no renovable, cada día es más escaso y su extracción se hace más costosa (SAGARPA, 2011).

Las motivaciones que han impulsado a las diversas naciones a desarrollar la industria de la energía y en particular de los biocombustibles pueden sintetizarse en tres grupos: desarrollo agrícola, reducción de gases con efecto invernadero y seguridad energética (SAGARPA, 2011).

1.4.1 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOCOMBUSTIBLES

Según Nigam y Singh (2011) los biocombustibles son clasificados de manera general en primarios y secundarios. Los biocombustibles primarios son aquellos que se emplean en una forma no procesada, principalmente para obtener calor, cocinar o generar electricidad, mientras que los de secundarios son los que se producen al procesar la biomasa. Los biocombustibles secundarios son a su vez clasificados en tres generaciones, en base a la materia prima de la que provienen y la tecnología empleada para su procesamiento. La clasificación detallada de los biocombustibles, basada en la propuesta por los mencionados autores, se observa en la figura 5.

Los biocombustibles de primera y segunda generación podrían mejorar o resolver los problemas asociados al agotamiento de los combustibles fósiles, sin embargo, han surgido problemas para su utilización, entre ellos el determinar si el uso de las tierras agrícolas y forestales es realmente sustentable para la producción de biocombustibles y, principalmente, la controversia alimentos Vs. Combustibles. El empleo de los biocombustibles de tercera generación ayudará a evitar estos problemas, aprovechando

desechos agrícolas, industriales y urbanos para la generación de los combustibles (Picazo-Espinosa, et. al. 2011).

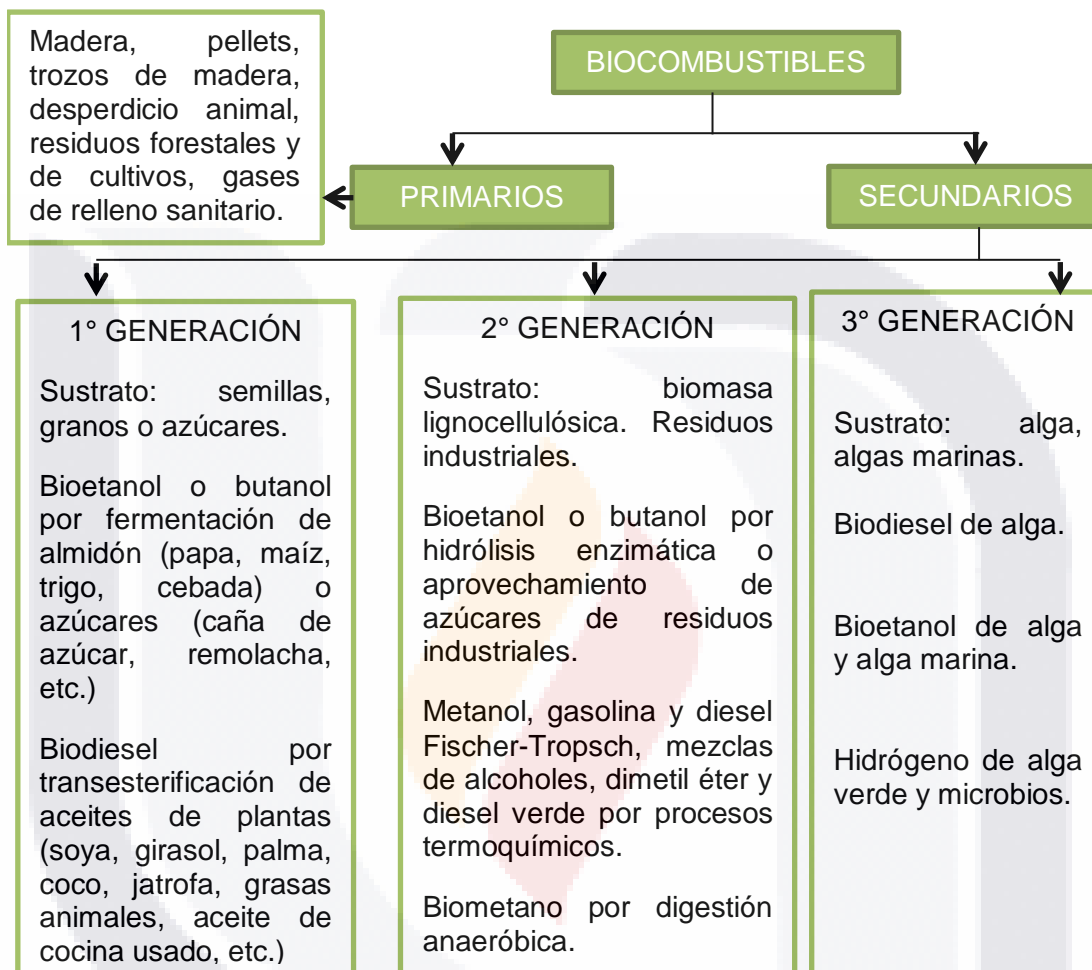


Figura 5. Clasificación de los biocombustibles. (Modificado de (Nigam y Singh, 2011)

1.4.2 PANORAMA DE LOS BIOCOMBUSTIBLES EN MÉXICO

Actualmente en México el mercado para los biocombustibles tiene dos grandes vías de comercialización, la primera es la demanda que Petróleos Mexicanos (PEMEX) generará al comenzar a adquirir bioetanol o biodiesel para la oxigenación y venta de sus combustibles al público en general, la segunda es la exportación a mercados donde la demanda es por mucho superior a su capacidad instalada de producción; en este caso, Estados Unidos representa un mercado potencial por la alta demanda que existe para bioetanol, la cual obedece a la necesidad de cumplir con los mandatos establecidos en su

legislación vigente en materia de uso de energías y combustibles de origen renovable. En el bienio 2011-2012 PEMEX requirió de 986 millones de litros de bioetanol y 17.4 millones de litros de biodiesel, y actualmente en México no se producen esos biocombustibles en cantidades suficientes, por lo que hay un amplio nicho de oportunidades para quienes deseen invertir. Además, a nivel internacional la demanda de estos productos crece cada día.

Para que los biocombustibles sean económicamente viables deben cubrir varios requerimientos:

- 1) Tener un precio menor que los combustibles de origen fósil, para lo cual es necesario elevar significativamente la productividad de los terrenos dedicados a los cultivos energéticos (estos cultivos constituyen entre el 50% y el 90% del costo total de producción de los biocombustibles).
- 2) Tener un precio de venta mayor que los productos que tradicionalmente se obtienen de ellos, como el azúcar o el aceite comestible, para que sean atractivos al productor.
- 3) Ser producidos empleando menos energía en su cultivo y procesamiento que la que ofrecen una vez terminados.
- 4) Ser producidos generando una contaminación menor que la que produce la industria petrolera y del gas. Esto incluye desde las emisiones de los tractores empleados en su cultivo hasta las de las plantas procesadoras.
- 5) Ser producidos sin afectar la soberanía alimentaria de México, es decir, sin menoscabo de la producción de alimentos para consumo humano.
- 6) Ser producidos sin disminuir la biodiversidad nacional, esto es, sin reducir las áreas de selvas, bosques, etc.

Uno de los bioenergéticos que ha cobrado mayor importancia en los últimos años a nivel mundial es el bioetanol, producto principalmente a base de maíz y caña y cuya producción encabezan Estados Unidos y Brasil. El biodiesel en cambio se obtiene principalmente en Europa principalmente de cultivos oleaginosos como colza, soya, canola y girasol (SAGARPA, 2011).

El biodiesel es principalmente elaborado a partir de semillas oleaginosas u otras fuentes ricas en ácidos grasos. Los aceites que se obtienen de estas fuentes son tratados con un alcohol para generar dos productos: glicerina y metilesteres. El metilester tiene un comportamiento en los motores de combustión diésel similar al del gas oil.

Por su parte, la producción de alcoholes puede efectuarse a partir de diferentes materias primas que tiene azúcares fáciles de extraer y transformar, ya sean semillas, tubérculos, caña azucarera, entre otros. El principal proceso fermentativo que se emplea actualmente es el de la fermentación etílica, cuyo producto es el etanol, el cual puede ser empleado en mezclas con la gasolina o como único combustible. Los motores de explosión pueden trabajar correctamente con mezclas de hasta 20% de etanol sin mermas en su comportamiento. Los automóviles que funcionan exclusivamente con etanol requieren de una adaptación específica en sus motores para el uso de dicho combustible (Menéndez-Pérez, 2001).

Durante los últimos 30 años la producción de bioetanol como combustible renovable se ha incrementado de forma considerable, sin embargo, éste alcohol dista de ser el remplazo ideal para la gasolina pues posee un menor contenido energético que ésta y además es higroscópico. Recientemente, ha aumentado el interés en el uso de butanol como un complemento o sustituto de gasolina, pues posee varias características que lo hacen superior al etanol como carburante (Rajchenberg-Ceceña, et al., 2009).

1.4.3 EL BUTANOL COMO COMBUSTIBLE

1.4.3.1 ¿QUÉ ES EL BUTANOL?

El butanol (alcohol butílico) es un alcohol primario constituido por 4 carbonos cuya fórmula es C_4H_9OH ; posee cuatro isómeros estructurales denominados n-butanol, isobutanol, sec-butanol y ter-butanol (Niemistö et al., 2013). Es un líquido incoloro, flamable, con un olor característico, miscible en solventes orgánicos comunes y parcialmente miscible en agua (Lee et al., 2008).

Hasta hoy, es considerado una mejor alternativa que el etanol como biocombustible ya que posee un mayor contenido energético, usabilidad, seguridad y es más fácil de distribuir (Niemistö et al., 2013), además es menos corrosivo y menos soluble en agua que el etanol, siendo un combustible más adecuado para las máquinas de combustión interna utilizadas actualmente en los automóviles (Cooksley et al., 2012; Dong et al., 2012; Kumar y Gayen, 2012; Steen et al., 2008).

1.4.3.2 HISTORIA DE LA PRODUCCIÓN DEL BUTANOL

La fermentación acetona butanol etanol (ABE) efectuada por la bacteria *Clostridium acetobutylicum* es una de las fermentaciones industriales más antiguas, con más de 100 años de historia (Shapovalov y Ashkinazi, 2008). En la línea del tiempo (figura 6) pueden observarse los sucesos más relevantes y destacados en relación con esta fermentación.

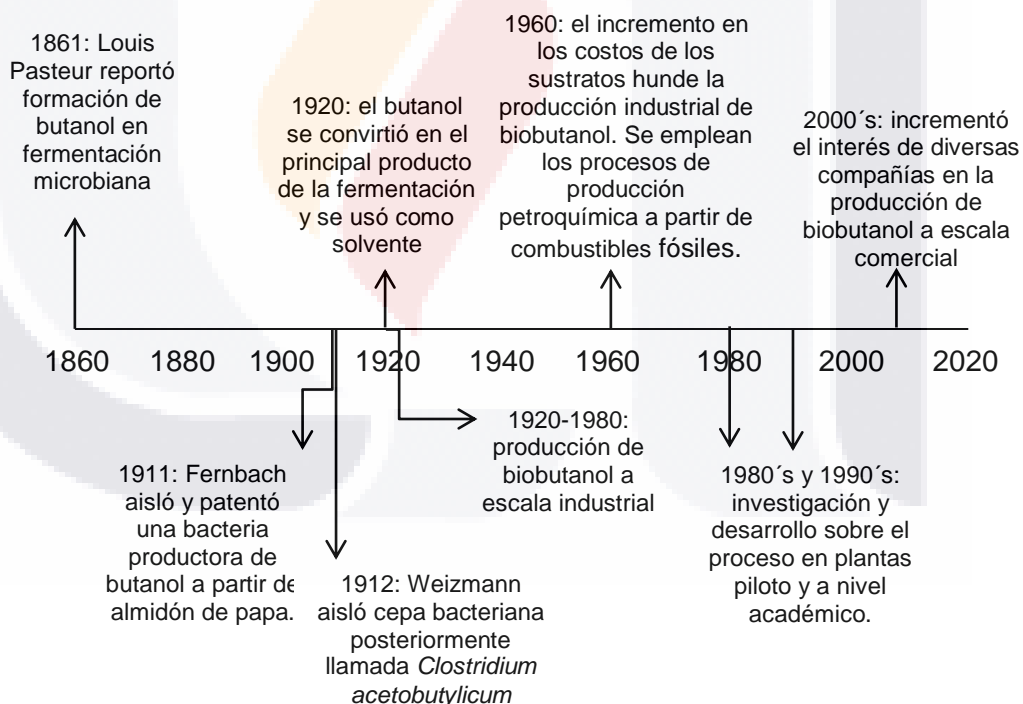


Figura 6. Historia de la producción de biobutanol. Modificado de Niemistö et al. (2013)

El primero en reportar la producción de butanol por fermentación microbiológica fue Pasteur en el año de 1861, posteriormente Schardigner reportó la producción de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

acetona en el proceso fermentativo. Para el año 1911 Fernbach logró fermentar biomasa de papa para producir butanol empleando un microorganismo aislado, pero fue hasta los años de 1912 a 1914 cuando Chaim Weizmann, alumno de Pasteur, logró aislar al microorganismo responsable de la fermentación: *Clostridium acetobutylicum* (Niemistö et al., 2013; Ranjan y Moholkar, 2009). Weizmann desarrolló en la Universidad de Manchester el proceso fermentativo empleando este microorganismo aislado, en el proceso por él desarrollado se producían en conjunto acetona, butanol y etanol en proporciones 3:6:1, en este tiempo el butanol era un producto sin valor (Antoni et al., 2007).

Durante la primera guerra mundial esta fermentación comenzó a realizarse con la finalidad de producir acetona para emplearla posteriormente en la generación de cordita, una especie de pólvora sin humo empleada en las municiones de los aliados (Ranjan y Moholkar, 2009; Antoni et al., 2007). Hasta el inicio de los años 20's el proceso fermentativo era exclusivamente empleado para la fermentación de acetona, sin darle algún uso al butanol. Debido al rendimiento superior del butanol que se obtiene con la fermentación, comparado con la acetona, se buscó un uso para el mencionado solvente y se descubrió que al mezclarlo con nitrocelulosa se obtenía una laca de secado rápido (Shapovalov y Ashkinazi, 2008). La laca de secado rápido fue empleada por la industria automotriz para pintar los carros (Ranjan y Moholkar, 2009).

Para 1927 el butanol se convirtió en el principal producto de la fermentación ABE (Shapovalov y Ashkinazi, 2008). En 1936, al vencer la patente de Weizmann, comenzaron a construirse plantas para la producción de acetona y butanol en USA, Japón, India, Australia y Sudáfrica (Patakova et al., 2011).

Durante la segunda guerra mundial el butanol fue empleado para la producción de caucho sintético (Shapovalov y Ashkinazi, 2008). Al término de la segunda guerra mundial dos terceras partes del butanol y una décima parte de la acetona producida en Estados Unidos provenía de la fermentación ABE. Los sustratos principalmente empleados para esta fermentación eran maíz, trigo, centeno y melazas.

Después de la segunda guerra mundial la fermentación ABE comenzó a decaer debido a que la industria petroquímica era capaz de producir una mayor cantidad de estos solventes a un costo mucho menor. Al volverse económicamente no sostenible la mayoría de las industria fermentadoras para la producción de estos solventes comenzaron a cerrar, para el año 1960 la industria de la fermentación ABE, en los países del este, estaba prácticamente extinta (Ranjan y Moholkar, 2009).

La fábrica Germiston, en Sudáfrica, pudo permanecer en funcionamiento hasta 1983 ya que el bajo costo de sus insumos: melazas y carbón, le permitían tener un precio competitivo en sus productos. En China, la fermentación ABE a nivel industrial comenzó a ser explotada en 1960 y en 1980 logró su mayor expansión; para finales del siglo veinte la mayoría de las plantas en este país habían ya cerrado (Patakova et al., 2011).

1.4.3.3 PROPIEDADES DEL BUTANOL

El butanol posee ciertas propiedades intrínsecas que lo vuelven atractivo para ser empleado como combustible. Las propiedades más relevantes del butanol, comparadas con las de sus isómeros, el etanol y la gasolina se encuentran resumidas en la tabla 1 y se describen a continuación.

1.4.3.3.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

1.4.3.3.1.1 PUNTO DE INFLAMACIÓN

Según la NFPA (National Fire Protection Association) el punto de inflamación es la temperatura mínima necesaria para que un material inflamable desprenda vapores que, mezclados con el aire, se enciendan en presencia de una fuente ígnea. Es una propiedad fisicoquímica considerada como un índice de peligro de incendio, a menor temperatura de inflamación mayor riesgo de ignición (Jones, 2011). Comparando los compuestos mencionados en la tabla 1 se observa que todos poseen un punto de inflamación superior al de la gasolina, sin embargo, esto no significa que el peligro de incendio durante su almacenaje y transportación sea menor. El punto de inflamación y la presión de vapor, en conjunto, determinaran la peligrosidad del compuesto.

Tabla 1. Propiedades de diversos combustibles

PROPIEDADES	COMPUESTO					
	etanol	n-butanol	secbutanol (2-butanol)	isobutanol	terbutanol	Gasolina
PROPIEDADES FISICOQUIMICAS						
Masa molecular (g/mol)	46.07	74.12				
Densidad (g/cm ³ a 20°C)	0.789	0.8098	0.8063	0.805	0.775	0.700-0.791
Punto de fusión (°C)	-114	-89	-115	-108	26	
Punto de ebullición (°C)	78	117.7	99	107	82	<210
Punto de inflamación (°C)	12	30-35	24	28	11	<-20
Presión de vapor (mmHg a 20°C)	43	7	19	9	31	26.5-67.5
Solubilidad en agua (%p/p a 20°C)	100	7.8	12.5	8.5	Altamente miscible	nula (sin aditivos)
Higroscopicidad	alta	Ligera	Ligera	Ligera	Alta	nula (sin aditivos)
PROPIEDADES COMO CARBURANTE						
ENERGÍA	MJ/L	19.6-21.2	29.2	similar al n-butanol		30-32
	BTU/Galón	84,000	110,000			115,000
Octanaje en investigación (octanos)	129	96	No reportada	110	100	91-99
Octanaje en motor (octanos)	102	78	No reportada	94	89	81-89
Viscosidad cinemática (m ² /s) a 20°C	1.5	3.6	3.26	4.96	6.93	0.4-0.8
Proporción aire-combustible	9	11.2	No reportado			14.6

Los datos de la tabla incluyen información recabada de los trabajos de Jones (2011); Köpke et al. (2011); Ha et al. (2010); Wadrop (2010); Rajchenberg-Ceceña et al. (2009).

Por lo anterior podríamos definir que, de los compuestos comparados en la tabla 1, el que presenta una mayor seguridad en cuanto a su manejo y almacenaje es el butanol, seguido del isobutanol. Ambos presentando una baja presión de vapor y una temperatura de inflamación elevada, en comparación con el resto de los compuestos estudiados.

1.4.3.3.1.2 PRESIÓN DE VAPOR

Un compuesto que posee una alta presión de vapor se evapora fácilmente ocasionando problemas para su almacenaje, transportación y empleo. A mayor presión de vapor se incrementa el riesgo de generar una explosión en los contenedores del material volátil (Atsumi et al., 2008).

El etanol tiene una presión de vapor de 43 mm Hg a 20°C, la cual es poco más de 6 veces superior a la presentada por el butanol, que es de apenas 7 mm Hg a 20°C (Steen et al., 2008). Esto vuelve al butanol mucho más seguro para ser empleado a altas temperaturas, así como para su manejo y distribución (Niemistö et al., 2013; Jones, 2011).

1.4.3.3.1.3 SOLUBILIDAD EN AGUA E HIGROSCOPICIDAD

El butanol y sus isómeros (isobutanol y secbutanol) al poseer una cadena hidrocarbonada más larga que la que posee el etanol, se vuelve menos compatible con el agua, debido a la apolaridad de la mencionada cadena hidrocarbonada. La característica apolar de la cadena formada por los 4 carbonos le permite al butanol tener una mayor compatibilidad con los componentes de la gasolina, lo que hace posible que el butanol sea adicionado a las gasolinas desde la refinería (Niemistö et al., 2013; Rajchenberg-Cecea et al., 2009). Por su parte, la conformación estructural de la molécula del terbutanol, a pesar de poseer 4 carbonos, no le permite tener la capacidad de mezclarse correctamente con los componentes de la gasolina y sí hacerlo fácilmente con el agua.

Por otra parte, la capacidad higroscópica de un combustible es de particular importancia, la tendencia de un combustible a mezclarse con el agua ambiental hace imposible que éste sea agregado a la mezcla de carburantes con mucha anterioridad a su uso. Tal es el caso del etanol, el cual debe ser transportado de forma independiente,

implicando un costo adicional. Si el etanol atrapa agua del ambiente se provocan problemas en las mezclas de gasolina-etanol, ocasionando una separación de fases, y en el proceso de combustión en el motor (Steen et al., 2008). El butanol, y sus isómeros: isobutanol y secbutanol, al presentar una muy ligera capacidad higroscópica, no generan problemas de atrapamiento de agua, separación de fases ni afectación al proceso de combustión.

1.4.3.3.2 PROPIEDADES COMO CARBURANTE

1.4.3.3.2.1 CONTENIDO ENERGÉTICO

El butanol, y sus isómeros, poseen un contenido energético cercano al de la gasolina con un 25% más de densidad energética por litro que el etanol. El tener un mayor contenido energético significa que el butanol tiene un rendimiento en BTU por galón del 90% cuando es comparado con la gasolina, mientras que el etanol sólo provee el 60% de la energía que ofrecería un volumen igual de gasolina (Jones, 2011). En otras palabras el rendimiento de butanol en Km/L es mejor que el del etanol (Niemistö et al., 2013).

1.4.3.3.2.2 OCTANAJE

El octanaje o número de octano es una medida de la calidad y capacidad antidetonante de las gasolinas para evitar las detonaciones y explosiones en las máquinas de combustión interna, de tal manera que se libere o se produzca la máxima cantidad de energía útil (Barroso-Castillo, 2012).

El butanol posee un octanaje similar al de la gasolina pero menor al del etanol, lo que significa que el butanol se quema más lentamente que el etanol pero es más difícil hacer ignición (Jones, 2011). Al poseer el butanol un octanaje similar al de la gasolina se deberán tomar en consideración los problemas que se pueden presentar al emplear combustibles con bajo número de octano que, según Barroso-Castillo (2012) son:

- Generación de detonaciones o explosiones en el interior de las máquinas de combustión interna.
- Mal funcionamiento de la máquina de combustión.
- Bajo rendimiento del combustible.
- Elevada emisión de contaminantes.

1.4.3.3.2.3 VISCOSIDAD CINEMÁTICA

La viscosidad de un combustible líquido tiene gran importancia a efectos de su almacenamiento y transporte. A mayor viscosidad mayor será la resistencia a fluir, por lo tanto se requerirán equipos de bombeo con una mayor potencia para movilizar al combustible (Köpke et al., 2011).

1.4.3.3.2.4 PROPORCIÓN AIRE-COMBUSTIBLE

Es el número que expresa la cantidad, en masa o en volumen, de aire aspirado por un motor de combustión para una cantidad unitaria de combustible. Dicha relación es función del combustible, del tipo de motor, de su regulación y de la carburación. El valor ideal o teórico de tal relación es el correspondiente a la relación estequiométrica o proporción exacta entre las masas de las sustancias que forman parte de la reacción para conseguir una completa combinación química.

Generalmente las gasolinas emplean alrededor de 15 Kg de aire por Kg de gasolina, el correcto mezclado de la gasolina con el aire ayuda a la combustión completa de los hidrocarburos para generar menores emisiones de monóxido de carbono o de hidrocarburos no quemados, reduciendo los niveles de contaminación emitidos al ambiente (Köpke et al., 2011). Al emplear alcoholes, la presencia de oxígeno en el combustible reduce la cantidad de aire requerido para la correcta combustión, lo que contribuiría con la reducción de emisiones de gases contaminantes.

Por todo lo anterior, ha resurgido en varios países el interés por la producción del butanol y algunos de sus isómeros, empleando para ello vías fermentativas como la ABE, para obtener así alternativas al uso de combustibles fósiles (Ni y Sun, 2009).

1.4.3.4 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL BUTANOL COMO COMBUSTIBLE

En base a las propiedades fisicoquímicas y carburantes descritas para el butanol pueden definirse las ventajas y desventajas que presenta con respecto a la gasolina (combustible fósil) y al etanol (biocombustible actualmente empleado). Éstas se presentan descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Ventajas y desventajas del uso del butanol Vs. gasolina y etanol

Vs.	BUTANOL	
	VENTAJAS	DESVENTAJAS
ETANOL	<ul style="list-style-type: none"> • Contenido energético más elevado. • Puede ser empleado de forma pura o mezclado en cualquier proporción con gasolina o diésel. • Puede ser empleado en motores de autos sin modificarlos. • No es higroscópico. • Es más seguro de usar, debido a la baja presión de vapor y elevado punto de inflamación. • Es menos corrosivo • Puede ser transportado y almacenado en la infraestructura existente actualmente para la gasolina. 	<ul style="list-style-type: none"> • Costo elevado de producción. • Menor rendimiento fermentativo. • Mayor dificultad para recuperación y purificación del producto. • Menor octanaje. • Mayor viscosidad.
GASOLINA	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere menor proporción aire- combustible para la correcta combustión del carburante. • No produce óxidos de nitrógeno ni de azufre.* • Menor formación de smog. • Menor formación de gases de efecto invernadero. • Menor formación de precursores de ozono. • Menor emisión de partículas tóxicas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor costo ** • Mayor viscosidad.

* Patakova *et al.* (2011) reportan un ligero incremento en la emisión de NOx y producción de aldehídos en pruebas de emisión de gases realizadas en vehículos alimentados con mezclas de gasolina y butanol al 10, 20 y 30%, en comparación con las emisiones obtenidas para los mismos autos alimentados únicamente con gasolina.

**Con los avances actuales que se tienen del proceso fermentativo, de incremento de rendimientos y recuperación del producto podría lograrse un precio competitivo para el butanol.

Los datos de la tabla incluyen información recabada de los trabajos de Patakova *et al.* (2011); Tashiro y Sonomoto (2010); Demain (2009); Shapovalov y Ashkinazi (2008).

1.4.3.5 SITUACIÓN MUNDIAL ACTUAL DEL BUTANOL

En el año 2014 la demanda de butanol en el mercado se ha estimado de 10 a 12 billones de libras por año, lo que significa un mercado de 7 a 8.4 billones de dólares con una proyección de expansión o crecimiento del 3% anual (Li et al., 2014).

1.4.3.5.1 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE BUTANOL Y SUS ISÓMEROS

Existen 4 formas isoméricas del butanol, todas ellas empleadas con diferentes fines industriales. La forma de producción de cada uno de dichos isómeros, así como los usos y aplicaciones dados a cada producto se muestran resumidos en la tabla 3.

El mercado mundial anual para el n-butanol empleado como un químico es de 2.8 a 3 millones de toneladas, con una tasa de crecimiento estimada del 3.2% por año, por lo menos hasta el año 2025. El mercado del butanol está valuado en 4.2 billones de dólares por año, para el isobutanol se calcula un valor de mercado de 560 millones de dólares por año (Wadrop, 2010).

El butanol es actualmente producido a partir de propileno. Las principales empresas productoras y comercializadoras del butanol derivado de propileno son BASF, cubriendo el 21% del mercado; DOW, abasteciendo el 15%; Cel/Oxeno, con un 11%; Kyowa, 7%; Sasol, 4% y Eastman con un 3% del mercado; el 39% restante del mercado mundial es abastecido diversas empresas de todas partes del mundo (Machado, 2010).

En China se encuentran en construcción nuevas plantas productoras, ya que se espera que en este país la demanda del butanol incremente un 5% por año; estas nuevas plantas productoras emplearan como sistema de producción la fermentación ABE para generar biobutanol. El biobutanol es idéntico al n-butanol derivado de combustibles fósiles y por lo tanto puede ser empleado como un sustituto directo en todas las aplicaciones dadas en la actualidad al mencionado solvente (Wadrop, 2010).

Tabla 3. El butanol y sus isómeros: producción y usos.

ISÓMERO	PRODUCCIÓN	USOS
n- butanol (1-butanol)	<p>A BASE DE PETRÓLEO: Es producido principalmente como un derivado del petróleo vía síntesis Reppe, síntesis Oxo, hidrogenación de crotonaldehido, hidrólisis de alcanos o bien por hidratación de alquenos.</p> <p>MICROBIOLÓGICA: Es el principal producto de la fermentación ABE, efectuada por diversas bacterias del género <i>Clostridium</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Solventes: para pinturas, recubrimientos y barnices. • Plastificante. • Recubrimientos • Industria química: como materia prima o intermediario para la síntesis de otros componentes químicos o plásticos principalmente ésteres de butilacrilato y metacrilato, butil glicol éter y buti acetato. • Textiles: como un agente de hinchamiento de tela recubierta. • Cosmética: maquillajes, productos de afeitar y para el cuidado de las uñas. • Medicamentos: antibióticos, hormonas y vitaminas (empleado como solvente). • Gasolina: como un aditivo. • Líquido para frenos: componente de la fórmula.
Isobutanol (2-metil-1-propanol)	<p>SINTÉTICA: vía síntesis Reppe, síntesis Oxo o por hidrogenación catalítica de monóxido de carbono.</p> <p>MICROBIOLÓGICA: Es producido en bajas proporciones la fermentación alcohólica. Existen microorganismos genéticamente modificados capaces de producirlo con buenos rendimientos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Solvente: para recubrimientos y adhesivos. • Industria química. Como intermediario en síntesis de otros compuestos. • Aditivo para nitrocelulosa y resinas sintéticas. • Agente dispersante para pulimientos de piso. • Solvente de procesamiento para extracción de fragancias y saborizantes, para la industria farmacéutica y de pesticidas. • Gasolina: como aditivo. • Agente de flotación.
Sec-butanol (2-butanol)	<p>No puede ser producido directamente por fermentación, requiere de procesamiento posterior de los caldos de cultivo.</p> <p>Se produce por hidratación de n-buteno.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Industria química: es empleado para la síntesis de butanona, un importante solvente industrial empleado para los artículos de aseo doméstico y removedores de pintura. • Perfumes y saborizantes artificiales: emplean esteres del 2-butonal debido a su aroma agradable.
Ter-butanol (2-metil-2-propanol)	<p>Producido en su totalidad por la industria petroquímica. No se produce por ninguna ruta biológica conocida.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Solvente, removedor de pintura. • Desnaturalizante de etanol. • Aditivo de gasolina: como oxigenante. • Industria química: como intermediario en la síntesis de aromas y perfumes.

Los datos de la tabla incluyen información recabada de los trabajos de Niemistö et al. (2013); Dong et al. (2012); Machado (2010); Wadrop (2010); Shapovalov y Ashkinazi (2008).

1.4.3.5.2 PANORAMA GENERAL DEL PROCESO FERMENTATIVO ABE PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOBUTANOL: TECNOLOGÍA EXISTENTE Y EN DESARROLLO.

Actualmente el biobutanol puede reemplazar, de forma económicamente costeable, el uso del butanol producido por la industria petroquímica. Sin embargo, el principal interés que se tiene en la generación de este solvente es la producción de una alternativa de combustible para los vehículos automotores. El biobutanol es ampliamente considerado como el alcohol superior que reemplazará los combustibles líquidos (Shapovalov y Ashkinazi, 2008).

Como en todos los biocombustibles, la producción económicamente viable del biobutanol está determinada principalmente por el costo de la materia prima empleada para su producción (la cual representa alrededor de un 60-70% del costo total) y los costos de recuperación del producto (Wadrop, 2010).

Al plantear un proceso fermentativo para la producción de biocombustibles secundarios de segunda generación puede disminuirse de manera considerable el costo total del producto al adquirirse materia prima de muy bajo precio. La capacidad fermentadora multisustrato de los microorganismos capaces de realizar la fermentación ABE han llevado a la investigación y desarrollo de procesos fermentativos empleando como materia prima tanto fuentes de azúcares simples como polimerizados (celulosa).

De manera general el proceso de producción de la fermentación ABE puede estar dividido en 3 etapas: selección de la materia prima, pretratamiento de la materia prima y procesamiento de los azúcares, incluyendo en esta última etapa tanto la generación como la recuperación del producto. En la figura 7 se muestra un diagrama de flujo esquemático del proceso de producción ABE.

Los principales co-productos de la producción de butanol por esta vía fermentativa son acetona, etanol e hidrógeno. Estos compuestos poseen un valor químico sustancial, pueden ser purificados y comercializados. Además pueden ser considerados como combustibles para ser empleados en combinación con otras fuentes de calor y energía

dentro del mismo proceso de producción, con la finalidad de disminuir el costo total del producto de interés: biobutanol (Wadrop, 2010).

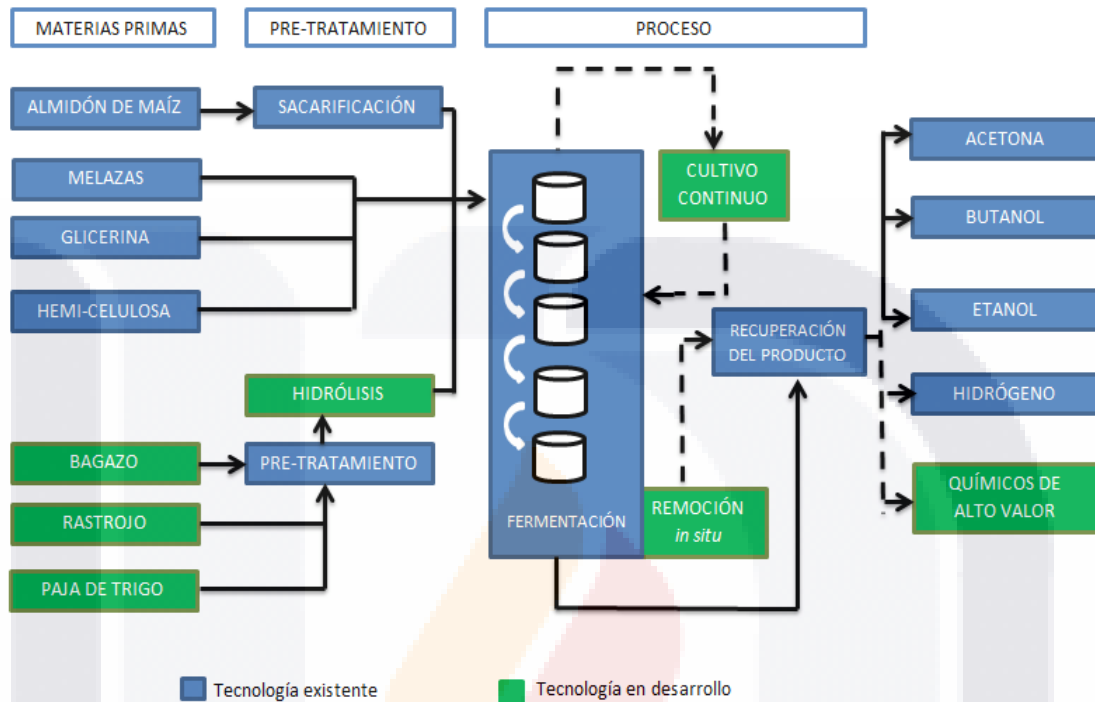


Figura 7. Diagrama de flujo esquemático del proceso de producción ABE.

El diagrama muestra la tecnología existente empleada en la actualidad para la producción de solventes ABE y la tecnología en desarrollo para futuras aplicaciones (Modificado de Wadrop, 2010).

Según Wadrop (2010) las principales aplicaciones tecnológicas involucradas en el proceso fermentativo ABE que se encuentran en estudio son:

- Tecnologías de hidrólisis que produzcan pocos o nulos compuestos inhibidores de la actividad metabólica de los microorganismos empleados en la producción del butanol.
- Mejoramiento en la configuración del proceso fermentativo y los sistemas de control, para desarrollar procesos de cultivo continuo eficientes.
- Integración de sistemas de recuperación de producto *in-situ* eficientes en la remoción y que no inhibían la actividad microbiana.

Hoy en día existen empresas trabajando en el desarrollo y mejoramiento de los procesos fermentativos conocidos para la producción de biobutanol, por lo que en poco tiempo se espera contar con la tecnología adecuada para optimizar el proceso comercial de generación de biobutanol (Wadrop, 2010).

1.4.3.5.3 EMPRESAS PRODUCTORAS DE BIOBUTANOL

Las principales empresas productoras de biobutanol a nivel mundial, así como sus sistemas de producción empleados, capacidad productiva y productos principales se resumen a continuación:

1.4.3.5.3.1 GEVO

DESCRIPCIÓN GENERAL:

Gevo es una compañía líder en la generación de productos químicos renovables y biocombustibles avanzados. Desarrolla alternativas de base biológica a productos derivados del petróleo, utilizando una combinación de la biología sintética y la química. La planta productora de isobutanol se encuentra en Luverne, Minesota, Estados Unidos (figura 8).



Figura 8. Planta de producción de isobutanol Gevo. (Modificado del sitio oficial de la empresa, Octubre 2012).

SITIO OFICIAL: www.gevo.com

SISTEMA DE PRODUCCIÓN:

Actualmente emplean el Gevo's Integrated Fermentation Technology (GIFT), tecnología patentada de un proceso integrado de producción de isobutanol por biocatálisis aunado a un proceso efectivo de separación. La fermentación es efectuada por una levadura genéticamente modificada que produce únicamente isobutanol a partir de glucosa y otros azúcares. Como materias primas se emplean actualmente semillas y cereales como maíz, sorgo, trigo y cebada.

Se está desarrollando además un sistema de procesamiento de biomasa celulósica: cellulosic butanol technology, que se planea emplear a futuro, esto permitirá el empleo de materias primas como bagazos, rastrojo, desperdicio de madera, residuos agrícolas, entre otros.

CAPACIDAD PRODUCTIVA:

La planta de Luverne, tiene la capacidad de producir 22 millones de galones de etanol por año. Se han realizado modificaciones a dicha planta para convertirla en una planta productora de isobutanol con una capacidad estimada de producción de 18 millones de galones de isobutanol por año. La planta comenzó a producir isobutanol a mediados de 2012.

PRODUCTOS PRINCIPALES:

- Gevo's Isobutanol, este producto cuenta ya con registro de EPA y está aprobado para ser empleado en mezclas con gasolina. Se comercializa actualmente también como solvente y para la industria de producción de plásticos y fibras.
- Biojet blendstock, el bioisobutanol generado se convierte en keroseno y es mezclado con combustibles para aviación.

- Gevo's etanol: inicialmente la planta de producción se construyó para producir bioetanol pero se está modificando para la generación de bioisobutanol.

1.4.3.5.3.2 COBALT TECHNOLOGIES

DESCRIPCIÓN GENERAL:

Es una empresa pionera en el desarrollo de tecnologías para la producción comercial de biobutanol renovable, como remplazo para productos derivados del petróleo. Además busca emplear el butanol para la generación de combustible para aviones, plásticos de base biológica y otros compuestos químicos. La empresa se ubica en Mountain View, California, en los Estados Unidos.

SITIO OFICIAL: www.cobalttech.com

SISTEMA DE PRODUCCIÓN:

Cobalt Technologies cuenta con un proceso continuo para convertir eficientemente materias primas diversas de bajo costo, como bagazo y residuos de madera, en biobutanol. Cobalt Technologies está comprometido con el uso de productos no alimenticios, materias primas celulósicas, y recientemente anunció sus planes para construir la primera planta industrial de biobutanol celulósico a escala.

Emplean el proceso fermentativo ABE con cepas de *Clostridium* no modificadas, pero con mejoras al proceso que permiten el aprovechamiento de residuos celulósicos. El proceso fermentativo, que se describe gráficamente en la figura 9, involucra una rápida descomposición de la biomasa en azúcares fermentables, empleo de bacterias optimizadas pero no genéticamente modificadas, biorreactor de diseño patentado que permite una alta productividad y bajo costo y además emplean residuos no fermentables como fuente de energía para abastecer el propio proceso de producción.

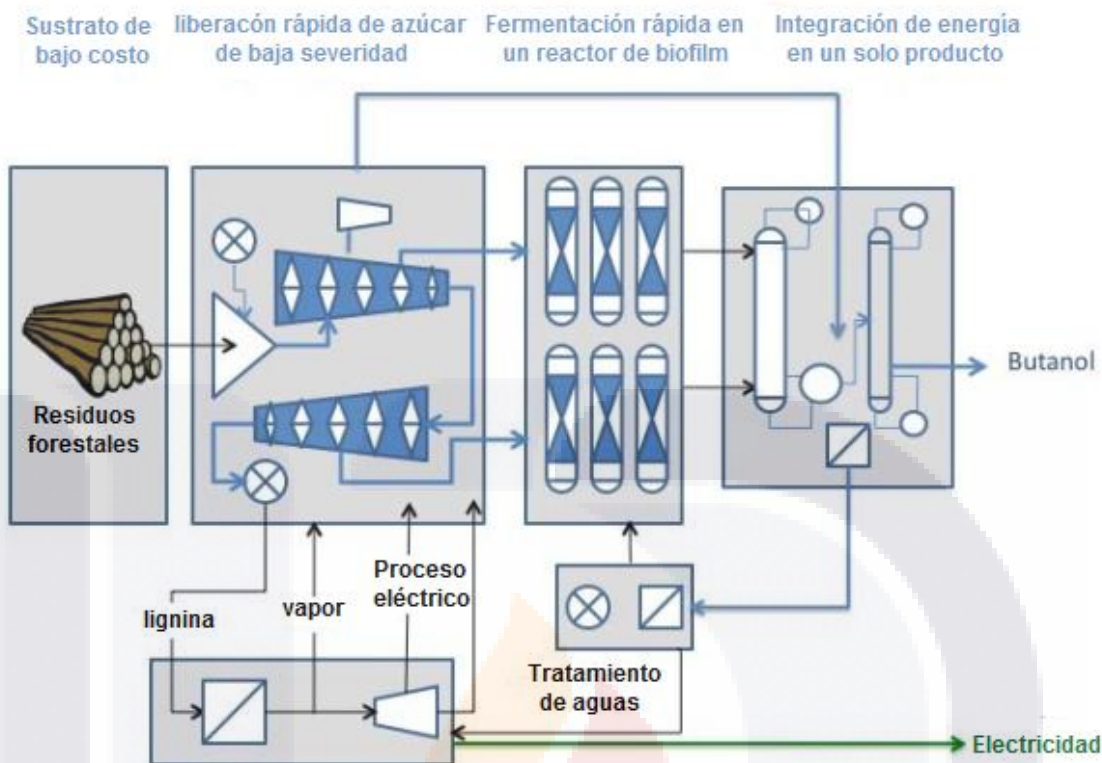


Figura 9. Proceso de producción de biobutanol empleado por Cobalt Technologies. (Modificado del sitio oficial de la empresa, Octubre 2012)

CAPACIDAD PRODUCTIVA:

Se tiene proyectada una producción de 1.5 millones de galones de biobutanol por año a partir del 2012.

PRODUCTO PRINCIPAL: Biobutanol producido a partir de residuos celulósicos.

1.4.3.5.3.3 BUTAMAX ADVANCED BIOFUELS

DESCRIPCIÓN GENERAL:

Butamax Advanced Biofuels, fue fundada en Julio de 2009. La empresa fue creada por la asociación de DuPont y British Petroleum. Se encuentra ubicada en Wilmington, Delaware, Estados Unidos y lleva más de 4 años desarrollando y probando nueva tecnología para el desarrollo de biocombustibles.

En el 2010 comenzó operaciones una planta para demostración de la tecnología desarrollada por la empresa (planta piloto), ésta se encuentra en Hull, Reino Unido, dentro de las instalaciones de British Petroleum.

Se planea tener una planta comercial en operación en Reino Unido para el año 2013 e iniciar la producción comercial en 2014.

SITIO OFICIAL: www.butamax.com

SISTEMA DE PRODUCCIÓN:

Butamax Advanced Biofuels ha desarrollado una tecnología de producción de biobutanol innovadora que ofrece un bajo costo y de alto valor para la generación de biocombustibles para el transporte. La tecnología de Butamax está diseñada para convertir los azúcares de diferentes materias primas de biomasa, como el maíz y la caña de azúcar, en biobutanol utilizando las instalaciones existentes para la producción de biocarburantes. Butamax tiene las patentes y solicitudes de patentes que cubren los microorganismos recombinantes, enzimas clave optimizadas para la conversión de los azúcares a biobutanol, así como procesos de fabricación, y aplicaciones de combustibles y productos químicos. Para el proceso fermentativo se emplea una cepa genéticamente modificada capaz de producir isobutanol.

Según Köpke et al. (2011) el producto conocido comercialmente como BUTAMAX no se produce por vía fermentativa sino que se obtiene de intermediarios de biosíntesis de aminoácidos, empleando como microorganismo productor una mutante de *E. coli* dotada con la descarboxilasa (Kivd) y la alcohol deshidrogenasa (Adh) procedentes de *S. cerevisiae*

CAPACIDAD PRODUCTIVA: la planta de producción comercial aún no se encuentra en operación y no se informa la capacidad que tendrá.

PRODUCTO PRINCIPAL: Isobutanol.

1.4.3.5.3.4 GREEN BIOLOGICS

DESCRIPCIÓN GENERAL:

Green Biologics (GBL) es una compañía global de biotecnología industrial con la capacidad de realizar una producción competitiva y eficiente de biobutanol y otros productos químicos de cuatro carbonos. La sede de la empresa se encuentra en Abingdon, Inglaterra y cuenta con una planta piloto de 500 litros (figura 10). En Estados Unidos GBL tiene presencia en Richmond, Virginia, y una planta piloto de 1100 litros en Columbus, Ohio. GBL también tiene sucursales en China, Brasil e India.



Figura 10. Plantas piloto de producción de biobutanol de la empresa Green biologics. A la izquierda se muestra la planta piloto de Ohio. A la derecha se muestra la planta piloto ubicada en Abingdon, Inglaterra. (Tomado del sitio oficial de la empresa, Octubre 2012)

GBL se centra en el empleo de biomasa lignocelulósica, como los residuos leñosos, bagazo de caña de azúcar, residuos de maíz y pastos de pradera. GBL también puede convertir los cultivos de azúcar, tales como la caña de azúcar y la melaza, sorgo dulce, remolacha y los cereales y los cultivos de almidón como el maíz y la mandioca en biobutanol y sus subproductos.

La compañía tiene en marcha proyectos comerciales en China e India y está evaluando varias opciones comerciales en Brasil y América del Norte. Recientemente absorbió a la compañía Butyl fuel, la cual producía n-butanol empleando cepas de *Clostridium* modificadas.

SITIO OFICIAL: www.greenbiologics.com

SISTEMA DE PRODUCCIÓN:

La tecnología de GBL se basa en la correcta combinación de la selección de materias primas, microorganismos y procesos involucrados en la fermentación ABE.

El programa de desarrollo de la cepa aísla, caracteriza y mejora microbios para el proceso de fermentación GBL. La empresa cuenta con una gran colección de cultivos de *Clostridium* y microorganismos termófilos. La colección representa una gran cantidad de potencial bioquímico para la producción de productos químicos renovables. A través de la genómica, las técnicas moleculares clásicas y avanzadas de biología, y la detección de las cepas se han adaptado, diseñado y seleccionado para el desarrollo comercial.

En referencia a la materia prima, la empresa ha desarrollado métodos de bajo costo para convertir la celulosa, hemicelulosa contenida en biomasa lignocelulósica, en azúcares de 5 y 6 carbonos que pueden ser digeridos para su posterior procesamiento. Esto ofrece la oportunidad de utilizar una amplia gama de materias primas para acceder a azúcares menos costosos.

Finalmente los programas de desarrollo de procesos están diseñados para maximizar el rendimiento del proceso de fermentación con cepas de GBL y materias primas que representen menor costo y con un mínimo impacto ambiental y social negativo.

GBL ha desarrollado una gama de soluciones avanzadas de fermentación para aumentar el rendimiento y la productividad de una gama de materias primas renovables. GBL también está desarrollando soluciones de proceso para la recuperación de producto *in situ*, así como la recuperación de agua para su reciclaje. Estos avances buscan reducir el consumo de energía y los impactos ambientales de la producción renovable de químicos industriales.

CAPACIDAD PRODUCTIVA:

La empresa ha producido más de 400 millones de galones de biocombustibles.

PRODUCTOS PRINCIPALES:

- Biobutanol grado químico: para producción de acrilatos, pinturas, lacas y solventes.
- Biobutanol como combustible.
- Acetona
- Ácido butírico

1.4.3.5.3.5 SYNTECBIOFUEL**DESCRIPCIÓN GENERAL:**

SyntecBiofuel es una empresa del estado de Washington cuyo programa de investigación y desarrollo de biocombustibles es operado por su subsidiaria canadiense; Tecnologías SyntecBiofuel, Inc, con domicilio en Vancouver, Canadá.

SyntecBiofuel Inc es una empresa de energía renovable que está desarrollando y comercializando tecnología patentada para la producción de combustibles de segunda generación y procesos para convertir los residuos de biomasa celulósica en etanol y otros alcoholes de alto valor.

SITIO OFICIAL: www.syntecbiofuel.com

SISTEMA DE PRODUCCIÓN:

La compañía emplea procesos termoquímicos para convertir biomasa en alcoholes (B2A). No se emplean microorganismos para la generación de los alcoholes. El proceso termoquímico desarrollado puede utilizar prácticamente cualquier material orgánico, tales como astillas de madera, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar, paja de trigo y así sucesivamente, para producir alcoholes de manera altamente sostenible y renovable. El diagrama del proceso de producción de los alcoholes se muestra en la figura 11.

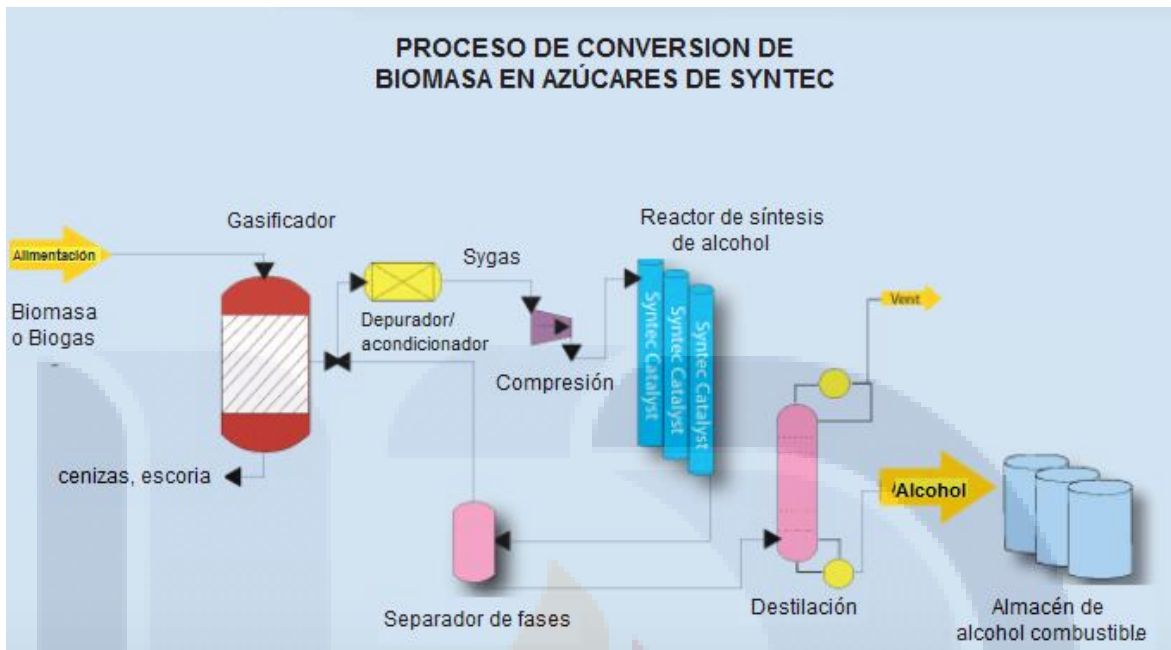


Figura 11. Proceso termoquímico de conversión de biomasa en azúcares empleado por SyntecBiofuel. (Modificado del sitio oficial de la empresa, Octubre 2012)

El proceso de producción se divide en tres etapas principales: gasificación, conversión y purificación. En la etapa de gasificación la biomasa es introducida a un gasificador, el cual rompe los enlaces químicos para producir syngas, una mezcla de gases compuesta principalmente por hidrógeno y monóxido de carbono. Posteriormente el syngas purificado es introducido a un sistema patentado de catálisis donde se genera la mezcla de bioalcoholes. Finalmente los alcoholes son destilados y separados.

PRODUCTOS PRINCIPALES:

- Etanol
- Metanol
- n- Propanol
- n- Butanol

1.4.3.5.3.6 BUTALCO

DESCRIPCIÓN GENERAL:

Empresa suiza enfocada en la producción de biobutanol empleando para ello levaduras genéticamente modificadas. Su planta se encuentra en Zug, Suiza.

SITIO OFICIAL: www.butalco.com

SISTEMA DE PRODUCCIÓN:

La tecnología empleada para la producción de biobutanol se basa en la utilización de levaduras *S. cerevisiae* genéticamente modificadas capaces de fermentar azúcares de 5 y 6 carbono, provenientes de biomasa lignocelulósica, para convertirlos en biobutanol. El esquema general del proceso productivo seguido por Butalco se muestra en la figura 12.

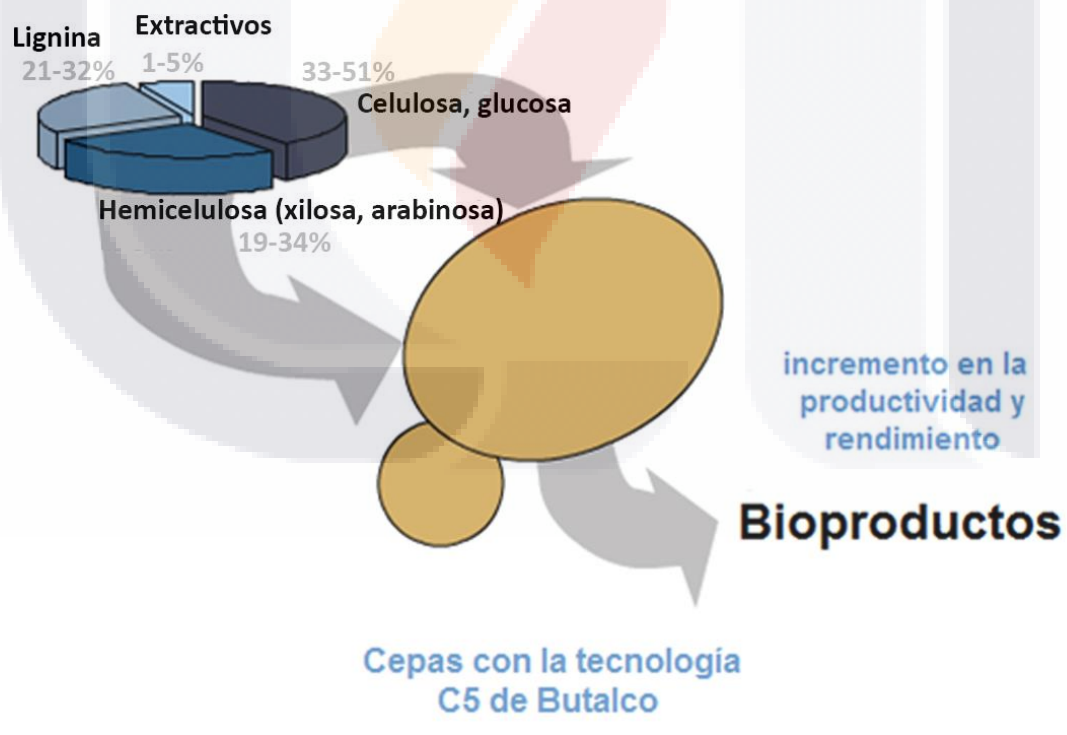


Figura 12. Proceso de producción de biobutanol empleando la tecnología Butalco (Modificado del sitio oficial de la empresa, Octubre 2012)

PRODUCTO PRINCIPAL: biobutanol

1.4.4 PRODUCCIÓN MICROBIOLÓGICA DE BUTANOL

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

Las cepas más usadas para la fermentación industrial ABE son *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum* y *Clostridium saccharobutylaceticum* (Dong et al., 2012) Las especies de *acetobutylicum* y *beijerinckii* son adecuadas para la fermentación acetona butanol a partir de maíz mientras que las *saccharobutylicum* y *saccharobutylaceticum* utilizan melaza como sustrato (Ni y Sun, 2009).

Además de estas 4 especies principalmente estudiadas, en los últimos años ha surgido el interés por una nueva especie productora de butanol cuya fuente de carbono es el glicerol: *C. pasteurianum*. La ventaja que presenta esta cepa, además del aprovechamiento del glicerol como única fuente de carbono, es que no produce acetona ni etanol; sus principales productos de la fermentación de azúcares son los ácidos orgánicos como el butírico y el acético. Produce butanol y puede producir 1,3-propanediol cuando emplea al glicerol como sustrato (Sabra et al., 2014).

Otras especies, que de manera natural no poseen la capacidad de producir este solvente, están siendo modificadas genéticamente para ser empleadas en la producción de biobutanol a nivel industrial y comercial. Las principales especies bajo este estudio son *E. coli* y *S. cerevisiae*.

Los microorganismos, sustratos y procesos fermentativos empleados por diversos investigadores para la producción de butanol se encuentran descritos en la tabla 4.

Tabla 4. Microorganismos y sustratos empleados en la fermentación ABE.

<i>Clostridium acetobutylicum</i>				
MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
ATCC 824 (microorganismo Weizman)	Glucosa	ABE (11.2 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Cultivo con células inmovilizadas en coque (residuo sólido).
	Glucosa	ABE (15.4 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en esponja.
	Suero de leche ácido con pH ajustado a 6.0 empleando NaOH	ABE (9.2 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en lote con duración de 120 horas. La proporción de solventes A:B:E fue de 1:13:4.4
	Glucosa (45.5 g/L)	ABE (8 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo con el nitrógeno como nutriente limitante. La productividad reportada fue de 0.31 g/L h.
	Glucosa y medio sintético en exceso	ABE (12 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo con nutrientes adicionados en exceso. La productividad reportada fue de 0.40 g/L h.
	Glucosa (de 50 a 100 g/L) y medio sintético en exceso	ABE (11.4 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo con nutrientes adicionados en exceso. La productividad reportada fue de 2.5 g/L h.
	Glucosa (40 g/L) y medio sintético en exceso	ABE (13 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo con nutrientes en exceso. Productividad 0.78 g/L h. El sistema puede mantenerse en operación hasta por 1400 horas

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
ATCC 824 (microorganismo Weizman)	Glucosa en medio sintético	Butanol (3.69 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo por lote con células inmovilizadas en alginato. La fermentación muestra los mismos parámetros fermentativos que al emplear células libres.
	Glucosa en medio sintético	Butanol (2.05 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo en camas con células inmovilizadas en alginato. El sistema está diseñado para que no se presente crecimiento celular.
	Glucosa en medio sintético	ABE (1.5 a 1.8 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo en un reactor cilíndrico con células inmovilizadas en alginato. Se registró una productividad de butanol de 0.7 g/L h.
	Glucosa en medio sintético	ABE (5 a 6 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo con células inmovilizadas en alginato por adhesión. Se registró una productividad para el butanol de 1.1 a 1.5 g/L h.
	Suero de leche desproteínizado adicionado con FeSO ₄	Acetona 0.00 ±0.00 g/L Etanol 5.11 ± 1.65 g/L Butanol 7.13 ± 1.53 g/L	Durán-Padilla, et al. (2014)	Fermentación por lote con duración de 168 horas. Rendimiento de 0.44 g de butanol por gramo de lactosa consumida. La proporción de solventes A:B:E fue de 0.0:5.87:4.13.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
ATCC 824 (microorganismo Weizman)	Caldo de maíz extruido (al 6%)	Butanol (7.9 g/L)	Lin y Blaschek (1983)	Fermentación por lote con duración de 96 horas.
	Caldo de maíz extruido (al 14%)	Butanol (12.6 g/L)	Lin y Blaschek (1983)	Fermentación por lote con duración de 96 horas. A esta dilución del caldo de maíz se presenta la formación de solventes B:A:E en una proporción de 59:35:6
	Caldo de maíz extruido (al 16 %)	Butanol (12.6 g/L)	Lin y Blaschek (1983)	Fermentación por lote con duración de 96 horas. A esta dilución del caldo de maíz se presenta la formación de solventes B:A:E en la mejor proporción alcanzada que fue de 61:32:7.
	Suero de leche hidrolizado y permeado	Butanol (3.2 g/L) Acetona (0.65 g/L) Etanol (no detectado) Acetato (2.30 g/L) Butirato (3.20 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 96 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.30 y final de 4.45. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 54.8%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 1.7:8.3:0.0
	Suero de leche hidrolizado y permeado	Butanol (3.4 g/L) Acetona (0.85 g/L) Etanol (0.15 g/L) Acetato (2.20 g/L) Butirato (1.95 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 52 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.30 y final de 4.50. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 57.5%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 1.9:7.7:0.4.
	Medio semisintético conteniendo lactosa	Butanol (0.60 g/L) Acetona (0.20 g/L) Etanol (0.10 g/L) Acetato (4.75 g/L) Butirato (4.40 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 96 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.50 y final de 4.28. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 31.3%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.2:6.7:0.1

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
ATCC 824 (microorganismo Weizman)	Medio semisintético conteniendo lactosa	Butanol (6.50 g/L) Acetona (1.90 g/L) Etanol (0.45 g/L) Acetato (1.90 g/L) Butirato (1.70 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 162 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.30 y final de 4.75. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 71.9%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.2:7.3:0.5.
	Medio semisintético conteniendo glucosa	Butanol (10.50 g/L) Acetona (3.40 g/L) Etanol (1.30 g/L) Acetato (0.90 g/L) Butirato (no detectado)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 88 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.40 y final de 4.45. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 100%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.2:6.9:0.9
	Medio semisintético conteniendo glucosa	Butanol (3.10 g/L) Acetona (1.20 g/L) Etanol (0.10 g/L) Acetato (3.60 g/L) Butirato (1.60 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 39 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.35 y final de 4.15. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 36.0%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.8:7.0:0.2.
	Medio semisintético conteniendo galactosa	Butanol (0.40 g/L) Acetona (0.20 g/L) Etanol (0.05 g/L) Acetato (4.70 g/L) Butirato (4.55 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 96 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.30 y final de 4.25. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 15.0%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 3.1:6.1:0.1
	Medio semisintético conteniendo galactosa	Butanol (1.60 g/L) Acetona (0.90 g/L) Etanol (0.25 g/L) Acetato (4.00 g/L) Butirato (2.75 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 101 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.35 y final de 4.40. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 24.0%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 3.3:5.8:0.9. Se reporta a la galactosa como una fuente de carbono pobre para la producción de solventes.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
ATCC 824 (microorganismo Weizman)	Medio semisintético conteniendo glucosa y galactosa	Butanol (5.00 g/L) Acetona (1.90 g/L) Etanol (0.20 g/L) Acetato (4.05 g/L) Butirato (1.50 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 144 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.25 y final de 4.55. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 50.0%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.7:7.0:0.3.
	Medio semisintético conteniendo glucosa y galactosa	Butanol (3.40 g/L) Acetona (1.00 g/L) Etanol (0.15 g/L) Acetato (4.20 g/L) Butirato (1.40 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 40 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.25 y final de 4.15. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 50.0%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.2:7.5:0.3.
	Suero de leche permeado hidrolizado con ácido sulfúrico	Butanol (0.90 g/L) Acetona (no detectado) Etanol (no detectado) Acetato (2.50 g/L) Butirato (3.10 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 78 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.55 y final de 4.05. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 24.1%.
	Suero de leche permeado hidrolizado con ácido sulfúrico	Butanol (1.0 g/L) Acetona (0.10 g/L) Etanol (no detectado) Acetato (2.35 g/L) Butirato (2.85 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 88 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.55 y final de 4.15. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 29.4%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 09:9.1:0. .
	Suero de leche permeado hidrolizado con ácido sulfúrico	Butanol (2.72 g/L) Acetona (0.74 g/L) Etanol (0.40 g/L) Acetato (1.90 g/L) Butirato (2.94 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 46 horas de duración. Realizada a 34°C, pH inicial de 6.15 y final de 4.50 (sin control de pH). El porcentaje de utilización de azúcares fue de 29.8%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 1.9:7.1: 1.0.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
ATCC 824 (microorganismo Weizman)	Biomasa lignocelulósica: desperdicio orgánico doméstico al 10%	ABE (3.3 g/L) Butanol (3.0 g/L)	Jang et al., (2012)	Fermentación por lote con duración de 120 horas. .Se reporta productividad de 0,03 g/l/h.
	Biomasa lignocelulósica: desperdicio orgánico doméstico hidrolizado al 10%	ABE (6.1 g/L) Butanol (4.2 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 120 hora. .Se reporta productividad de 0.03 g/l/h.
	Glucosa	Butanol (22.2 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación con recuperación <i>in situ</i> del butanol producido por absorción en resinas poliméricas. Se empleó la resina Dowex Optipore SD-2 (0.05 Jg/L). La concentración de butanol recuperada es superior a la concentración tóxica inhibitoria para la cepa empleada en el proceso fermentativo.
	Glucosa	Butanol	Jang et al. (2012)	Fermentación con un proceso de recuperación de solventes por pervaporación. La pervaporación se realiza con una membrana de soporte dual de polidimetilxilosano. La pervaporación ayuda a incrementar el aprovechamiento de la glucosa.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
<p>P 262 (cepa industrial empleada en la planta de producción de butanol en la planta de National Chemical Products en Germiston, Sudáfrica)</p>	Sucrosa de melazas	ABE (15 g/L)	Ennis (1987)	Cultivo continuo con células inmovilizadas en alginato. Registró una productividad de los solventes de 3.02 g/L h.
	Suero de leche hidrolizado y permeado	Butanol (7.0 g/L) Acetona (2.5 g/L) Etanol (no detectado) Acetato (0.90 g/L) Butirato (no detectado)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 39.2 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.35 y final de 4.70. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 55.4%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.6:7.4:0.0
	Suero de leche hidrolizado y permeado	Butanol (6.0 g/L) Acetona (1.60 g/L) Etanol (0.10 g/L) Acetato (1.00 g/L) Butirato (no detectado)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 33.6 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.35 y final de 4.85. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 51.7%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.1:7.8:0.1.
	Medio semisintético conteniendo lactosa	Butanol (6.70 g/L) Acetona (2.60 g/L) Etanol (0.15 g/L) Acetato (1.40 g/L) Butirato (0.50 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 96 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.70 y final de 5.25. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 51.9%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.8:7.1:0.1
	Medio semisintético conteniendo lactosa	Butanol (1.0 g/L) Acetona (0.50 g/L) Etanol (no detectado) Acetato (2.0 g/L) Butirato (2.25 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 96 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.70 y final de 5.0. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 10.8%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 3.3:6.7:0.0.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
<p>P 262 (cepa industrial empleada en la planta de producción de butanol en la planta de National Chemical Products en Germiston, Sudáfrica)</p>	Medio semisintético conteniendo glucosa	<p>Butanol (9.0 g/L) Acetona (3.40 g/L) Etanol (0.25 g/L) Acetato (0.75 g/L) Butirato (no detectado)</p>	Ennis (1987)	<p>Fermentación por lote con 58.4 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.55 y final de 4.90. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 80.0%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.7:7.1:0.2</p>
	Medio semisintético conteniendo glucosa	<p>Butanol (3.80 g/L) Acetona (2.60 g/L) Etanol (0.15 g/L) Acetato (1.60 g/L) Butirato (no detectado)</p>	Ennis (1987)	<p>Fermentación por lote con 41.6 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.55 y final de 5.15. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 36.0%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 4.0:5.8:0.2.</p>
	Medio semisintético conteniendo galactosa	<p>Butanol (7.10 g/L) Acetona (2.70 g/L) Etanol (0.20 g/L) Acetato (1.10 g/L) Butirato (no detectado)</p>	Ennis (1987)	<p>Fermentación por lote con 42.4 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.58 y final de 5.20. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 64.4%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.7:7.1:0.2 Se reporta buena producción de butanol empleando galactosa, contrario a lo observado con la cepa ATCC 824 en condiciones de fermentación similares.</p>
	Medio semisintético conteniendo galactosa	<p>Butanol (6.20 g/L) Acetona (2.00 g/L) Etanol (0.15 g/L) Acetato (1.30 g/L) Butirato (no detectado)</p>	Ennis (1987)	<p>Fermentación por lote con 28 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.58 y final de 5.68. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 54.5%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.4:7.4:0.2.</p>

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
<p>P 262 (cepa industrial empleada en la planta de producción de butanol en la planta de National Chemical Products en Germiston, Sudáfrica)</p>	Medio semisintético conteniendo glucosa y galactosa	Butanol 6.90 g/L Acetona (2.90 g/L) Etanol (0.30 g/L) Acetato (1.20 g/L) Butirato (no detectado)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 48 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.58 y final de 5.30. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 57.1%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.9:6.8:0.3.
	Medio semisintético conteniendo glucosa y galactosa	Butanol (2.90 g/L) Acetona (1.80 g/L) Etanol (0.10 g/L) Acetato (2.50 g/L) Butirato (0.80 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 120 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.50 y final de 4.98. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 31.0%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 3.8:6.0:0.2.
	Suero de leche permeado hidrolizado con ácido sulfúrico	Butanol (5.10 g/L) Acetona (1.80 g/L) Etanol (0.20 g/L) Acetato (1,20 g/L) Butirato (no detectado)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 62.4 horas de duración. Realizada a 30°C, pH inicial de 5.58 y final de 4.75. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 47.0%. La proporción de formación de solventes fue de 2.5:7.2:0.3.
	Suero de leche permeado hidrolizado con ácido sulfúrico	Butanol (5.70 g/L) Acetona (1.5 g/L) Etanol (0.20 g/L) Acetato (1.40 g/L) Butirato (no detectado)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 16.8 horas de duración. Realizada a 37°C, pH inicial de 5.58 y final de 5.05. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 48.3%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.0:7.7:0.3.
	Suero de leche permeado hidrolizado con ácido sulfúrico	Butanol (6.00 g/L) Acetona (1.95 g/L) Etanol (0.25 g/L) Acetato (1.10 g/L) Butirato (1.30 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con 46 horas de duración. Realizada a 34°C, pH inicial de 5.90 y final de 4.80. El porcentaje de utilización de azúcares fue de 46.2%. La proporción de formación de solventes A:B:E registrada fue de 2.4:7.3:0.3.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
P 262 (cepa industrial empleada en la planta de producción de butanol en la planta de National Chemical Products en Germiston, Sudáfrica)	Almidón de fécula (60 g/l)	ABE (18.9 %)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 75 horas.
SA-1 (Mutante generada a partir de ATCC 824. La mutante presenta una tolerancia al butanol 121% superior que la cepa original)	Caldo de maíz extruido (al 14%)	Butanol (13.9 g/L)	Lin y Blaschek (1983)	Fermentación por lote con duración de 96 horas. A esta dilución del caldo de maíz se presenta la formación de solventes B:A:E en una proporción de 64:29:7.
	Caldo de maíz extruido (al 4%)	Butanol (6.0 g/L)	Lin y Blaschek (1983)	Fermentación por lote con duración de 96 horas. A esta dilución del caldo de maíz se presenta la formación de solventes B:A:E en una proporción de 68:27:5.
	Caldo de maíz extruido (al 8 %)	Butanol (8.5 g/L)	Lin y Blaschek (1983)	Fermentación por lote con duración de 96 horas. A esta dilución del caldo de maíz se presenta la formación de solventes B:A:E en la proporción de 66:28:6.
JB200 (mutante generada a partir de ATCC 824, mutación adaptativa)	Bagazo de mandioca (44.8 g/l de glucosa)	ABE (15.4 g/L) Butanol (9.71 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 40 horas y productividad de solventes reportada de 0.24 g/l h.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
JB200 (mutante generada a partir de ATCC 824, mutación adaptativa)	Bagazo de mandioca (44.8 g/L de glucosa)	Butanol (76.4 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación en un reactor de cama fibrosa acoplado con arrastre con gas para la recuperación de productos. Se reporta una productividad de butanol de 0.29 g/L h.
	Glucosa (474.9 g/L)	Butanol (113.3 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote alimentado acoplada a un sistema de arrastre con gas. La fermentación tuvo una duración de 326 horas.
	Glucosa (86.4 g/l)	Butanol (19.1 g/L)	Xue et al. (2012)	Fermentación por lote sin acoplamiento a sistema de recuperación de productos, duración de 78 h. La productividad del butanol fue de 0.24 g/L h y su rendimiento de 0.21 g/g.
	Glucosa (474.9 g/L en total suministrada en 6 ciclos de alimentación)	ABE (172.1 g/L) Butanol (113.3 g/L) Acetona 49.2 g/L Etanol (9.7 g/L)	Xue et al. (2012)	Fermentación por lote alimentado con duración de 326 h. Sistema fermentativo acoplado a un Sistema intermitente de recuperación de productos por arrastre con gas. La productividad de ABE fue de 0.53 g/L h con un rendimiento de 0.36 g/g. La productividad del butanol fue de 0.35 g/L h con un rendimiento de 0.24 g/g.
PJC4BK	No mencionado	Butanol (26 g/L) IBE (35.6 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote alimentado con duración de 45 horas aplicando arrastre con gas para recuperación de productos. Se emplea una cepa mutante capaz de producir isopropanol en lugar de acetona.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
ATCC 4259	Glucosa (30 g/L) mezclada con glicerol (13 g/L)	ABE (9.2 g/L) Butanol (8.6 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación en cultivo continuo empleando un medio con dos fuentes de carbono. La fermentación tuvo una duración de 75 horas con una productividad de solventes reportada de 0.42 g/L h.
	Suero de leche permeado adicionado con extracto de levadura	Butanol (3.2 g/L) Ácido acético (3.2 g/L) Ácido butírico (5.8 g/L)	Päkkilä et al. (2009)	La fermentación se efectuó en un sistema anaeróbico con células inmovilizadas en gránulos de cuarzo con recirculación del caldo de cultivo
	Suero de leche adicionado con 5 g/l de extracto de levadura	ABE (9.4 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con duración de 96 horas. La proporción de solventes A:B:E fue de 1.7:8.3:0
NRRL 596	Suero de leche adicionado con 5 g/l de extracto de levadura	ABE (7.8 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con duración de 96 horas. La proporción de solventes A:B:E fue de 2.3:7.7:0
NRRL-B-643	Glucosa	ABE (4.91 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en carragenina
ATCC 55025	Glucosa adicionada con ácido butírico	Butanol (5.1 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en una matriz fibrosa

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
NCBI 2951	Suero de leche ácido permeado adicionado con 5 g/L de extracto de levadura y NH ₄	ABE (17.0 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con duración de 120 horas. La proporción de solventes A:B:E fue de 1:10:1
	Suero de leche ácido permeado adicionado con 5 g/L de extracto de levadura y NH ₄	ABE (11.3 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con duración de 48 horas. La proporción de solventes A:B:E fue de 1.5:8:0.5
	Lactalbumina sérica adicionada con 10 g/L de extracto de levadura y NH ₄	Butanol (8.4 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con duración de 111 horas.
DSM 1731 (96% similar en ADN a ATC 824)	Maíz	ABE(14.4 g/L) Butanol (9.6 g/L)	Patakova et al. (2011)	La productividad reportada de solventes es de 0.20 g/L h.
	Glucosa (54 g/L)	ABE (5 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo a pH inicial de 5.2 y teniendo como nutriente limitante al nitrógeno. La productividad reportada fue de 0.95 g/L h
	Glucosa (54 g/L)	ABE (18.2 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo teniendo como nutriente limitante al fósforo. La productividad reportada fue de 0.55 g/L h

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
DSM 1731 (96% similar en ADN a ATC 824)	Glucosa (300mM)	Butanol (130 mM) Acetona (74 mM) Etanol Ácido acético Ácido butírico	Bahl, Andersch y Gottschalk (1982)	Fermentación en cultivo continuo ($D=0.025h^{-1}$) en un medio con fosfato limitado, el 20% de los azúcares alimentados no fueron convertidos a ácidos ni solventes.
	Glucosa	Butanol Acetona Etanol Ácido acético Ácido butírico	Bahl et al. (1982)	Fermentación en cultivo continuo multietapa. Etapa 1 ($D=0.125h^{-1}$, $37^{\circ}C$) y etapa 2 ($D=0.04h^{-1}$, $33^{\circ}C$), el 100% de los azúcares alimentados se consumen. 87.5% son convertidos en butanol, etanol y acetona, el restante 12.5% son aprovechados para el crecimiento celular y la producción de ácidos.
DSM1731 mutante pITAB (productora de glutatión)	No especificado	ABE (19.7 g/L) Acetona (3.7 g/L) Butanol (14.8 g/L) Etanol (1.2 g/L)	Zhu et al. (2011)	Fermentación por lote con duración de 64 horas empleando una mutante súper productora de butanol y aerotolerante. La cepa mutante produjo 66% más butanol que la cepa original de donde fue obtenida.
DSM 792	Lactosa	ABE(5.19 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en anillos plásticos
	Lactosa (50 g/l)	Acetona (≈ 0.25 g/L) Etanol (≈ 0.1 g/L) Butanol (≈ 3.0 g/L) Ácido acético (≈ 0.8 g/L) Ácido butírico (≈ 1.2 g/L)	Napoli et al. (2009)	Cultivo por lote con duración de 140 horas en un caldo sintético conteniendo lactosa, extracto de levadura y $CaCO_3$ simulando suero de leche, temperatura $35^{\circ}C$. A 22 horas de montado el cultivo se marca el inicio de la solventogénesis. Velocidad específica de crecimiento $\mu=0.29h^{-1}$, rendimiento de conversión de lactosa a solventes de 0.20 y rendimiento de conversión de lactosa a butanol de 0.17. Conversión total de lactosa de 34%. Tasa de producción de butanol de 80mg butanol/gbiomasa h.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
DSM 792	Lactosa (50 g/L)	Acetona (2.6 g/L) Etanol (0.54 g/L) Butanol (9.9 g/L) Ácido acético (0.52 g/L) Ácido butírico (2.3 g/L)	Napoli et al. (2009)	Cultivo continuo con duración de 340 horas en un caldo sintético conteniendo lactosa, extracto de levadura y CaCO ₃ simulando suero de leche, temperatura 35°C, D=0.04 h ⁻¹ . Conversión total de lactosa del 90%. Tasa de producción de butanol de 75 mgbutanol/gbiomasa h. El butanol representa el 70% de los solventes producidos.
	Lactosa (15 g/l en la alimentación)	Acetona (0.18 g/L) Etanol (0.05 g/L) Butanol (1.20 g/L) Ácido acético (0.53 g/L) Ácido butírico (2.12 g/L)	Napoli et al. (2010)	Cultivo continuo con células inmovilizadas en un reactor empacado con anillos plásticos hidrofóbicos. El medio de cultivo contiene lactosa y extracto de levadura para simular suero de queso. D= 0.54h ⁻¹ . pH= 4.34. Productividad del etanol 0.03 g/lh; acetona 0.10 g/lh; butanol 0.65 g/lh.
	Lactosa	Acetona (0.26 g/L) Butanol (0.71 g/L) Etanol (6.42 g/L) Ácido acético (13.1 g/L) Ácido butírico 10.47 g/L)	Foda et al.(2010)	Concentración de productos en el caldo de fermentación tras 50 horas de cultivo batch.
	Lactosa	Acetona (0.52 g/L) Butanol (0.71 g/L) Etanol (4.94 g/L) Ácido acético(13.41 g/L) Ácido butírico(10.87 g/L)	Foda et al. (2010)	Concentración de productos en el caldo de fermentación tras 75 horas de cultivo batch.
	Suero de leche	Butanol (1.5 g/L)	Foda et al. (2010)	Fermentación en cultivo por lote con duración de 5 días. La producción de butanol comienza con 1 día de incubación del caldo de fermentación y luego se incrementa de manera lineal. La fermentación fue efectuada a 37°C con control de pH a 5.0 y agitación de 150 rpm.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
AS 1.224 (mutante generada a partir de DSM 792)	Lactosa	Acetona (0.52 g/L) Butanol (0.01 g/L) Etanol (2.13 g/L) Ácido acético (0.66 g/L) Ácido butírico (0.59 g/L)	Foda et al. (2010)	Concentración de productos en el caldo de fermentación tras 50 horas de cultivo batch.
	Lactosa	Acetona (0 g/L) Butanol (0 g/L) Etanol (4.38 g/L) Ácido acético (2.56 g/L) Ácido butírico (0 g/L)	Foda et al. (2010)	Concentración de productos en el caldo de fermentación tras 75 horas de cultivo batch.
IBUN IV	Medio industrial (17 g/L de fuente de carbono)	ABE (0.59 g/L)	Silva et al. (1995)	Fermentación efectuada en células inmovilizadas en mica moscovita en un sistema fermentativo en dos columnas empacadas. Se alcanzó una productividad de 11.98 g/Ldía.
B3	Glucosa (60 g/L)	ABE (130.7 g/L) Acetoína	Liu et al. (2014)	Fermentación en lote en un reactor de biofilm integrado con un sistema de recuperación de productos <i>in situ</i> por adsorción en resina KA-I. La productividad de los solventes totales fue de 1.5 g/L h.
<i>C. beijerinckii</i>				
NCIMB 8052	Azúcares	ABE (6.7 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Se registró que la adición de ácido acético incrementa la productividad y previene la degeneración de la capacidad productiva de la fermentación ABE.
	Azúcares adicionadas con ácido acético	ABE (17.8 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
NCIMB 8052	Glucosa adicionada con ácido butírico	Butanol (13.4 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en alcohol polivinílico poroso
	Glucosa	ABE (8.2 g/L) Butanol (6.7 g/L)	Parekh y Blaschek (1999)	Fermentación por lote a base de agua de lavado de maíz, adicionada con glucosa.
NCIMB 8052	Galactosa	ABE (2.0 g/L) Butanol (2.0 g/L)	Parekh y Blaschek (1999)	Fermentación por lote a base de agua de lavado de maíz, adicionada con galactosa. Según los resultados reportados esta cepa microbiana, al tener galactosa como su única fuente de carbono, estaría produciendo únicamente butanol y no el resto de los solventes.
	Lactosa	ABE (3.7 g/L) Butanol (3.5 g/L)	Parekh y Blaschek (1999)	Fermentación por lote a base de agua de lavado de maíz, adicionada con lactosa.
	Sucrosa	ABE (8.0 g/L) Butanol (6.9 g/L)	Parekh y Blaschek (1999)	Fermentación por lote a base de agua de lavado de maíz, adicionada con lactosa.
BA 101 (mutante derivada de NCIMB 8052)	Glucosa	Butanol (232.8 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Proceso de producción acoplado arrastre con gas alcanzando productividad de ABE de 1.16 g/l h.
	Glucosa	ABE (9.2 g/L) Butanol (7.2 g/L)	Parekh y Blaschek (1999)	Fermentación por lote a base de agua de lavado de maíz, adicionada con glucosa.
	Galactosa	ABE (2.1 g/L) Butanol (2.1 g/L)	Parekh y Blaschek (1999)	Fermentación por lote a base de agua de lavado de maíz, adicionada con galactosa. Según los resultados reportados esta cepa microbiana, al tener galactosa como su única fuente de carbono, estaría produciendo únicamente butanol y no el resto de los solventes.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
BA 101 (mutante derivada de NCIMB 8052)	Lactosa	ABE (4.1 g/L) Butanol (4.6 g/L)	Parekh y Blaschek (1999)	Fermentación por lote a base de agua de lavado de maíz, adicionada con lactosa.
	Almidón de maíz licuado	ABE (81 g/L) Acetona (24 g/L) Butanol (56 g/L) Etanol (1 g/L)	Demain (2009)	Cultivo continuo con separación de productos por arrastre con gas.
	Almidón de maíz licuado (44.9 g/l de glucosa)	ABE (18.4 g/L) Butanol (13.4 g/L)	Jang et al. (2012)	Cultivo por lote con duración de 120 y productividad reportada de 0.11 g/l h.
	Almidón de maíz licuado sacarificado (45.7 g/l de glucosa)	ABE (18.2 g/L) Butanol (13.4 g/L)	Jang et al. (2012)	Cultivo por lote con duración de 78 y productividad reportada de 0.17 g/l h.
	Melazas de soya secas 80 g/l (34.7 g/l de azúcar)	ABE (10.7 g/L) Butanol (8 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 96 horas. Productividad reportada de 0.08 g/l h.
	Cacahuates empacados (80g/l)	ABE (18.9 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación en cultivo por lote con duración de 110 horas.
	Azúcares	ABE (6.1 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Se registró que la adición de ácido acético incrementa la productividad y previene la degeneración de la capacidad productiva de la fermentación ABE.
	Azúcares adicionados con ácido acético	ABE (20.8 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
BA 101 (mutante derivada de NCIMB 8052)	Glucosa	ABE (8.1 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en ladrillo. Reporto una productividad de 16.2 g/Lh
	Fibra de maíz tratada con ácido sulfúrico diluido (23.6 g/L de azúcar)	ABE (9.3 g/L) Butanol (6.4 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 88 horas y productividad reportada de 0.07 g/ L h.
	Glucosa	ABE (120 g/L)	Qureshi y Blaschek (2001)	Fermentación por lote alimentado con recuperación de productos por arrastre con gas.
	Concentrado de lactosa de suero de leche permeado	ABE (136.58 g/L)	Qureshi y Maddox (2005)	Fermentación en lote acoplada a un método de recuperación de productos por perstracción. Aplicando el mismo método de perstracción bajo las mismas condiciones pero en lote alimentado sólo se logra un rendimiento de 57.8 g/L de ABE. La productividad del sistema de recuperación por Perstracción es de 0.21 g/L h.
	Glucosa	ABE (165.1 g/L)	Qureshi y Blaschek (2000)	Fermentación por lote alimentado acoplada a recuperación de productos por pervaporación con una membrana de silicón. Sin utilizar el sistema de recuperación la productividad máxima de ABE es de 25.3 g/L (0.98 g/Lh).
	Glucosa	ABE (75.9 g/L)	Ezeji et al. (2004)	Fermentación por lote acoplada a recuperación de productos por arrastre con gas, utilizando H ₂ y CO ₂ como gas acarreador. El mismo sistema fermentativo sin la recuperación con el gas sólo produce 17.6 g/L de solventes totales.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
BA 101 (mutante derivada de NCIMB 8052)	Glucosa (500 gramos en total)	ABE (232.8 g/L) Acetona (77.7 g/L) Butanol (151.7 g/L) Etanol (3.4 g/L)	Ezeji et al. (2004)	Fermentación por lote alimentado con recuperación de productos <i>in situ</i> por arrastre con gas empleando H ₂ y CO ₂ como gas acarreador y un condensador a 2°C. Volumen del lote 1L. El mismo sistema de lote alimentado sin la recuperación <i>in situ</i> sólo logra producir 17.6 g/L de solventes. Rendimiento del total de solventes fue de 0.47 g/g y la productividad de 1.16 g/L h.
	Glucosa (43.8 g)	ABE (13.5 g)	Qureshi et al. (2005)	Fermentación batch con productividad de 0.40 g/L h y rendimiento ABE de 0.31 g/L.
	Glucosa (73.3 g)	ABE (23.2 g)	Qureshi et al. (2005)	Fermentación batch con recuperación de productos <i>in situ</i> por adsorción en polivinil piridina con productividad de 0.92 g/L h y rendimiento ABE de 0.32 g/L.
	Glucosa (190 g)	ABE (59.8 g)	Qureshi et al. (2005)	Fermentación batch alimentada con recuperación de productos <i>in situ</i> por adsorción en polivinil piridina con productividad de 1.33 g/L h y rendimiento ABE de 0.32 g/L.
	Glucosa (1198.5 g)	ABE (387.3 g)	Qureshi et al. (2005)	Fermentación batch alimentada en ciclos repetidos de alimentación, con recuperación de productos <i>in situ</i> por adsorción en polivinil piridina con productividad de 1.69 g/L h y rendimiento ABE de 0.32 g/L.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
LMD 27.6	Lactosa	ABE (1.43 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en alginato de calcio
	Glucosa	ABE (2.4 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en alginato de calcio
	Suero de leche permeado adicionado con 10 g/L de extracto de levadura y NH ₄	ABE (5.0 g/L) isopropanol	Ennis (1987)	Fermentación por lote con duración de 100 horas. La proporción de solventes A:B:E fue de 2:8:0
	Glucosa	ABE (menor a 1 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo con una productividad de 0.06 g/L h
	Glucosa en medio sintético	ABE (7 a 8 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo en un reactor de camas empacadas con células inmovilizadas en alginato. Se registra una productividad de 0.6 a 0.8 g/L h de los solventes.
	Glucosa en medio sintético	ABE	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo en un reactor de tanque agitado con células inmovilizadas en alginato. Se registra una productividad de solventes de 4.0 g/L h.
	Glucosa en medio sintético	ABE	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo en un reactor de tanque agitado con células inmovilizadas en alginato acoplado a un sistema de recuperación de solventes por pervaporación. Se registra una productividad de solventes de 1.0 g/L h.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
LMD 27.6	Lactosa de suero permeado	ABE (2-3 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación en cultivo continuo en un tanque agitado con células inmovilizadas en alginato. Se registra una productividad de solventes de 1.0 g/L h.
CCM 6182 – ATCC 17795	Jugo de remolacha azucarera	ABE (16.2 g/L) Butanol (11.6 g/L)	Patakova et al. (2011)	Productividad registrada de 0.40 g/L h.
ATCC 55025	Hidrolizado de granos de trigo	Butanol (8.8 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 72 horas y productividad reportada de 0.12 g/L h.
	Glucosa	ABE (5.1 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en tallo de maíz
P 260	Paja de trigo hidrolizada 86 g/l (60.2 g/l total de azúcar)	ABE (25 g/L) Butanol (12.0 g/L)	Jang et al. (2012)	Alta producción total de solventes, aunque la fracción correspondiente al butanol no es tan elevada. Fermentación por lote con duración de 42 horas y productividad reportada de 0.19 g/L h.
	Paja de cebada nixtamalizada (63.4 g/l de azúcar)	ABE (26.6 g/L) Butanol (18 g/L)	Jang et al. (2012)	Alta producción total de solventes con buena fracción correspondiente a butanol. Fermentación por lote con duración de 68 horas y productividad de 0.26 g/L h.
	Rastrojo de maíz hidrolizado (37.3 g/l de azúcar)	ABE (16.0 g/L) Butanol (10.4 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 96 horas y productividad de 0.11 g/L h.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
P 260	Hidrolizado de pasto nixtamalizado	ABE (26.3 g/L) Butanol (14.5 g/L)	Jang et al. (2012)	Alta producción total de solventes, la fracción correspondiente al butanol no es tan elevada. Fermentación por lote con duración de 85 horas y productividad reportada de 0.17 g/Lh.
	No reportado	Butanol	Jang et al. (2012)	Volumen de fermentación de 7 L. Proceso aplicando vacío de manera continua y con intervalos de 4, 6 y 8 horas. Para el sistema continuo se tiene una producción de 76.4 g de butanol con una productividad de 0.23 g/L h. Para el intervalo de 4 horas producción de 85.1 g y productividad de 0.27 g/L h. Para el intervalo de 6 horas producción de 103 g y productividad de 0.23 g/L h. Finalmente para el intervalo de 8 horas producción de 84.6 gramos de butanol y productividad de 0.19 g/Lh.
<i>C. saccharobutylicum</i>				
NCP 262	Lactosa	ABE (4.1 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en carbón de hueso.
	Almidón	ABE (7.32 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en perlas.
	Grano de destilería secos pretratados en una solución ácida.	ABE (12.1 g/L) Butanol (7.3 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 120 horas. Productividad reportada de 0.06 g/L h.
spoA2	Sucrosa	Butanol (8.37 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Células inmovilizadas en alginato de calcio.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
<i>C. saccharoperbutylacetikum</i>				
N 1-4	Glucosa (20 g/L) adicionada con ácido láctico (5 g/L)	Butanol (12.6 g/L batch) (15.5 g/L fed-batch)	Tashiro y Sonomoto (2010)	Proceso con pH del medio controlado a 5.5
	Hidrolizado de hojuelas de mandioca (62.6 g/L)	ABE (23.1 g/L) Butanol (16.4 g/L)	Jang et al. (2012)	Alta producción total de solventes, con una buena fracción correspondiente a butanol. Fermentación por lote con duración de 36 horas y productividad reportada de 0.46 g/L h.
	Almidón de mandioca (48.5 g/L)	ABE (21.0 g/L) Butanol (16.9 g/L)	Jang et al. (2012)	Alta producción total de solventes, con una buena fracción correspondiente a butanol. Fermentación por lote con duración de 48 horas y productividad reportada de 0.35 g/L h.
	Salvado de arroz	Butanol (7.7 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 128 horas. Productividad de 0.06 g/L h.
	10 % alga pretratada en soluciones ácido- base.	ABE (2.8 g/L) Butanol (2.3 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 96 horas. Productividad de 0.02 g/L h.
	Glucosa y ácido láctico	Butanol (15.5 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote alimentado con adición continua de los sustratos. Productividad de 1.76 g/L h.
<i>C. pasteurianum</i>				
NRRL B-589	Glucosa	ABE (11.8 g/L) Butanol (7.3 g/L)	Patakova et al. (2011)	La productividad reportada es de 0.23 g/L h.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
No se reporta cepa específica	Glicerol	ABE	Tashiro y Sonomoto (2010)	Es la única especie del género que ha demostrado aprovechar el glicerol como fuente de carbono para la generación de los solventes de interés.
ATCC 6013	Glicerol (21.5 g/L)	BE y 1,3-PDO (18.3 g/L) Butanol (7.8 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 240 horas. Productividad reportada de 0.03 g/L h. Durante la fermentación se produce butanol etanol y 1,3-propanediol.
DSMZ 525	Glicerol (24 g/L)	Butanol (6.2 – 7.2 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con 41 horas de duración. Productividad aproximada de 0.16 g/L h.
	Glicerol y glucosa (1:1)	Butanol (21.1 g/L) 1-3propanedio (5.2 g/L)	Sabra et al. (2014)	Fermentación por lote utilizando sustrato mixto de glucosa y glicerol. Rendimiento de butanol de 0.23 g por gramo de sustrato. Productividad de 0.96 g/L h.
MBEL_GLY2	Glicerol (82 g/l)	BE y 1,3-PDO (27.0 g/L) Butanol (17.8 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote que muestra alta producción de solventes con una buena fracción correspondiente a butanol. Se reporta una productividad de 0.43 g/L h.
	Glicerol	BE y 1-3 PDO	Jang et al. (2012)	Fermentación en cultivo continuo con duración de 710 horas sin degeneración de la cepa. La fermentación se realizó reciclando un alto contenido de células. Productividad reportada de 7.8 g/L h.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
No se reporta cepa específica	Biomasa de alga adicionada con 4% de glicerol.	BE y 1,3-PDO (14 a 16 g/L)	Jang et al. (2012)	No se presentan detalles de la fermentación.
<i>C. butylicum</i>				
NRRL 592	Suero de leche ácido permeado adicionado con 5 g/L de extracto de levadura	ABE (11.2 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con duración de 120 horas. La proporción de solventes A:B:E fue de 2.2:7.6:0.2
	Suero de leche adicionado con 5 g/L de extracto de levadura	ABE (7.2 g/L)	Ennis (1987)	Fermentación por lote con duración de 96 horas. La proporción de solventes A:B:E fue de 2.4:7.6:0
	Agua caliente de pretratamiento de granos secos de destilería (48.8 g/L de azúcar)	ABE (12.9 g/L) Butanol (7.0 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 72 horas. Productividad de 0.10 g/L h.
NRLL 592	Granos secos de destilería pretratados (41.4 g/L de azúcar)	ABE (11.6 g/L) Butanol (7.0 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote con duración de 72 horas. Productividad de 0.10 g/L h.
TISTR 1032	Almidón	Butanol (6.5 g/L)	Jang et al. (2012)	Fermentación por lote en co-cultivo con <i>Bacillus subtilis</i> , productor de amilasas.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
OTROS CLOSTRIDIOS				
GBL clostridia	Xylosa (50 g/L)	ABE (16 g/L) Butanol (13.4 g/L) CO ₂ H ₂	Wadrop (2010)	Clostridios pertenecientes a Green Biologics utilizados para producir y comercializar compuestos de 4 carbonos, especialmente el butanol.
<i>C. tyrobutyricum</i>	No reportado	Ácido butírico principalmente	Patakova et al. (2011)	No se reportan detalles de la fermentación.
<i>C. tyrobutyricum</i> combinado con <i>C. acetobutylicum</i>	Azúcares	Butanol (4.64 g/L/h)	Shapovalova y Ashkinazi (2008)	La fermentación se realiza en dos etapas, la acidogénesis la realiza <i>C. tyrobutyricum</i> y la solventogénesis <i>C. acetobutylicum</i> .
<i>C. carboxidivorans</i>	Monóxido de carbono (Syngas)	ABE (0.009 g/L) Butanol (0.006 g/L)	Jang et al. (2012)	No se presentan detalles de la fermentación.
<i>C. ljungdahlii</i>	Syn gas	Etanol	Köpke et al. (2011)	No se reportan detalles de la fermentación.
<i>Clostridium sp.</i> BOH3	Glucosa (90 g/L)	Butanol (18.7 g/L)	Li et al. (2014)	Fermentación por lote en un reactor con pH controlado y un cambio de pH para favorecer a cada etapa de la fermentación. 6 horas a pH 6, posteriormente se deja bajar el pH de manera natural a 5 y se mantiene en 5 por el resto de la fermentación. Se adiciona ácido nicotínico al medio de cultivo a una concentración final de 10 mg/l como precursor de NADH y NADPH para alcanzar en el cultivo un balanceo redox que favorezca e incremente la producción de butanol. El rendimiento de butanol en la fermentación es del 24.6%, con una productividad de 0.26 g/Lh.

MICROORGANISMO	SUSTRATO (fuente de carbono)	PRODUCTOS y RENDIMIENTOS	REFERENCIA	OBSERVACIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO
MICROORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA SER PRODUCTORES DE ABE				
<i>E. coli</i>	No reportado	Butanol Isobutanol Otros alcoholes	Köpke et al.(2011)	Mutante con descarboxilasa (Kivd) y alcohol deshidrogenasa (Adh) procedente de <i>S. cerevisiae</i> .
<i>S. cerevisiae</i>	Glucosa y otros azúcares simples.	Isobutanol	Gevo (2012)	Cepa mutante modificada y empleada por la empresa Gevo para la producción y comercialización de isobutanol.
<i>S. cerevisiae</i>	Azúcares de 5 y 6 carbonos provenientes de biomasa lignocelulósica.	Butanol	Butalco (2012)	Cepa mutante modificada y empleada por la empresa Butalco para la producción y comercialización de biobutanol.
<i>S. cerevisiae</i>	No reportado	Butanol(0.0025 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	No se reportan detalles de la fermentación.
<i>Pseudomona pútida</i>	No reportado	Butanol (0.112 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	No se reportan detalles de la fermentación.
<i>Bacillus subtilis</i>	No reportado	Butanol (0.024 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	No se reportan detalles de la fermentación.
<i>Lactobacillus brevis</i>	No reportado	Butanol (0.3 g/L)	Tashiro y Sonomoto (2010)	No se reportan detalles de la fermentación.
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	CO ₂	Butanol	Niemistö et al. (2013)	Cianobacteria genéticamente modificada que contiene los genes para la expresión de 5 enzimas necesarias para la conversión de acetyl-CoA a 1-Butanol. Utiliza únicamente CO ₂ y luz para la producción del solvente.

ABE: reporta el rendimiento global en producción de los tres solventes: acetona, butanol y etanol.

IBE: reporta el rendimiento global de producción de solventes: isopropanol, butanol y etanol.

BE y 1-3 PDO reporta el rendimiento global en producción de butanol , etanol y 1-3 propanediol.

1.4.4.1 PRODUCCION DE BUTANOL EMPLEANDO *C. acetobutylicum*

C. acetobutylicum es una especie anaeróbica obligada, con forma de bastón, heterofermentativa y formadora de endoesporas (Gheshlaghi et al., 2009). Es la especie más estudiada de su género, la secuencia completa de su genoma fue liberada en el 2001; posee un cromosoma de 3.94 Mbp y un mega plásmido pSOL1 de 192 Kbp que contiene la mayoría de los genes responsables de la producción de solventes (Nölling et al., 2001). En cepas silvestres éste plásmido resulta indispensable para la solventogénesis (Lee et al., 2008).

La producción de butanol por *Clostridium* es catalizada por diversas enzimas: una acetato/butirato CoA transferasa, varias deshidrogenasas y una acetato descarboxilasa, como se muestra en el flujo general de la figura 13. Los genes que codifican para estas enzimas se encuentran agrupados en operones activados por sustrato. Durante el proceso de producción de butanol con *Clostridium* se presenta, entre otros, un cambio fisiológico importante en la bacteria: los ácidos acético y butírico son liberados al medio durante la fase de crecimiento exponencial los cuales son reabsorbidos al interior de la célula, para ser metabolizados a butanol, acetona y, en mucho menor medida en etanol. Dependiendo de las condiciones de cultivo y el tipo de sustrato empleado, las fermentaciones tipo lote empleando *C. acetobutylicum* toman de 2 a 6 días en completarse, la concentración final total de solventes producidos alcanza de 12 a 20 g/L, los cuales pueden ser luego separados del medio de fermentación (Lee et al., 2008).

1.4.4.1.1 BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN CON *Clostridium acetobutylicum*

El género *Clostridium* posee microorganismos capaces de convertir diversas fuentes de carbono, como los monosacáridos: glucosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa y disacáridos como la celobiosa y la lactosa, en combustibles y químicos de interés. Algunas de las rutas metabólicas involucradas en la generación de estos productos son actualmente conocidas y ampliamente estudiadas (Ennis, 1987).

Una representación esquemática general de la ruta metabólica para la fermentación de glucosa y galactosa por parte de las bacterias butíricas y las enzimas asociadas para la producción de solventes, ácidos, hidrógeno y CO₂ se observa en la figura 13.

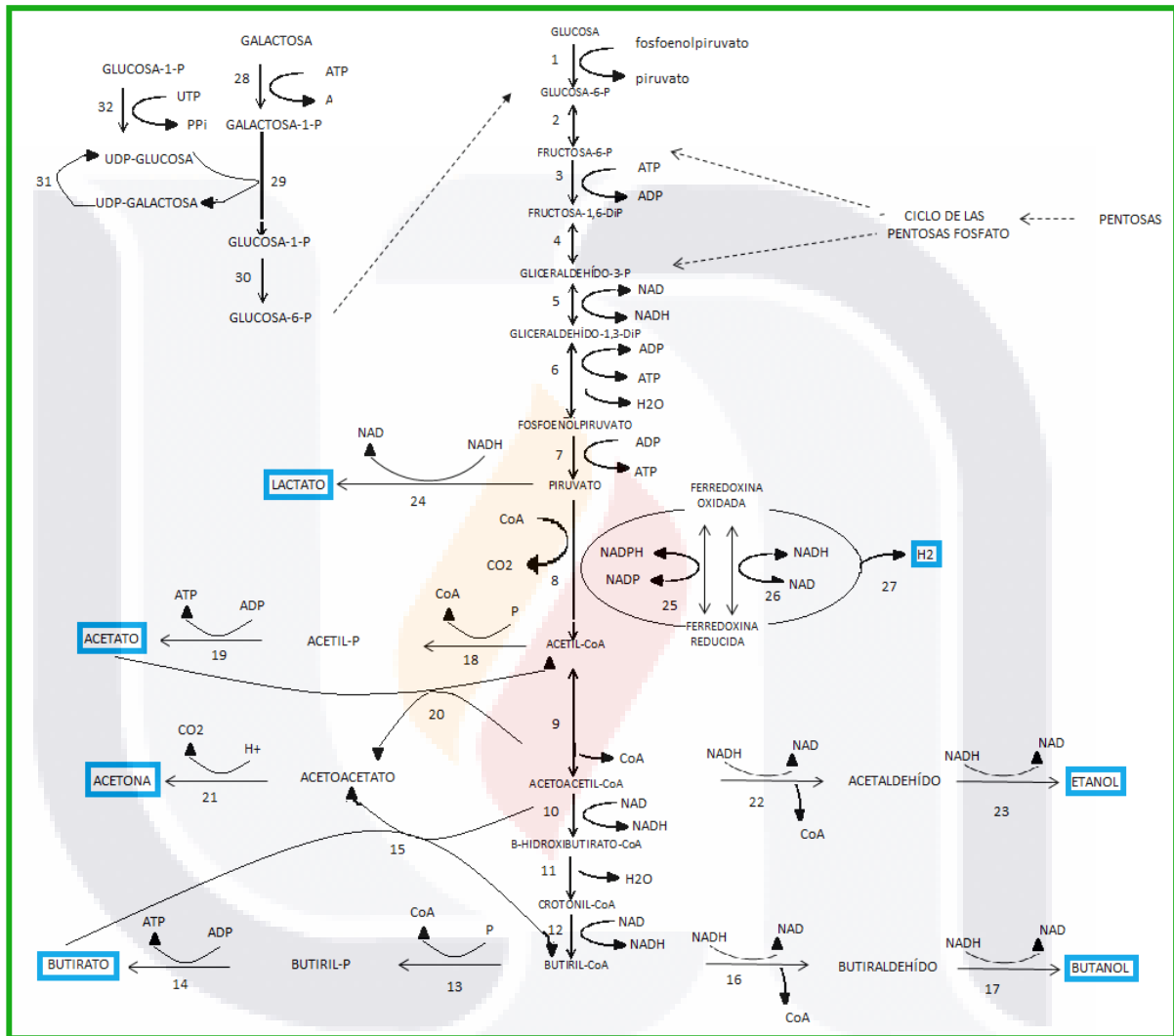


Figura 13. Vías fermentativas de *C. acetobutylicum*: los productos extracelulares de la fermentación se resaltan en recuadros azules. Los números señalan las enzimas involucradas. 1: sistema e fosfotransferasas; 2: glucosa-6-fosfatoisomerasa; 3:6-fosfofructo cinasa; 4: aldolasa ; 5: gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa; 6: fosfogliceratocinasa; 7: piruvato cinasa; 8: piruvato-ferredoxina oxidorreductasa; 9: tiolasa; 10: βhidroxibutiril-CoA deshidrogenasa; 11: crotonasa; 12: butiril-CoA deshidrogenasa; 13: fosfotransbutirilasa; 14: butirato cinasa; 15: acetoacetyl-CoA butirato CoA-transferasa; 16: butiraldehído deshidrogenasa; 17: butanol deshidrogenasa; 18: fosfotransacetilasa; 19: acetato cinasa; 20: acetoacetyl-CoA acetato CoA-transferasa; 21: acetoacetato descarboxilasa; 22: acetaldehído deshidrogenasa; 23: etanol deshidrogenasa; 24: lactato deshidrogenasa; 25: ferredoxin-NADP reductasa NADPH-ferredoxinoxidorreductasa; 26: : ferredoxin-NAD reductasa NADH-ferredoxinoxidorreductasa; 27: ferredoxina hidrogenasa; 28: galactocinasa; 29: UDP-glucosa glucosa-1-P uridil transferasa; 30: fosfoglucomutasa; 31: UDP-galactosa epimerasa; 32: UDP-glucosa fosfotransferasa(Modificado de Gheshlaghi et al.(2009) y Lee et al. (2008)).

Cuando se tiene como fuente de carbono a la lactosa ésta es hidrolizada a nivel extracelular por acción de las lactasas, generando glucosa y galactosa que posteriormente son introducidas a la célula y procesadas para generar los productos de interés.

El metabolismo de la glucosa, inicia al tomarla del medio extracelular y llevarla al citoplasma, para ello *Clostridium* emplea el sistema glucosa fosfotransferasa, en el cual de manera simultánea se toma el azúcar y se fosforila (Gheshlaghi et al., 2009).

Dentro del citoplasma tiene lugar su conversión a dos moléculas de piruvato por la vía de la glucólisis o vía EMP (Embden Meyerhof Pathway); se producen también dos moléculas de ATP y dos de NADH + H⁺; el ATP será posteriormente utilizado en la descomposición del piruvato, mientras que el NADH + H⁺ funge como aceptor de electrones. Posteriormente el piruvato es oxidado a acetyl CoA, con el desprendimiento de CO₂ e hidrógeno, acoplado con la reducción de la ferredoxina (Ennis, 1987).

Por su parte la galactosa es también tomada del medio extracelular e introducida al citoplasma por medio de fosforilación por acción de la galactocinasa. La galactosa fosforilada es luego isomerizada a glucosa-1-P en una reacción que involucra UDP-glucosa y que es catalizada por la uridil-transferasa. La glucosa-1-P se isomeriza posteriormente a glucosa-6-P y la UDP- galactosa resultante se epimeriza a UDP-glucosa.

Clostridium puede también metabolizar pentosas empleando para ello la ruta de las pentosas fosfato, los intermediarios fosforilados son convertidos por la transaldolasa y la transacetolasa en fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, los cuales son posteriormente introducidos en la ruta glucolítica. La conversión de 3 moles de pentosas a piruvato genera 5 moles de ATP y 5 moles de NADH + H⁺ (Gheshlaghi et al., 2009).

Cabe resaltar que el hierro es un importante componente en la dieta de *Clostridium*, ya que se requiere de una profusa producción de ferredoxina en la conversión de piruvato en acetyl-CoA (Lee et al., 2008). Los anaerobios estrictos, como *Clostridium*, controlan su producción de ATP al controlar el flujo de electrones en su

metabolismo del sustrato. El flujo de electrones a través de varios aceptores está dirigido por la acción de tres enzimas oxidorreductasas: hidrogenasa, NADH-ferredoxina reductasa y piruvato-ferredoxina oxidorreductasa. La acción de la enzima deshidrogenasa facilita la disposición del exceso de electrones en la forma de hidrógeno molecular. Los electrones son transferidos al acarreador NAD^+ , la re oxidación de estos acarreadores requiere de otra molécula como aceptor de electrones. Los clostridios contienen un acarreador de electrones especial, la ferredoxina, una co-enzima que contiene hierro con un potencial redox cercano a -400 mV , lo que permite la reducción de los protones a hidrógeno molecular, la ferredoxina reducida es luego oxidada por acción de la hidrogenasa para generar hidrógeno (Ennis, 1987).

Las oxidorreductasas de NADH-ferredoxina son clave en la transferencia de electrones al aceptor final, ya que la reducción de la ferredoxina por el NADH sin la presencia de las enzimas es termodinámicamente imposible. La piruvato ferredoxinoxidorreductasa (PFOR) es una enzima que contiene hierro, azufre y un cromóforo en el centro, que funcionan como lanzaderas para el flujo de electrones del piruvato a la ferredoxina. Esta enzima es altamente inestable y es muy sensible a la presencia de oxígeno, al ser expuesta oxígeno pierde el 50% de su actividad en menos de una hora; la enzima puede ser también inhibida por concentraciones de CoA superiores a 0.1 mM . De manera inicial la enzima reacciona con el piruvato desprendiendo el CO_2 , posteriormente el grupo acetil es unido a la CoA para formar acetil CoA, observándose así un mecanismo de pingpong bibi (Gheshlaghi et al., 2009).

En un ambiente de crecimiento deficiente de hierro no tiene lugar la formación de hidrógeno, la ausencia de este hidrógeno cambia el metabolismo del piruvato hacia lactato, por acción de la lactato deshidrogenasa, disminuyendo la generación de acetil Co A. Limitaciones en el suministro de sulfato o gasificación con CO en pH neutro pueden también redirigir la fermentación hacia la producción de ácido láctico (Ennis, 1987; Gheshlaghi et al., 2009).

La acetil CoA juega un papel primordial en el metabolismo de *Clostridium* ya que sirve como un precursor para la generación de todos los productos.

- **PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BUTÍRICO (butirato):** una vez formada la acetil CoA dos moléculas de ésta son condensadas para formar acetoacetil CoA (precursor de todos los productos de 4 carbonos de esta fermentación), mediante la acción catalítica de la enzima acetil-CoA-acetil transferasa (tiolasa), liberando una CoA. La acetoacetil CoA es posteriormente convertida en β -hidroxibutiril CoA por acción de la β -hidroxibutiril CoA deshidrogenasa, posteriormente, por acción de la enoil-CoA hidratasa (crotonasa) la β -hidroxibutiril CoA es convertida en crotonil- CoA y posteriormente en butiril-CoA por acción de la butiril CoA deshidrogenasa. La butiril-CoA puede ser convertida posteriormente en ácido butírico por acción de las enzimas fosfotransbutirilasa y la butirato cinasa, la acción de ésta última enzima produce la fosforilación de ADP, la cual es una fuente importante de energía durante la fase acidogénica de la fermentación. Finalmente el butirato formado será depositado en el medio extracelular (Ennis, 1987; Gheshlaghi et al., 2009).

- **PRODUCCIÓN DE BUTANOL:** se da a partir de ácido butírico en su forma neutra (butirato) mediante tres reacciones consecutivas en las que se genera butiril CoA y butiraldehído como intermediarios. Dichas reacciones están catalizadas por las enzimas CoA-transferasa, butiraldehído deshidrogenasa y butanol deshidrogenasa, respectivamente. El aprovechamiento del butirato por acción de la CoA-transferasa funciona como un mecanismo de detoxificación reduciendo el efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular dado por la presencia de los ácidos en el medio. Por otra parte se ha demostrado que la formación de butanol en un cultivo con *C. acetobutylicum* está regulada a nivel genético mediante la regulación de la expresión de genes codificantes para la butiraldehído deshidrogenasa (Ennis, 1987; Gheshlaghi et al., 2009).

- **PRODUCCIÓN DE ACETONA:** A medida que el pH del medio disminuye debido a la formación de ácidos la acetoacetil CoA es desviada del ciclo normal y es empleada para la producción de acetoacetato por medio de un sistema de transferasas catalizado por la CoA transferasa. El acetoacetato es posteriormente descarboxilado por acción de la acetoacetato

descarboxilasa en un paso irreversible para producir acetona. La desviación del ciclo normal para dar lugar a la formación de acetona detiene la formación de ácido butírico nuevo, además ocasiona la eliminación de dos reacciones de toma de electrones que generaban NAD^+ , por lo que el microorganismo debe buscar alternativas para la regeneración del NAD^+ . La única vía de recuperación que puede emplear *Clostridium* es revertir la última etapa del ciclo fermentativo normal, pasando de butiril CoA a acetyl CoA y reduciendo el butanol ya producido a ácido butírico (Ennis, 1987). La acetona producida es depositada en el medio extracelular (Gheshlaghi et al., 2009).

- **PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO (acetato):** es generado en la reversión de la reacción de butirato a butiril CoA y empleado para la generación de acetyl CoA para la producción de acetona (Ennis, 1987). La formación de ácido acético da el doble de rendimiento en ATP que el generado con la producción de ácido butírico. El rendimiento de ATP así como la producción de ácido acético y ácido butírico estará regulado por la acción de la acetyl-CoA-acetyl transferasa. El acetato formado es depositado en el medio extracelular o bien puede ser empleado para la producción de acetyl-CoA (Gheshlaghi et al., 2009).
- **PRODUCCIÓN DE ETANOL:** en la especie *C. acetobutylicum* la producción de etanol ocurre de manera simultánea a la formación de acetona y butanol. La producción de etanol se ramifica desde la acetyl CoA, donde la enzima acetaldehído deshidrogenasa cataliza la formación de acetaldehído con la liberación de la CoA y la oxidación de $\text{NADH} + \text{H}^+$ a NAD^+ . El acetaldehído es posteriormente reducido a etanol por la acción de la etanol deshidrogenasa, con la oxidación de otra molécula de $\text{NADH} + \text{H}^+$ a NAD^+ (Ennis, 1987). El etanol producido es depositado en el medio extracelular (Gheshlaghi et al., 2009).
- **PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y DIÓXIDO DE CARBONO:** ambos son producidos durante toda la fermentación. La proporción en que son

generados depende de la cepa usada para la fermentación y las condiciones en las que sea efectuada (Ennis, 1987).

Se han identificado en *C. acetobutylicum* dos mecanismos para la formación de butanol, el primero de ellos asociado a la solventogénesis, descrita anteriormente, y el segundo de ellos a la alcohologénesis, mecanismo que lleva únicamente a la producción de butanol y etanol. Los genes involucrados en la solventogénesis han sido identificados, secuenciados y descritos dentro del mega plásmido pSOL1; algunos genes probablemente involucrados en la ruta de la alcohologénesis se han encontrado también dentro del plásmido, entre ellos destacan los genes CAP0035 que codifica para la síntesis de una segunda aldehído deshidrogenasa, CAP0025 que lleva a la formación de piruvato descarboxilasa y CAP0059 codificante para la etanol deshidrogenasa, todas estas enzimas indispensables para la formación de los productos alcohólicos deseados: butanol y etanol (Nölling et al., 2001).

Algunos de los genes identificados que codifican para enzimas específicas involucradas en el metabolismo desde el consumo de los azúcares hasta la generación de productos, así como su interacción con otros procesos metabólicos dentro de la célula, se encuentran descritos en la figura 14.

1.4.4.1.2 CINÉTICA Y REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE SOLVENTES CON *C. acetobutylicum*

Napoli et al. (2008) trabajaron la cinética de *C. acetobutylicum* ATCC 824 en relación a la producción de Acetona: Butanol: Etanol (ABE) empleando soluciones de lactosa como medio de cultivo con el fin de simular suero de queso. Estos investigadores encontraron que dicha cinética está conformada por dos fases: acidogénesis y solventogénesis. Proceso bifásico reportado también por Pérez- Macilla y Montoya-Castaño (2013) y Cooksley et al. (2012).

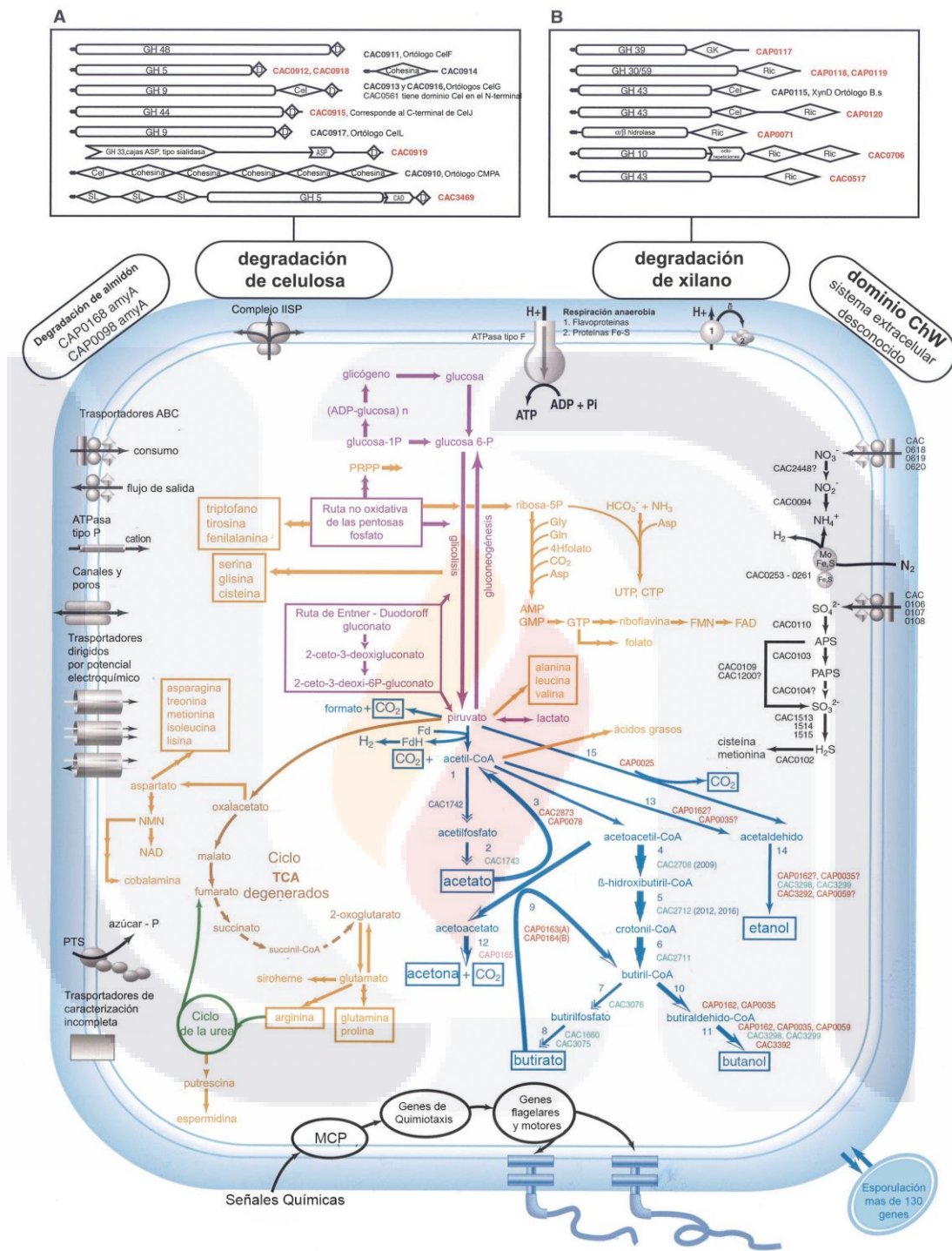


Figura 14. Rutas metabólicas básicas en *C. acetobutylicum*: en morado se muestra el catabolismo de carbohidratos hasta piruvato (incompleto), ciclo TCA en café, solventogénesis en azul, rutas biosintéticas en anaranjado, ciclo de la urea en verde, reducción de nitratos y sulfatos, así como la fijación de nitrógeno se muestran en negro. Para las reacciones en las que no se encontró una enzima específica se muestran flechas segmentadas. La afinidad filogenética de los genes involucrados en la solventogénesis se muestran por color: protobacterias rojo, grupo *Bacillus/Clostridium* verde, arquea magenta, genes con afinidad incierta, azul. (Nölling et al., 2001).

- Fase de acidogénesis: está caracterizada por un incremento constante en la concentración de células y ácidos butírico y acético en el medio de cultivo. La concentración de células en el tiempo se da en espejo con el consumo de lactosa (u otro azúcar empleado como fuente de carbono), al incrementarse la producción de ácidos disminuye notablemente el pH del medio de cultivo. La relación molar de producción de los ácidos se mantiene constante durante toda la fase como 1.5 moles de ácido butírico/ 1 mol de ácido acético. Se producen también CO₂ y H₂ (Napoli et al., 2009; Napoli et al., 2008).
- Fase de solventogénesis: es disparada por un valor de pH cercano a 4 y se caracteriza por un decremento gradual en la concentración de lactosa hasta alcanzar un valor constante (Napoli et al., 2008). Los ácidos formados en la primera fase fermentativa son consumidos nuevamente por las células y actúan como co-sustratos para la producción de los solventes neutros. En este punto la producción de ácidos cesa y también cesa el crecimiento celular, el pH del medio se incrementa paulatinamente a medida que los ácidos son consumidos (Gheshlaghi et al., 2009). Los productos generados: acetona, butanol, etanol, tienen una proporción másica típica 3:6:1 (Niemistö et al., 2013; Cooksley et al., 2012;). La producción de hidrógeno se reduce debido al uso de los equivalentes de reducción para reducir butiril-CoA y acetil-CoA, llevando así a la formación de butanol y etanol. Al mismo tiempo que inicia la fase solventogénica se inicia la fase de formación de endoesporas (Cooksley et al., 2012).

La transición metabólica que se da de una fase a otra involucra el re enrutamiento del flujo de carbono y el flujo de electrones. La activación de la producción de solventes es compleja e interrelacionada. Los factores implicados en esta transición son el pH del cultivo, la concentración de ácido acético y butírico, la disponibilidad de nitrógeno y la concentración del azúcar residual (Ennis, 1987).

Se ha sugerido que los ácidos excretados al medio actúan como inductores de la biosíntesis de las enzimas solventogénicas que actuaran en la segunda fase de la

fermentación. Se cree que el cambio hacia la producción de solventes es una respuesta adaptativa de las células al pH bajo del medio dado por la producción de ácidos. Tras el cambio hacia la segunda fase fermentativa el flujo de carbono y electrones es dirigido hacia la formación de solventes. Al final de la fermentación la concentración de solventes alcanzará un nivel inhibitorio y se detendrá el metabolismo (Gheshlaghi et al., 2009).

1.4.4.1.2.1 FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE SOLVENTES

- A) Sensibilidad al oxígeno y requerimientos de potencial redox: *Clostridium acetobutylicum* requiere condiciones anaeróbicas para su crecimiento, su crecimiento óptimo se da en cultivos con potencial redox negativo entre -250 mV y -400 mV (Ennis, 1987). Muchas de las enzimas involucradas en el metabolismo fermentativo de *Clostridium acetobutylicum* son inactivadas en la presencia de oxígeno impidiendo tanto la generación de energía en forma de ATP como la producción de solventes de interés. Las enzimas principalmente afectadas por la presencia de oxígeno son: acetaldehído deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa y las oxidorreductas de ferredoxina (Gheshlaghi et al., 2009).
- B) Requerimientos de temperatura y pH: *Clostridium acetobutylicum* es una bacteria mesofílica con temperatura óptima de crecimiento de 37°C. Su pH óptimo de crecimiento es 6.5, mientras que la producción de solventes es favorecida en la región de pH cercana a 4.5 (Ennis, 1987); se ha reportado un pH óptimo para la producción de solventes de 4.3-4.4 (Bahl et al., 1982). El pH es muy importante durante la fermentación acetona-butanol, ya que la solventogénesis inicia con un pH bajo; sin embargo si éste se encuentra por debajo de 4.5 (antes de que se forme una cantidad suficiente de ácidos orgánicos), la solventogénesis será disminuida e improductiva. Una forma sencilla de incrementar el crecimiento, la utilización de los carbohidratos así como la producción de butanol es incrementando la capacidad amortiguante del medio (Lee et al., 2008).

C) Aprovechamiento de fuentes de carbono: Al analizar el comportamiento fermentativo de *Clostridium acetobutylicum* resulta de interés el análisis de consumo de sustrato, ya que éste se ve reflejado en la acumulación de ácidos y solventes en el medio de cultivo. De manera inicial el microorganismo metaboliza los azúcares para generar ácidos, lo que le reporta un rendimiento energético de 4 moles de ATP por mol de glucosa metabolizado, además de la generación de poder reductor $\text{NADH} + \text{H}^+$. La cantidad de energía generada le permite cubrir sus necesidades de mantenimiento celular y la generación de nuevas células, por ello durante la etapa acidogénica se observa el mayor crecimiento celular. Una vez generada la cantidad suficiente de ácidos y poder reductor, al ver disminuido el pH de su entorno, el microorganismo comienza a reasimilar los ácidos generados produciendo solventes, esto le reporta un rendimiento energético de sólo 2 moles de ATP por mol de glucosa metabolizada hasta solventes, rendimiento menor al originado con la producción de ácidos. Debido al menor rendimiento energético de la solventogénesis *Clostridium acetobutylicum* requiere seguir consumiendo azúcares como sustrato aún durante la etapa solventogénica para poder cubrir sus necesidades energéticas de mantenimiento celular, en esta etapa no se observa crecimiento exponencial en el cultivo. En las fermentaciones se ha observado que al caer el consumo de sustrato cae drásticamente la producción de solventes. La caída en el consumo de sustrato en la fermentación puede deberse a deterioro celular causado por la acumulación de metabolitos en el medio de cultivo, lo que impide que se lleve a cabo la reasimilación de ácidos excretados, para lo cual se requiere consumo de otros sustratos. Por otra parte, si el microorganismo se encuentra deteriorado puede requerir una mayor cantidad de energía por mol de glucosa para su mantenimiento, condición que satisface produciendo ácidos (Silva et al., 1995).

D) Requerimientos nutricionales: algunos organismos productores de acetona y butanol requieren biotina y ácido p-aminobenzóico para su crecimiento, estos requerimientos pueden satisfacerse adicionando extracto de levadura a los medios de cultivo. La biotina es un promotor del crecimiento y ayuda a que se dé el correcto aprovechamiento de los azúcares para la producción de

solventes, *C. acetobutylicum* no tiene la capacidad de sintetizar la biotina (Weizmann y Rosenfeld, 1939). Otro nutriente fundamental referido por Weizmann y Rosenfeld (1937) es la asparragina, la cual puede sustituirse con ácido aspártico, en embargo en investigaciones más recientes no se le señala como nutriente indispensable para la fermentación con *C. acetobutylicum*. El Mg^{+2} y el K^{+} son promotores del crecimiento y producción de solventes, respectivamente (Ennis, 1987). Ambos iones son indispensables para el funcionamiento de la enzima fosfofructocinasa involucrada en el proceso glucolítico (Gheshlaghi et al., 2009). Los cofactores de reducción son también importantes en el proceso de producción de solventes, las deshidrogenasas de butanol son dependientes de NADH y NADPH, por lo que la falta o deficiencia de la regeneración de estos cofactores provocará que no catalicen la reacción impidiéndose la formación del butanol; así mismo, si se suplementa ácido nicotínico a los medios de cultivo puede incrementarse la disponibilidad de NADH y NADPH lo que producirá un balance redox favorable para incrementar la producción del solvente deseado (Li et al., 2014).

- E) Inhibición por productos: la presencia de butanol, acetona y etanol resulta ser tóxica para *C. acetobutylicum*, ya que provoca la activación de la formación de cuerpos de resistencia, es decir, a concentraciones bajas de solventes *C. acetobutylicum* comienza a esporular. Lo anterior limita la concentración de solventes en el medio de cultivo, originando bajos rendimientos y un alto costo durante su recuperación en las soluciones diluidas. En el caso específico de *Clostridium acetobutylicum* silvestre su metabolismo se detiene cuando la presencia de solventes alcanza una concentración de 20 g/L, lo cual limita la concentración de fuentes de carbono que pueden ser utilizados en la fermentación, ocasionando una baja productividad y baja concentración de productos (Lee et al., 2008).

Tanto los ácidos como los solventes causan inhibición en los microorganismos del género *Clostridium* aunque sus sitios de inhibición son diferentes. A ciertas concentraciones de ácidos y solventes el crecimiento celular se detiene, aunque el consumo de azúcares puede continuar., a concentraciones más elevadas de estos productos la actividad microbiana

termina. La inhibición del crecimiento celular está dada porque al entrar en contacto con alcoholes y formas neutras de ácidos orgánicos la bicapa lipídica de la membrana celular comienza a ser alterada, se presentan alteraciones en diversas estructuras celulares, en actividades de complejos enzimáticos unidos a membrana, en la conformación estética de “sistemas funcionales clave” o interfieren con los procesos regulatorios microbianos. En el caso de la fermentación ABE se ha observado que la presencia de acetona, etanol, acetato y butirato, por si solos, no contribuyen significativamente a la inhibición del crecimiento. El butanol sólo o en conjunto con el butirato si presentan efectos importantes sobre el crecimiento microbiano: una concentración de 13 g/L de butanol o de 15 g/L de butirato y butanol causan el 50% de inhibición del crecimiento celular (Ennis, 1987).

Wang et al. (2011) reportan que el ácido fórmico juega también un importante papel en la inhibición del crecimiento y la producción de solventes, lo que se denomina el fenómeno “acid crash”. Su trabajo demuestra que *Clostridium acetobutylicum* DSM1731 acumula ácido fórmico dentro de las células en concentraciones de 0.5 a 1.24 mM, al no poseer formato deshidrogenasa no puede metabolizarlo y lo acumula, produciéndose fallas en la generación de los solventes de interés. Si se le proporciona a la cepa la capacidad de degradar el ácido fórmico éste no se acumulará en las células y la producción de solventes ocurrirá de manera normal. Ésta información tiene relevancia al emplear hidrolizados de celulosa o lignocelulosa que suelen contener al ácido fórmico en su composición.

Foda et al. (2010) reportan que a concentraciones de 0.1 a 0.15 M de butanol provocan un 50% de inhibición en el crecimiento celular y el consumo de glucosa, lo que afecta negativamente la actividad de la enzima ATPasa, encargada de mantener constante el gradiente de pH interno y externo de la célula, el cual es esencial para que se dé el crecimiento celular. Otros investigadores reportan que concentraciones de alrededor de 7.4 g/L de butanol generan un 50% de inhibición del crecimiento celular y consumo de azúcares (Lee et al., 2008).

La incorporación del butanol a la membrana citoplasmática causa una disrupción de la bicapa lipídica, debido a la hidrofobicidad del butanol, lo que ocasiona un incremento en la fluidez y permeabilidad de la membrana lo cual a su vez ocasiona una desestabilización de la célula y sus funciones, así como afecciones a la actividad de la ATPasa, enzima unida a la membrana citoplasmática (Foda et al., 2010). Se ha encontrado también que la toxicidad del butanol afecta el crecimiento celular, el transporte de nutrientes y el consumo de los azúcares (Dong et al., 2012).

El butanol es atraído por la membrana debido al desbalance polar-no polar que presenta su cadena. Este solvente es capaz de destruir la habilidad de la célula para mantener su pH interno, disminuyendo la concentración intracelular de ATP e inhibiendo el consumo de sustrato. El butanol tiene un efecto caotrópico que resulta en el “goteo” de metabolitos intracelulares, sin embargo no afecta el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato para el consumo de glucosa (Hutkins y Kashket, 1986).

1.4.4.1.3 FORMACIÓN DE ENDOESPORAS Y SU INTERACCIÓN CON LA SOLVENTOGÉNESIS

La solventogénesis y la esporulación son mecanismos de las células de *Clostridium* para resistir en ambientes hostiles; la solventogénesis es inducida por *Clostridium* con el fin de contrarrestar el efecto de la presencia de los ácidos producidos, para otorgar a la célula tiempo para completar la formación de endoesporas (Pérez-Mancilla y Montoya-Castaño, 2013). Cuando disminuye el pH, dichos ácidos se encuentran en su forma no disociada y son capaces de pasar la membrana celular por difusión, alterando el gradiente de protones alrededor de esta estructura celular y ocasionando en últimas la muerte de la célula. El reconsumo de ácidos por medio de la enzima acetoacetil- CoA: acetato/butirato-coenzima A transferasa para su transformación en solventes, incrementa el pH externo, permitiendo a la célula garantizar su supervivencia por largos periodos al darle la posibilidad de esporular (Dürre y Hollergschwandner, 2004).

Al parecer existe una relación entre la esporulación y la solventogénesis debida a eventos moleculares en la célula que no se han logrado dilucidar por completo (Zheng et al., 2009). Hasta el día de hoy se sabe que la esporulación y la solventogénesis en *Clostridium* están conectadas principalmente por la proteína Spo0A (Pérez-Mancilla y Montoya-Castaño, 2013).

Spo0A es una proteína perteneciente al grupo de reguladores de respuesta bacterianos, que tiene dos dominios conectados por una región variable. La región N-terminal o fosfoaceptora, contiene un residuo de ácido aspártico conservado que sirve como sustrato para la fosforilación, modulando la actividad de la proteína; por otra parte, la región C-terminal o efectora contiene un motivo hélice-vuelta-hélice de unión a ADN conservado entre homólogos de Spo0A de microorganismos formadores de endosporas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (Schmeisser et al., 2000). Esta región tiene afinidad por la secuencia consenso de ADN 5'-TGNCGAA-3' conocida como la "caja 0A", localizada en regiones regulatorias; afectando de forma directa o indirecta diferentes procesos característicos de la fase estacionaria de crecimiento (Ravagnani et al., 2000)

Al inicio de la esporulación los clostridios acumulan material de reserva similar a la amilopectina, llamado genéricamente granulosa, que servirá como fuente de carbono y energía durante la formación de la endospora. Esto induce un hinchamiento de la célula, conocido como el "estado clostridial", donde se observa la forma de cigarrillo, típica de esta forma transicional previa a la diferenciación (Dürre y Hollergschwandner, 2004).

Una vez la bacteria percibe las condiciones adversas que influyen el proceso, se fosforila el regulador maestro de la transcripción conocido como Spo0A, que activa o reprime la expresión de genes importantes para el proceso, al unirse a blancos específicos de ADN (Ravagnani et al., 2000). Se han propuesto diferentes estrategias por medio de las cuales los clostridios pueden fosforilar a Spo0A, destacando el uso de quinasas huérfanas que fosforilen directamente al regulador maestro (Dürre y Hollergschwandner, 2004). Por medio de histidin-quinasas huérfanas, existen dos posibles vías alternas a través de las cuales podía darse este fenómeno: se encontró que la proteína Cac0323 por

una parte y las Cac0903 y Cac3319 por otra, podrían fosforilar directamente a Spo0A en *Clostridium acetobutylicum* (Steiner et al., 2011).

Una vez fosforilado, Spo0A puede reprimir la expresión de genes como el que codifica para la proteína AbrB, que juega un papel fundamental en la transición entre el crecimiento vegetativo y la esporulación. Así mismo, induce la expresión de genes que contienen la información necesaria para producir factores sigma específicos del proceso de esporulación, regulando de forma eficiente y coordinada este mecanismo (Pérez-Mancilla y Montoya-Castaño, 2013).

Con lo que se sabe hasta ahora se puede afirmar que el regulador maestro Spo0A es el vínculo fundamental entre dos redes de expresión de genes de importancia en el ciclo de vida de la célula: esporulación y solventogénesis, lo que ha sido demostrado al encontrar “cajas 0A” en regiones regulatorias de operones de genes relacionados con las dos rutas (Pérez-Mancilla y Montoya-Castaño, 2013).

1.4.4.2 PRINCIPALES PROBLEMAS Y LIMITACIONES DE LA FERMENTACIÓN ABE

Sin lugar a dudas el principal problema que se tiene en los sistemas de producción de butanol con *C. acetobutylicum* es que la esporulación de las bacterias ocurre concomitantemente con la solventogénesis. El principal objetivo que debe plantearse para el desarrollo del proceso fermentativo es el impedir que la cepa microbiana esporule, y debe también buscarse que la cepa microbiana no se encuentre bajo condiciones de alto estrés, como podría ser la presencia de una concentración elevada de los solventes, ya que al estar expuesta al estrés habrá un mayor consumo de fuente de carbono y energía dirigido al mantenimiento celular, afectando directamente la generación de producto y los rendimientos que se obtengan.

Sabra et al. (2014), Cooksley et al. (2012), Tashiro y Sonomoto (2010) y Gheshlaghi et al. (2009) señalan que la producción de butanol por la vía fermentativa ABE no puede competir económicamente con la síntesis petroquímica de los solventes. Para

lograr una producción biológica económicamente competitiva es necesario atender 5 inconvenientes o limitaciones típicamente observadas:

1. Alto costo de sustratos e inhibición por sustrato.
2. Baja concentración final de butanol (menor a 20 g/L) debida por la inhibición del propio producto sobre el microorganismo.
3. Baja productividad de butanol (menor a 0.5 g/L h) debido a la baja densidad celular causada por la inhibición por butanol.
4. Bajo rendimiento de butanol debido a la heterofermentación.
5. Alto costo de recuperación del butanol debido al bajo rendimiento y baja concentración en los caldos de cultivo.

Dürre (2011) menciona, además de las limitaciones típicas, que al buscar escalar el proceso a nivel industrial se tienen grandes problemas de contaminación por fagos.

1.4.4.3 POSIBLES SOLUCIONES A LA PROBLEMÁTICA DE LA FERMENTACIÓN ABE

Para reducir los costos del sustrato deben buscarse fuentes de carbohidratos baratas como lo son los residuos de diversas industrias, residuos celulósicos y lignocelulósicos, residuos agrícolas e incluso residuos domésticos (Niemistö et al., 2013). En el presente trabajo de tesis se plantea emplear como sustrato los azúcares presentes en el suero de leche, desecho de la industria quesera, mimo que será descrito en el apartado correspondiente.

Para poder incrementar los rendimientos y productividad de un sistema fermentativo ABE que emplee como microorganismo fermentador a *C. acetobutylicum* es necesario considerar la creación e identificación de mutantes súper productoras de butanol y que a su vez sean resistentes a concentraciones de butanol superiores a los 20 g/L.

Por otra parte se debe considerar el montaje de un proceso fermentativo acoplado al proceso de recuperación y purificación del producto de interés, butanol. El acoplar los procesos ayudará a incrementar los rendimientos ya que se podrá hacer un mejor uso de los sustratos logrando que se consuman en mayor proporción para que las células crezcan, continúen en su etapa vegetativa y produzcan el butanol.

1.4.4.3.1 SELECCIÓN DEL SUSTRATO

Para eficientar la producción de biobutanol se han estado buscando de manera continua nuevas fuentes de carbono renovables. De manera tradicional el butanol se producía por fermentación anaeróbica de sustratos azucarados, principalmente melazas.

Se sabe que los microorganismos del género *Clostridium* son capaces de utilizar una amplia gama tanto de azúcares simples como complejas por lo que se está experimentando con varias fuentes de materiales fermentables, sobre todo biomasa, que sean de bajo costo y fácil adquisición para mejorar la competitividad económica del producto de interés: butanol (Jang et al., 2012). Algunas de las principales fuentes de carbono estudiadas en la actualidad para mejorar la competitividad económica del proceso fermentativo ABE se describen en la tabla 5.

1.4.4.3.2 ESTRATEGIAS DE CULTIVO

En los procesos biotecnológicos hay principalmente tres maneras de hacer crecer microorganismos en un biorreactor: batch, semicontinuo y continuo. Dentro del biorreactor las reacciones pueden tener lugar en cultivos estáticos o en agitación, en presencia o ausencia de oxígeno, en condiciones líquidas o de baja humedad (sobre sustratos sólidos). Los microorganismos pueden estar libres o adheridos a superficies por inmovilización o por adherencia natural (Smith, 2009).

Tabla 5. Ventajas y desventajas de diversas fuentes de carbono como sustrato para la fermentación ABE

FUENTE DE CARBONO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Sucrosa y almidón	<ul style="list-style-type: none"> • Pretratamiento simple para la obtención de azúcares fermentables de la biomasa. • Producción de butanol con alta productividad (mejor que empleando otros sustratos) 	<ul style="list-style-type: none"> • Los cultivos pueden competir potencialmente con el suministro de alimentos.
Biomasa lignocelulósica	<ul style="list-style-type: none"> • Biomasa más abundante no competitiva con el suministro de alimentos. • Los <i>Clostridium</i> productores de butanol utilizan en su mayoría azúcares procedentes de biomasa celulósica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para obtener azúcares fermentables a partir de esta biomasa. • Producción de componentes inhibitorios de la fermentación durante el pretratamiento del material. • Baja productividad de butanol.
Glicerol	<ul style="list-style-type: none"> • Alto rendimiento de producción de butanol • Incremento en la producción de butanol con menor formación de subproductos. • Bajo costo de la biomasa, suministrada por la industria del biodiesel. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitación en el número de cepas de <i>Clostridium</i> capaces de producir butanol a partir del glicerol.
Biomasa de algas	<ul style="list-style-type: none"> • No compite con los suministros de alimentos. • No se requieren tierras para cultivo. • Mayor rendimiento por área de cultivo cuando se comparan con plantas. 	<ul style="list-style-type: none"> • La producción de butanol a partir de biomasa de algas no se ha demostrado convincentemente. • Baja productividad de butanol.
Syngas	<ul style="list-style-type: none"> • La fracción de biomasa recalcitrante puede ser empleada sin necesidad de pretratamientos complejos. • Algunos clostridios pueden producir butanol a partir del Syngas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja transferencia de masa de gas a líquido. • Baja productividad de butanol. • Limitación en el número de cepas de <i>Clostridium</i> capaces de producir butanol directamente a partir de syngas.

Los datos de la tabla incluyen información recabada de los trabajos de Jang et al. (2012)

1.4.4.3.2.1 CULTIVO POR LOTE (BATCH)

Según Aleksic (2009) el cultivo batch, conocido también como cultivo por lote o cultivo discontinuo, es un sistema de cultivo cerrado, excepto para la aireación en el caso de que el cultivo la requiera, que contiene una cantidad inicial y limitada de nutrientes. El cultivo celular inoculado en un sistema batch pasará a través de una serie de fases, como se ilustra en la Figura 15.

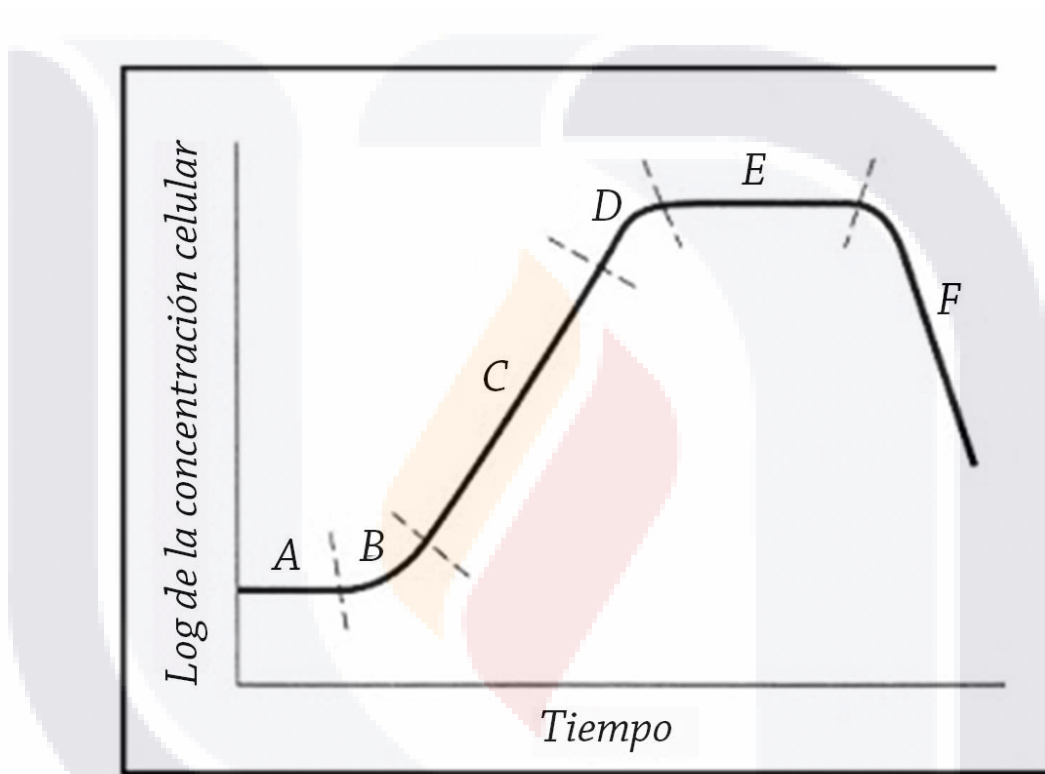


Figura 15. Cinética de crecimiento microbiano.

A: fase de retardo o lag; B: aceleración transitoria; C: fase exponencial; D: fase de deceleración; E: fase estacionaria; F: fase de muerte. (Modificado de Crueger y Crueger (1989)).

Los microorganismos inoculados dentro del volumen de medio fijo van consumiendo los nutrientes a medida que se va dando el crecimiento y se acumulan los productos (biomasa y metabolitos). El entorno de nutrientes cambia continuamente, lo que a su vez impone cambios en el metabolismo celular. Eventualmente, la multiplicación celular cesa debido a que los nutrientes se vuelven limitantes o se agotan y debido también a la acumulación de productos de desecho tóxicos excretados (Smith, 2009).

Según Smith (2008) se pueden distinguir seis fases en el cultivo:

1. Fase logarítmica: también llamada fase de retardo, en esta el microorganismo se adapta a las nuevas condiciones y pone en marcha su maquinaria metabólica para poder crecer activamente. La duración de esta fase es variable y en general es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo (Crueger y Crueger, 1989). En un proceso comercial la longitud de la fase de retardo debe reducirse tanto como sea posible y esto se puede lograr mediante el uso de un inóculo adecuado.
2. Fase de aceleración transitoria: es la etapa en la que el microorganismo comienza a crecer de forma apreciable pero sin alcanzar todavía un crecimiento exponencial.
3. Fase exponencial: El crecimiento microbiano procede a la máxima velocidad posible para ese organismo en presencia de nutrientes en exceso, parámetros medioambientales ideales y ausencia de inhibidores de crecimiento. En los cultivos batch el crecimiento exponencial es de duración limitada.
4. Fase de deceleración: A medida que las condiciones del medio de cultivo cambian se pierden las condiciones óptimas y se observa una disminución en el índice de crecimiento.
5. Fase estacionaria: en esta fase no hay aumento neto de microorganismos, lo que no significa que no se dividan algunos, sino que la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros.
6. Fase de muerte: el número de microorganismos vivos disminuye de forma exponencial con una constante que depende de diferentes circunstancias como el agotamiento de sustrato o la presencia de desechos tóxicos en el medio.

1.4.4.3.2.2 CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO (SEMICONTÍNUO)

En este tipo de cultivos el sustrato es añadido a medida que la fermentación progresa, incrementando el volumen total de la fermentación. Este tipo de cultivos son aplicados cuando la presencia de altas concentraciones de los sustratos provoca la inhibición o represión del crecimiento y metabolismo celular. En estas fermentaciones los elementos críticos de la solución de nutrientes son añadidos en pequeñas

concentraciones al inicio de la fermentación y continúan siendo añadidos en pequeñas dosis durante la fase de producción (Crueger y Crueger, 1989).

La adición de nuevo sustrato en los cultivos batch alimentado puede realizarse en un solo punto de la fermentación, en intervalos definidos de tiempo, o bien, de manera continua a partir de la observación de la fase de crecimiento deseada. Esta forma de trabajo, además de eliminar los efectos de represión por las fuentes de carbono, ayuda a reducir la viscosidad del medio y los efectos de los constituyentes tóxicos, o simplemente, hace que la etapa de formación de producto sea lo más larga posible (Ward, 1991).

1.4.4.3.2.3 CULTIVO CONTINUO

Los cultivos continuos son sistemas abiertos en los que soluciones estériles de nutrientes son adicionadas a los biorreactores de manera continua y una cantidad equivalente de sustrato agotado con microorganismos es simultáneamente extraída del sistema (Crueger y Crueger, 1989).

Existen diversos tipos de cultivo continuo pero pueden clasificarse en dos tipos básicos: reactores de mezcla completa y reactores de flujo pistón. En un reactor continuo de mezcla completa la adición de sustrato a una velocidad adecuada combinado con la eliminación a una velocidad volumétrica igual de medio de cultivo del recipiente produce un estado estacionario en el que la formación de biomasa está en equilibrio con la pérdida de células. Por su parte, en los reactores de flujo pistón el cultivo fluye por un reactor tubular sin mezcla en contracorriente. En la entrada del reactor se van añadiendo continuamente células y medio, por lo que la composición del medio, la concentración de biomasa y las concentraciones de producto varían con la longitud del reactor (Ward, 1991).

Algunas de las ventajas y desventajas de los sistemas de cultivo descritos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Ventajas y desventajas de los sistemas de cultivo

SISTEMA DE CULTIVO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
BATCH	<p>Puede alcanzarse una alta concentración de producto en el medio, lo que permite optimizar las operaciones de recuperación y purificación de productos.</p> <p>Al ser un sistema cerrado se reducen los riesgos de contaminación.</p> <p>Son más sencillos de montar y manejar, en comparación con los cultivos continuos.</p>	<p>Bajas productividades debido a los tiempos involucrados en el ciclo de fermentación, tanto las fases de crecimiento celular como los tiempos destinados a lavado, esterilización y montaje entre fermentaciones, los cuales son tiempos en los que no se está generando ningún producto.</p>
BATCH ALIMENTADO	<p>Ayudan a eliminar los efectos de represión por las fuentes de carbono, reducir la viscosidad del medio y los efectos de los constituyentes tóxicos.</p> <p>Permiten que la etapa de formación de producto sea lo más larga posible.</p> <p>Presentan mejores rendimientos y productividades que los cultivos batch cuando son empleados en procesos fermentativos en los que la generación de productos se da mayoritariamente después de la fase de crecimiento exponencial.</p>	<p>No presentan buenos rendimientos y productividades cuando son empleados en procesos fermentativos en los que la generación de productos está asociada al crecimiento, esto debido ya que la formación eficiente de producto tiene lugar únicamente durante una fracción del ciclo de fermentación.</p> <p>Debe cuidarse que la alimentación de medio estéril no sea una fuente posible de contaminación para el cultivo.</p>
CONTINUO	<p>Las fermentaciones pueden prolongarse para generar una mayor cantidad de producto que la que se podría alcanzar con los cultivos batch o batch alimentados.</p> <p>La producción continua mejora la productividad de las fermentaciones en los biorreactores al no consumirse tanto tiempo en la recolección del producto, lavado del reactor, esterilización y preparación de los cultivos que debe hacerse antes de arrancar un sistema de cultivo batch. Además al mantener las células en una etapa específica de crecimiento se pierde tiempo de producción requerido por los microorganismos para la fase de adaptación (lag).</p>	<p>Pueden presentarse un mayor número de dificultades técnicas para su manejo y control.</p> <p>Al ser un sistema abierto es más susceptible a contaminarse.</p> <p>Los procesos productivos en los que el compuesto de interés es un metabolito secundario, es decir que su producción no va asociada al crecimiento, no pueden utilizar un único quimiostato sino que deben emplear quimiostatos multietapa para permitir que prevalezcan distintas condiciones medioambientales en las etapas separadas de crecimiento y de formación de productos.</p>

Los datos de la tabla contienen información recabada de los trabajos de Smith (2009); Ward (1991); Crueger y Crueger (1989).

1.4.4.3.2.4 INMOVILIZACIÓN CELULAR

La inmovilización celular es una técnica que permite confinar a las células que se encuentran dentro de un reactor para permitir su fácil recuperación y re utilización, lo permite tener un proceso de producción más económico de compuestos de interés.

Según Ennis (1987) las ventajas de emplear la inmovilización celular en los procesos fermentativos son:

- Incremento en la densidad celular por unidad de volumen del reactor, lo que facilita incrementar la productividad del mismo.
- Permite mantener procesos continuos por periodos más extensos de tiempo.
- No ocurre el lavado celular a velocidades de dilución superiores a la velocidad máxima de crecimiento.
- Pueden emplearse células en crecimiento o en etapas donde no crecen.
- Es posible modificar el comportamiento intrínseco de los microorganismos lo que puede emplearse para obtener mejores productividades específicas.

Sin embargo la inmovilización celular presenta también desventajas en comparación con el uso de células libres:

- La inmovilización puede resultar en una pérdida no deseada de la actividad catabólica de las enzimas del microorganismo.
- Puede incrementarse la resistencia a la difusión debido al material empleado para la inmovilización, algunas células pueden perder acceso al sustrato, o bien, verse rodeadas por una mayor concentración de producto que inhiba su crecimiento o metabolismo.
- Pueden presentarse dificultades para mantener a las células en las condiciones fisiológicas óptimas para mantenerse en la fase de síntesis de productos.
- Pueden presentarse mutaciones o pérdida de actividad.

Los métodos empleados para la inmovilización celular son muy variados pero se dividen en dos grupos principales: unión y atrapamiento. Una clasificación simple de los métodos de inmovilización se muestra en la figura 16, mientras que la descripción de las ventajas y desventajas del empleo de cada uno de los métodos referidos se encuentra en la tabla 7.

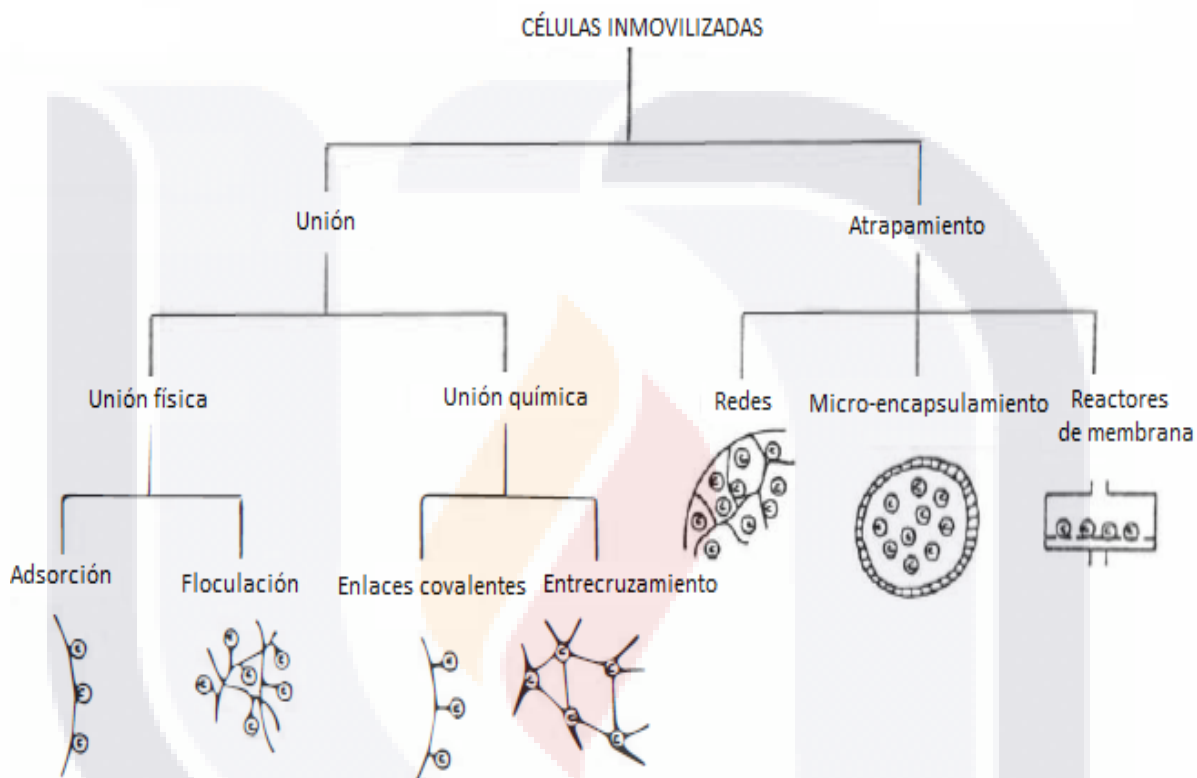


Figura 16. Clasificación de los métodos de inmovilización celular (Modificado de Ennis (1987)).

En la información reportada en la tabla 4 se pueden observar registros de productividades elevadas de butanol cuando en el proceso fermentativo se emplean células inmovilizadas. Por ejemplo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 se registra una productividad de butanol de 5.2 g/L h cuando se mantiene en cultivo continuo inmovilizada en una matriz de carragenina. Por su parte la variante de esta cepa, denominada P262, registra una productividad para butanol de 3.02 g/L h cuando se mantiene en cultivo continuo inmovilizada en alginato (Ennis, 1987).

Tabla 7. Ventajas y desventajas de algunos métodos de inmovilización celular

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Unión		
Adsorción	Se dispone de un amplio rango de materiales acarreadores. Alto grado de células viables tras la unión con el material, aunque la unión es ligera.	El crecimiento celular excesivo puede causar taponamiento del reactor. La inmovilización es temporal.
Covalente	La unión de las células es permanente. Se dispone de amplio rango de materiales acarreadores.	Técnica destructiva en la que puede haber pérdida parcial o total de la viabilidad celular. No es recomendable para células en crecimiento.
Atrapamiento		
En poliacrilamida y otros polímeros artificiales.	Se puede trabajar con un amplio rango de propiedades del gel. Es posible la división celular entre las camas formadas para el atrapamiento.	Algunas enzimas esenciales pueden ser destruidas por el activador de la polimerización. Baja carga celular. Uso químico peligroso.
K- carragenina	Material grado alimenticio. La división celular ocurre fácilmente. Se obtienen periodos extendidos de actividad celular. El gel puede ser fácilmente destruido para liberar a las células.	Dificultad en el escalamiento a nivel de producción industrial. No puede emplearse la carragenina cruda ya que la forma lambda reduce la fuerza del gel e incrementa la viscosidad de la solución.
Alginato	Material grado alimenticio. La división celular ocurre fácilmente. Se obtienen periodos extendidos de actividad celular. El gel puede ser fácilmente destruido para liberar a las células. Producción a gran escala demostrada.	Los geles son destruidos por agentes quelantes.
Acetato de celulosa	Se obtienen periodos extendidos de actividad celular.	Posibilidad limitada para la división celular. Las células están en contacto con solventes orgánicos.
Colágeno	Útil en forma de membrana.	Puede ser tóxico. Se requiere el entrecruzamiento para crear una matriz resistente.

La información contenida en tabla fue obtenida del trabajo de Ennis (1987).

La selección de un sistema adecuado para la generación de los productos de interés es crucial para la viabilidad de un proceso fermentativo a escala industrial, sin embargo, no basta con que el producto de interés se genere sino que es necesario diseñar un sistema fermentativo que permita una fácil recuperación de producto al menor

costo posible, ya que generalmente los procesos de recuperación y purificación de productos son los que encarecen el producto final. Por ello, es de suma importancia que durante el diseño del proceso fermentativo se tome en consideración el proceso de recuperación del producto.

1.4.4.3 RECUPERACIÓN DEL BUTANOL PRODUCIDO

Hasta ahora los títulos de butanol que se han alcanzado con la fermentación ABE son relativamente bajos. La recuperación del butanol con bajos títulos encarece, y ha impedido, la producción comercial del butanol (Kraemer et al., 2011). Por lo anterior se han desarrollado una gran variedad de técnicas de recuperación de butanol que permitan reducir el costo de su bioproducción (Evans y Wang, 1988). La selección del método óptimo para la recuperación del producto debe balancear variables como la eficiencia, requerimientos energéticos, costos, y la simplicidad del proceso (Niemistö et al., 2013).

La recuperación del butanol que se logra producir por medio de destilación tradicional requiere de una gran cantidad de energía y es económicamente no viable (Dürre, 2011; Xue et al., 2014). Por ello se han desarrollado sistemas simultáneos de fermentación y remoción de producto, los cuales incluyen la adsorción, extracción líquido-líquido, ósmosis inversa, pervaporación, arrastre con gas, entre otras (Niemistö et al., 2013).

Se ha observado que la remoción del producto durante la fermentación puede incrementar significativamente la productividad del sistema por volumen del fermentador o por la concentración celular (Stark y von Stockar, 2003). La producción y recuperación de productos *in situ* permite mitigar la toxicidad del butanol hacia las células, permitiendo así mejorar las concentraciones, rendimientos y productividades de éste (Xue et al., 2014).

La producción y recuperación de butanol puede darse en diferentes esquemas; puede haber contactos directos o indirectos con la célula y recuperación de producto de forma interna o externa al reactor (Woodley et al., 2008).

El esquema mostrado en la figura 17 proporciona las mejores posibilidades de control y, por lo tanto, se asume que es el más adecuado para ser aplicado en procesos continuos de gran escala. La captura del producto, mostrada en el paso 1, consiste en una operación que lleva a tener una corriente pequeña altamente concentrada de butanol y otra corriente de mayor flujo mucho más diluida que se recicla al reactor. Esta corriente que se recircula puede contener células microbianas, pero de preferencia estas deben mantenerse dentro del biorreactor (Oudshoorn et al., 2009).

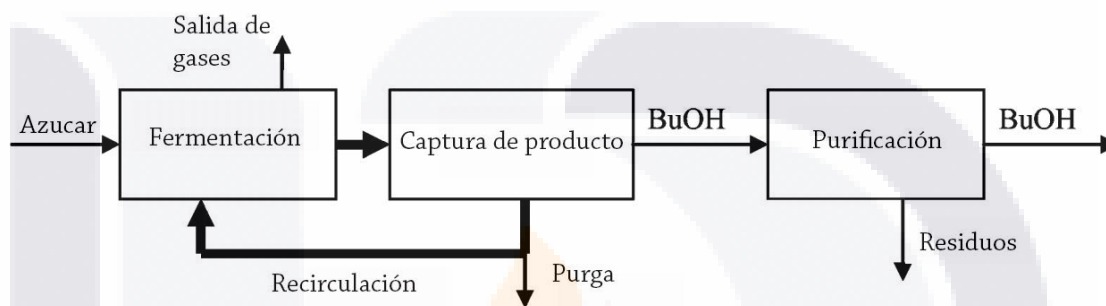


Figura 17. Operación de captura de butanol en el contexto del proceso (Oudshoorn et al., 2009).

La separación del butanol y agua en este tipo de sistemas deberá estar basada en diferencias en las propiedades físicas de las sustancias puras, o bien, en la diferencia que presentan en su comportamiento al mezclarse con una tercera especie química o algún material auxiliar. Si se emplea algún material auxiliar deberá agregarse al proceso un paso de purificación para lograr obtener el producto deseado.

De manera ideal, los costos principales de la producción del butanol son debidos al consumo y aprovechamiento del sustrato. Empelando sistemas de retención celular y optimizando las técnicas de fermentación, los rendimientos de butanol por cantidad de azúcar consumida pueden maximizarse y disminuir así el costo del aprovechamiento del sustrato. Otro de los costos mayores que se tiene es debido al equipo de fermentación, equipo de captura y recuperación de producto y el consumo total de energía durante la recuperación. Una operación eficiente de captura minimizará estos costos (Oudshoorn et al., 2009).

La recuperación de butanol de soluciones acuosas está gobernada por el comportamiento de la fase en que se encuentre el butanol durante la separación.

Después de la separación el producto puede tenerse en forma de vapor, líquido, sólido o en un una fase supercrítica. La operación de separación empleada puede clasificarse como una separación por masa, energía o cinética, o una combinación de las anteriores (Seader, Henley, y Roper, 2010).

En las separaciones basadas en energía la temperatura y la presión son empleadas como variables operacionales para introducir energía al sistema. En separaciones basadas en la masa se introduce una fase auxiliar para facilitar la separación. Las diferencias en las propiedades de transporte son las que permiten las separaciones basadas en la cinética, por ejemplo las separaciones que emplean membranas (Oudshoorn et al., 2009).

Algunas de las principales operaciones para recuperación de butanol que han sido reportadas en la literatura se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Operaciones de recuperación de butanol de soluciones acuosas

NUEVA FASE	ORIGEN	MEMBRANA	OPERACIÓN
G	Cambio de P/T	No	Destilación
L	Cambio de P/T	No	Extracción líquido-líquido.
S	Cambio de P/T	No	Congelación eutéctica
G	Cambio de P/T o cambio de composición	Si	Pervaporación
L	Cambio de P/T	Si	Osmosis
G	Cambio de composición	No	Arrastre con gas
L/SC	Cambio de composición	No	Extracción líquido-líquido
L	Cambio de composición	Si	Perstracción
S	Cambio de composición	No	Adsorción

Fases: G: gaseosa; L: líquida; S: sólida; SC: supercrítica. P/T: cambios de presión y temperatura. Los datos de la tabla incluyen información recabada de los trabajos de Maddox y Cotta (2005); Banat y Shannang (2000); Qureshi y Blaschek (2000); Dürre (1998); Qureshi et al. (1990); Groot et al. (1989).

1.4.4.3.3.1 SELECTIVIDAD DE LA RECUPERACIÓN

Como se describió anteriormente la fermentación para producción de butanol puede ser efectuada por lotes, lotes alimentados o en sistemas continuos, cualquiera que sea el esquema que se elija es posible que se aplique en él la remoción de producto para incrementar productividad. Un esquema general que describe el sistema de producción y recuperación se define en la figura 18. Ahí pueden observarse las corrientes de alimentación (Φ^f), fase auxiliar (Φ^a), producto (Φ^p) y recirculación (Φ^r).

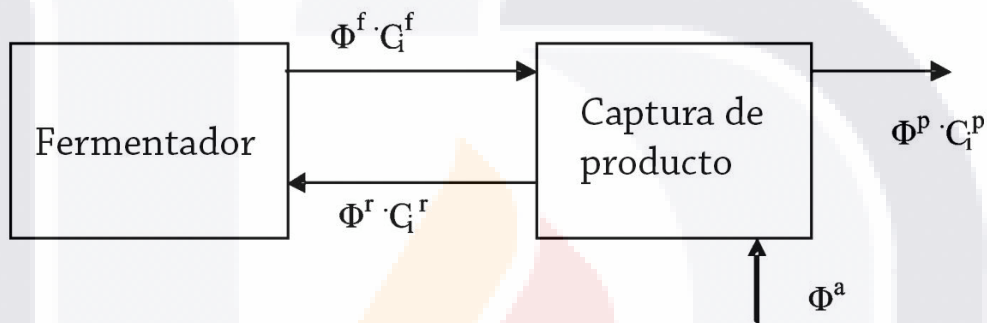


Figura 18. Representación esquemática de un sistema general de fermentación y recuperación de producto (Oudshoorn et al., 2009).

La selectividad del proceso (S^f) empleado para la recuperación podrá definirse entonces como el cociente de la concentración de agua y butanol en la corriente que acarrea el producto y la corriente de alimentación, estos cocientes pueden ser expresados tanto en concentraciones másica (C) como en fracciones molares (X).

$$S^f = \frac{[C_{BuOH}/C_{H_2O}]^p}{[C_{BuOH}/C_{H_2O}]^f} = \frac{[x_{BuOH}/x_{H_2O}]^p}{[x_{BuOH}/x_{H_2O}]^f}$$

En la tabla 9 se resumen las selectividades y capacidades de distintas operaciones empleadas para la recuperación de butanol; en ella se observa que la destilación, arrastre con gas, cristalización por congelación y la pervaporación muestran selectividades relativamente bajas, mientras que la extracción líquido-líquido y la adsorción tienen una mayor selectividad por el butanol. Los datos presentados en la tabla 9 están basados en una operación de un solo paso en el estado de equilibrio, procesos

con pasos múltiples en el estado de equilibrio podrían permitir obtener selectividades superiores (Oudshoorn et al., 2009).

Tabla 9. Capacidad y selectividad estimadas para diferentes operaciones de recuperación de butanol.

OPERACIÓN	SELECTIVIDAD ESTIMADA	CAPACIDAD (kg/kg)
Destilación	72	No involucra fase auxiliar
Extracción líquido-líquido	310-750	No involucra fase auxiliar
Cristalización por congelación	150	No involucra fase auxiliar
Pervaporación	2-209	No involucra fase auxiliar
Extracción supercrítica	550	0.050
Arrastre con gas	4-22	0.00064
Extracción	1.2-4100	0.003-0.12
Adsorción	130-630	0.11

Estimaciones realizadas por Oudshoorn et al. (2009).

1.4.4.3.3.2 REQUERIMIENTOS ENERGÉTICOS

Se estima que la energía requerida para llevar al butanol de una concentración de 0.5% en peso a 99.9% en peso en un sistema binario de butanol-agua es de 79.5 MJ/Kg, energía mucho mayor a la que posee el propio butanol (36MJ/Kg), lo que permite afirmar que el proceso convencional de recuperación del producto directamente del caldo de cultivo por medio de destilación no es energéticamente rentable (Xue et al., 2014).

Por lo anterior se ha centrado la atención en procesos de recuperación de productos cuyos requerimientos energéticos sean mucho menores a la densidad energética del producto de interés. Los principales procesos de recuperación y sus requerimientos energéticos se encuentran resumidos en la tabla 10. Misma en la que se describen las principales ventajas y desventajas de cada uno de los procesos.

Cabe destacar que los requerimientos energéticos varían considerablemente con el diseño del proceso, los parámetros empleados, el desempeño del proceso fermentativo

incluyendo la concentración del butanol, materiales empleados, temperatura de operación y los métodos elegidos para la separación y purificación. El objetivo es seleccionar un proceso fermentativo y de recuperación que involucre el utilizar poca energía y alcanzar altas concentraciones de butanol con un alto grado de pureza (alta selectividad) (Xue et al., 2014)

Tabla 10. Comparación de varios procesos integrados de recuperación de butanol

PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS	SELECTIVIDAD	REQUERIMIENTOS ENERGÉTICOS (MJ/Kg)
Pervaporación	Alta selectividad	Costo de la membrana. Ensucia el proceso.	2-209	2-145
Extracción líquido-líquido	Alta selectividad	Formación de emulsión. Costo del extractante. Tóxico para el cultivo. Recuperación y pérdida del extractante.	1.2-4100	7.7 (26 para ABE)
Arrastre con gas	No ensucia ni daña el cultivo. Fácil de operar.	Baja selectividad. Baja eficiencia.	4-22	14-31
Fermentación a vacío	No ensucia ni daña el cultivo. Fácil de operar.	Baja selectividad. Baja eficiencia.	15.5-33.8	--
Perstracción	Alta selectividad. Baja toxicidad para el cultivo.	Ensucia el proceso. Formación de emulsión. Costo del material.	1.2-4100	7.7
Adsorción	Fácil de operar. Bajo requerimiento energético.	Alto costo del material. Baja selectividad. Regeneración del adsorbente.	130-630	1.3-33

Los datos de la tabla incluyen información recabada en los trabajos de Xue et al. (2014); Oudshoorn, et al. (2009); Groot et al. (1989).

A pesar de todos los esfuerzos por lograr la recuperación de los productos del caldo de fermentación los procesos de recuperación en una sola etapa o paso no son lo suficientemente eficientes para lograr concentrar el butanol a grado reactivo para su uso directo; el producto que se obtiene generalmente debe ser purificado lo que involucra también consumos intensivos de energía. Por ello se está trabajando en desarrollar procesos de recuperación multietapa o procesos híbridos que permitan en primera instancia recuperar y, posteriormente, purificar los compuestos de interés (Xue et al., 2014).

1.4.4.3.3 EJEMPLOS DE RECUPERACIÓN DE PRODUCTOS APLICADOS A LA FERMENTACIÓN ABE.

Rescatando la información contenida en la tabla 4 se observa que de todos los procesos de recuperación de biobutanol reportados por diferentes investigadores los que muestran un mejor desempeño, ya sea al incrementar el rendimiento de butanol producido o al incrementar la productividad del sistema, son los sistemas de recuperación *in situ* empleando arrastre con gas o adsorción en resinas poliméricas.

Por ejemplo para la mutante BA 101 de *C. beijerinckii* Tashiro y Sonomoto (2010) reportan un rendimiento de 232.8 g/L de butanol, con una productividad de 1.16 g/L h al emplear un sistema de cultivo continuo acoplado a arrastre con gas para recuperación de productos. Por su parte Demain (2009) reportó para la misma cepa bacteriana un rendimiento de 56 g/l al emplearla también en cultivos continuos con el sistema de arrastre con gas acoplado para la recuperación de productos *in situ*.

En el caso de *C. acetobutylicum* se han reportado también buenos rendimientos y productividades al acoplarlos al sistema de recuperación por arrastre con gas. La cepa JB200, mutante de ATCC 824, en un cultivo batch en cama fibrosa registró rendimientos de 76.4 g/L de butanol con una productividad de 0.29 g/L h para el solvente. La misma cepa cultivada en cama fibrosa pero con sistema de batch alimentado acoplado a arrastre con gas mejoró su rendimiento al reportar 133.3 g/L de butanol producido. La cepa PJC4BK, también mutante de ATCC 824, registró una producción de 26 g/L de butanol al

mantenerse en un cultivo por lote alimentado, con células libres, acoplado a arrastre con gas (Jang et al., 2012).

El arrastre con gas presenta características ventajosas como el ser un proceso simple y económico, no requiere el empleo de equipos caros (Figura 19) no daña los cultivos, no remueve los nutrientes ni los intermediarios de reacción, reduce efectivamente la inhibición por butanol (Kumar y Gayen, 2012), permite una buena separación de todos los solventes del caldo de cultivo y además permite obtenerlos en su forma gaseosa, la desventaja principal que presenta es que es un proceso no selectivo para el butanol, es decir, todos los materiales volátiles que se encuentren en el caldo de cultivo serán arrastrados por el gas acarreador. Como gas acarreador puede emplearse nitrógeno o los propios gases producidos en la fermentación (hidrógeno y dióxido de carbono) aunque ha demostrado ser más efectivo el uso de nitrógeno (Kumar y Gayen, 2012).

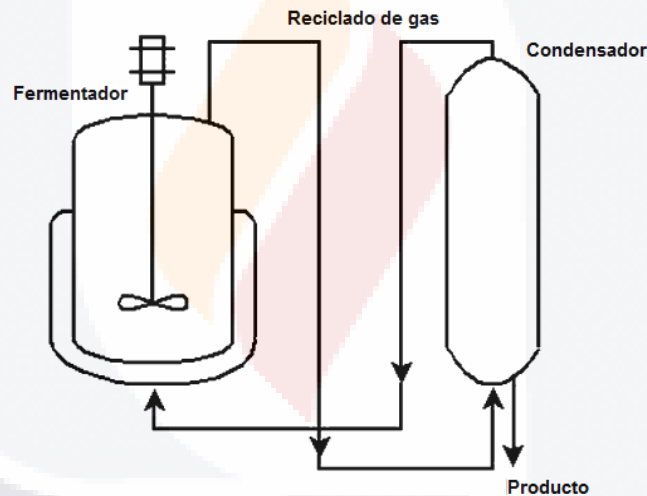


Figura 19. Diagrama esquemático de un proceso integrado de fermentación y recuperación de butanol por arrastre con gas (Modificado de Kumar y Gayen, 2012).

Por su parte, la adsorción en resinas permite tener una mayor selectividad en la recuperación del butanol, se ha reportado el uso de resinas comerciales como DowexOptiporeSD-2, la cual empleada en un cultivo de *C. acetobutylicum* ATCC 824 se registró un rendimiento de 22.4 g/L de butanol, concentración superior a la que puede resistir la cepa microbiana cuando se cultiva en medios sin sistemas de recuperación de productos *in situ* (Jang et al., 2012).

En base a la información recabada, buscando que la producción de butanol sea energética y económicamente rentable, se podría probar durante el trabajo de tesis un sistema de fermentación ABE continua acoplada a un sistema de recuperación de los alcoholes interno o externo. Por ejemplo empleando arrastre con gas, con nitrógeno como gas acarreador, podría recuperarse el producto y posteriormente purificarlo en sistemas de adsorción selectiva.

1.5 SUERO DE QUESERÍA COMO FUENTE DE SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOBUTANOL

El lactosuero, conocido también como suero de quesería, es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso. Se obtiene tras la separación de las proteínas, llamadas caseínas, y de la grasa. Ese líquido constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de sus compuestos que son solubles en agua; su composición varía dependiendo del origen de la leche y el tipo de queso o producto que se haya elaborado, pero en general el contenido aproximado es de 93.1% de agua, 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas (minerales), 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles. Además su pH puede variar entre 5 y 8 (Foda et al., 2010).

Las proteínas y la lactosa contenidas en el suero se transforman en contaminantes cuando el líquido es arrojado al ambiente sin ningún tipo de tratamiento, ya que la carga de materia orgánica que contiene permite la reproducción de microorganismos produciendo cambios significativos en la DBO_5 del agua contaminada. Una industria quesera media produce diariamente 40,000 litros de suero sin depurar lo que genera una contaminación diaria similar a una población de 1,250,000 habitantes. La alta capacidad contaminante del suero de leche, con una DBO_5 entre 30,000 a 50,000 mg/L y una DQO de 60,000 a 80,000 mg/L, además de la cantidad de ácido láctico presente en él, altera significativamente los procesos biológicos que se llevan a cabo en las plantas de tratamiento a donde podría llegar el vertido (Valencia-Denicia y Ramírez-Castillo, 2009).

La producción mundial anual de suero lácteo es de aproximadamente 145 millones de toneladas, de las cuales 6 millones son de lactosa. El suero producido en México es de

cerca de 1 millón de toneladas y contiene 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína. A pesar de esta riqueza nutricional, potencialmente utilizable, el 47% de lactosuero es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación.

Con el empleo del lacto suero como fuente de lactosa para la producción de biobutanol se busca disminuir el vertido de éste desecho en el drenaje de la ciudad, el cual finalmente desemboca en ríos y arroyos, contaminando el ecosistema acuático dañando flora y fauna especialmente por los incrementos que representa en la demanda de oxígeno del cuerpo de agua.

Al verter el suero en las cañerías, además de estar prohibido por la NOM-ECOL-001, se están desperdiciando cantidades considerables de azúcares fermentables que pueden ser aprovechadas para generar alcoholes que a su vez pueden ser empleados como combustibles sustitutos del petróleo y sus derivados.

En la región del centro del país, incluyendo el estado de Aguascalientes, se han establecido importantes empresas que industrializan lácteos y se dedican a la producción de queso. Estas industrias son proveedores potenciales de suero de leche para la producción de bioalcoholes.

1.6 ESTRATEGIAS MOLECULARES Y DE PROCESO PARA LA GENERACIÓN DE MUTANTES BACTERIANAS

En la década pasada se volvió común el uso de herramientas para efectuar ingeniería metabólica que permita modificar y mejorar cepas bacterianas. Según Niemistö et al. (2013) y Dong et al. (2012), en el caso específico de las cepas productoras de butanol, lo que se busca es incrementar el rendimiento de éste solvente mediante:

- Incrementar el rango de sustratos utilizables
- Incrementar el rendimiento de butanol sobre la fuente de carbono
- Mejorar la producción selectiva de butanol, en vez de obtener mezclas de ácidos y solventes, e

- Incrementar la tolerancia de la bacteria a la inhibición por productos (especialmente el butanol).

Las estrategias empleadas para la modificación de cepas bacterianas son variadas y abarcan desde el uso de agentes físicos y químicos para efectuar mutagénesis al azar hasta el uso de ingeniería metabólica avanzada para mutagénesis dirigida.

1.6.1 GENERACIÓN DE MUTANTES POR AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS

El material genético puede sufrir cambios espontáneos o cambios por la acción de ciertos agentes físicos y químicos. Las mutaciones producen cambios en el genotipo, alterando la secuencia de bases en los genes. Dependiendo de la extensión del cambio, se producirán mutaciones puntuales o aberraciones cromosómicas. Existen una gran variedad de agentes físicos y químicos que pueden inducir mutaciones. Algunos de los mutágenos empleados en cepas de clostridios han sido sulfonato de etilmetano (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), radiación ultravioleta, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, ácido nalidixico, metronidazol, entre otros (Thomas et al., 2014).

1.6.1.1 MUTÁGENOS QUÍMICOS

Según su modo de acción se clasifican en:

- Análogos de bases
 - Agentes que reaccionan con el DNA
 - Agentes intercalantes
- a) Análogos de bases: Debido a su similitud estructural los análogos de bases como el 5-Bromouracilo o la 2-Aminopurina se incorporan en el DNA que se replica en lugar de las bases correspondientes timina y adenina. Cuando uno de estos análogos de bases se incorpora en el DNA, la replicación puede ocurrir normalmente aunque ocasionalmente, ocurren errores de lectura que resultan en la incorporación de bases erróneas en la copia de DNA.

- b) Agentes que reaccionan con el DNA: reaccionan directamente sobre el DNA que no se está replicando ocasionando cambios químicos en las bases, lo que provoca un apareamiento incorrecto. Algunos de ellos son el ácido nitroso, hidroxilamina, agentes alquilantes, N-metil-N-nitro- nitrosoguanidina.
- c) Agentes intercalantes: son moléculas planas que se insertan entre dos pares de bases del DNA, separándolas entre sí. Durante la replicación, esta conformación anormal puede conducir a microinserciones o microdelecciones en el DNA, originando mutaciones por corrimiento de lectura. El principal ejemplo de este grupo es el bromuro de etidio.

Debido a la estructura de la pared celular de los clostridios y la baja permeabilidad intrínseca de las membranas plasmáticas, las bacterias del género *Clostridium* son recalcitrantes a la electrotransformación y a la transformación química (Thomas et al., 2014).

1.6.1.1 MUTÁGENOS FÍSICOS

- a) Luz ultravioleta: La longitud de onda efectiva para la mutagénesis está comprendida entre los 200 y 300 nm, región conocida como de onda corta, UV lejano o UV-C (Gayán et al., 2013). A 260 nm de longitud de onda de la radiación se da la máxima absorción por parte del DNA, la longitud de onda con mayor efecto germicida y mutágeno es la de 254 nm (Eisenstark, 1998). La radiación a longitudes de onda entre 300 y 400 nm tiene menos efectos letales y mutagénicos que la luz UV de longitud de onda corta. Los productos más importantes de la acción de la luz UV son dímeros (timina-timina; timina-citosina; citosina-citosina) que se forman entre pirimidinas (T, C) adyacentes, lo que incrementa enormemente la probabilidad de que durante la replicación del DNA, la DNA polimerasa inserte un nucleótido incorrecto en tal posición, pudiendo llevar a la muerte celular (Gayán et al., 2013).
- b) Radiación ionizante: La radiación ionizante es una forma de radiación más potente e incluye rayos de longitud de onda corta como los rayos X, rayos cósmicos y rayos gamma. Esta radiación causa la ionización del agua y de

otras sustancias; produciéndose indirectamente efectos mutagénicos debido a esta ionización. Entre las potentes especies químicas formadas por la radiación ionizante se encuentran radicales libres, siendo el más importante el radical hidroxilo (OH[·]). Los radicales libres reaccionan en la célula con macromoléculas, como el DNA, y las inactivan produciendo rupturas que dan lugar a cambios estructurales importantes como son las mutaciones cromosomales. A bajas dosis de radiación ionizante sólo ocurren unos cuantos impactos sobre el DNA, pero a mayores dosis ocurren impactos múltiples que conducen a la muerte de la célula.

1.6.2 GENERACIÓN DE MUTANTES POR MÉTODOS BIOLÓGICOS

La generación de mutantes bacterianas por métodos biológicos se puede obtener trabajando a un nivel molecular, o bien, forzando a la bacteria a adaptarse a las condiciones del medio donde se desea se desarrolle.

Las estrategias moleculares, llamadas de ingeniería genética, incluyen la mutagénesis dirigida empleando técnicas avanzadas de biología molecular como la inserción de plásmidos y la delección de estos, la expresión policistónica de genes de producción de butanol en organismos heterólogos que no tienen la capacidad natural de esporular, sistemas promotores inducibles, estrategias de supresión, microarreglos de ADN, mutagénesis por transposición, mutagénesis sitio dirigida (empleando la herramienta Clostron para el caso específico de los clostridios) y tecnologías de ARN antisentido (Pérez-Mancilla y Montoya-Castaño, 2013). En cuanto a las técnicas adaptativas la más empleada es la siembra de la cepa que se desea mutar en medios de cultivo que contienen el agente al que se desea se adapten.

La ingeniería metabólica de una cepa bacteriana puede realizarse insertando genes de otra bacteria, silenciando la expresión de genes presentes en la bacteria (knockdown/out) modificando así su metabolismo, regulando la expresión de genes para mejorar su resistencia contra agentes inhibidores, o bien, borrando o restringiendo los genes involucrados en la esporulación de la bacteria (Niemistö et al., 2013).

1.6.2.1 ANTECEDENTES DE GENERACIÓN DE MUTANTES PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE BUTANOL CON *Clostridium*

Como se mencionó anteriormente la acumulación de butanol en el medio de cultivo marca el inicio de una fase de esporulación en *Clostridium*, causando la inactivación del cultivo. En el mejoramiento del proceso fermentativo ABE se han dedicado los esfuerzos principalmente a incrementar la producción natural de butanol, ampliar el rango de posibles sustratos utilizados y a incrementar la tolerancia a los solventes por parte de la célula (Pérez-Mancilla y Montoya-Castaño, 2013).

Algunos grupos han intentado la selección adaptativa para aumentar la resistencia de los cultivos ante el butanol, este no ha sido el enfoque más adecuado debido a que la regulación de la solventogénesis está íntimamente acoplada a la esporulación y por tanto es necesario manipular genéticamente cepas de *Clostridium* para evitar que las bacterias detecten las señales de inicio del proceso de esporulación y no formen cuerpos de resistencia, ya que estos no son productores de butanol (Rajchenberg-Ceceña et al., 2009).

Lin y Blaschek (1983) caracterizaron una cepa de *C. acetobutylicum* que alcanzó títulos de producción de butanol de 7.9 g/L en un medio que contenía extracto de maíz al 6%. Ellos reportan el desarrollo de mutantes tolerantes al butanol obtenidas mediante transferencias consecutivas a medios con cantidades gradualmente mayores de butanol; una de sus cepas tolerantes reportó el máximo porcentaje de consumo de carbohidrato, el mejor rendimiento de conversión a butanol y la mayor concentración alcanzada (18.6 g/L de butanol), sin embargo, también se produjeron cantidades importantes de acetona y etanol, aún en la cepa adaptada. Empleando otra especie de *Clostridium*, *C. beijerinckii*, Formanek et al., (1997) lograron alcanzar títulos de butanol de 18.6 g/L partiendo de medios glucosados al 6%. Desafortunadamente en dichos experimentos se produjeron también 8.6 g/L de acetona.

Zhang et al. (1996) emplearon un tratamiento químico con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) para producir mutaciones en *C. acetobutylicum* ATCC 824, la acción del químico produjo una cepa súper productora de butanol incapaz de esporular, la cual fue denominada EA2018. Con el tratamiento químico se lograron un total de 46 sitios

de delección y 26 sitios de inserción (72 en total), incluyendo un sitio de delección en el mega plásmido; contiene 451 variaciones de nucleótidos simples (SNVs). EA2018 es 99.8% idéntica genéticamente a ATCC 824. El 70% del total de solventes producidos por EA2018 es butanol.

Mao et al. (2011) utilizaron dietil sulfato (DES) al 1% (v/v) como estrategia de mutación aleatoria del genoma en *C. acetobutylicum* DSM1731. Obtuvieron una cepa tolerante a la presencia de 19 g/L de butanol y capaz de crecer a concentraciones de butanol de 18 g/L a pesar de que el crecimiento de la cepa nativa de donde fue obtenida era severamente afectada por concentraciones de butanol de 12 g/l. La mutante obtenida fue nombrada Rh8, en fermentaciones por lote esta cepa demostró producir 18% más acetona y 23 % más butanol que la cepa nativa de donde fue obtenida. Los estudios realizados sobre la cepa obtenida afirman que esta cepa tolerante puede tener una estructura de membrana más estable, lo que le permite soportar mayores concentraciones de butanol. Se han realizado también trabajos a nivel molecular para incrementar la producción de butanol empelando cepas de *Clostridium*. La primer cepa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 exitosamente mejorada mediante ingeniería metabólica fue la reportada por Papoutsakis en los 90's, su grupo de trabajo logró incluir en las bacterias plásmidos que contenían los genes CAC1869 y CAC0003 que permitieron observar un incremento en la tolerancia al butanol de un 13 y 81 % respectivamente, comparados con la cepa control.

Liyanage et al. (2000) lograron disminuir la toxicidad del butanol hacia el cultivo mediante la generación de ARN antisentido contra la glicerol deshidrogenasa en *C. beijerinckii*. Nair y Papoutsakis (1994), con la finalidad de hacer el proceso más específico, transformaron mutantes de *C. acetobutylicum* deficientes en la producción de butanol y acetona con un plásmido portador del gen que codifica para la enzima aldehído/alcohol deshidrogenasa (AAD). Ésta sobre-expresión restableció la producción de butanol (84 mM) sin la formación de acetona ni un incremento en la producción de etanol. Otros grupos están intentando modificar el factor de transcripción Spo0A para interrumpir la capacidad de regulación de esporulación, pero hasta ahora sin mucho éxito (Lee et al., 2008). Otros puntos del metabolismo regulatorio pueden ser interrumpidos, el reciente desarrollo del sistema ClosTron, que funciona mediante el apareamiento de un intrón

modificado y que permite interrumpir genes en cualquier especie de *Clostridium*, de una manera estable, potencialmente podrá solventar estas limitantes para inactivar genes que hasta hace poco no se sabía que existían (Cooksley et al., 2012).

Shao et al. (2007) emplearon la tecnología TargeTron, tecnología basada en un sistema de intrones del grupo II, para generar una disrupción del gen *adc* en *C. acetobutylicum* EA2018. El gen *adc* codifica para la síntesis de la acetoacetato descarboxilasa, enzima clave involucrada en la producción de acetona. Se generó una mutante denominada 2018*adc*, la cual logró que del total de solventes producidos el 80.05 % fuera butanol, mientras que con EA2018 se lograba sólo el 70 %. La cepa mutante produjo títulos de acetona máximos de 0.21 g/L, sin embargo resultó ser inhibida por concentraciones más bajas de etanol y butanol que la cepa de la que fue obtenida.

Otro trabajo relevante sobre mutagénesis empleando ingeniería metabólica es el de Zhu et al. (2011) quienes introdujeron y sobre expresaron en *C. acetobutylicum* DSM1731 genes de *E. coli* responsables de la biosíntesis de glutatión (GSH). *C. acetobutylicum* DSM1731 logró sintetizar GSH y al hacerlo incrementó su tolerancia al aire (oxígeno) y su capacidad de producir butanol. Los estudios realizados postulan que la presencia del GSH reduce las especies reactivas de oxígeno (ROS) manteniendo el balance redox en las células, mejorando concomitantemente la tolerancia de la bacteria a la presencia de oxígeno. Además la reducción de los ROS permite a la célula resistir a los solventes, ácidos y presión osmótica, esto incrementa la tolerancia al butanol y a la producción del mismo.

Ren et al. (2010), empleando también la tecnología de intrones del grupo II, logró la disrupción del gen *CAC3037* en *C. acetobutylicum* ATCC 824, generando así la mutante 824 *ccpA*. *CAC3037* codifica para el gen *CcpA*, el cual le permite a la bacteria emplear la xilosa como fuente de carbono, aún en medios que contienen glucosa, sin presentar represión por catabolitos de carbono, situación que es de gran relevancia cuando se desean emplear como fuentes de carbono los productos de la hidrólisis de residuos lignocelulósicos.

2. JUSTIFICACIÓN

El consumo de energía a nivel mundial se ha incrementado en el último siglo, ocasionado principalmente por el crecimiento de la población y por la industrialización de muchas ciudades. Aunado a esto, la crisis ecológica inminente, debida sobre todo al alto consumo de petróleo como energético principal, obliga al replanteamiento urgente de estructuras alternativas tanto industriales como económicas viables para sustituir, o por lo menos disminuir, el uso de éste combustible fósil y sus derivados (Rajchenberg-Ceceña et al., 2009).

Varios países han enfocado e intensificado sus esfuerzos en desarrollar programas de investigación en biocombustibles los cuales puedan proveer combustibles líquidos útiles para la transportación (Himmel et al., 2007). Aunque el uso de microorganismos para la producción de combustibles ha existido desde hace un siglo, resurge en esta coyuntura con mucho mayor vigor y como una promesa factible para el futuro de dichos productos (Rajchenberg-Ceceña et al., 2009).

Con base en lo anterior esta investigación busca proporcionar una alternativa de solución a dos grandes problemas actuales del estado de Aguascalientes y zonas aledañas; 1) la generación de una fuente alterna de energía que permitan sustituir, al menos parcialmente, el consumo de combustibles fósiles y 2) disminuir las emisiones de desechos de las industrias lácteas en los ecosistemas acuáticos y por ende disminuir los daños a estos ecosistemas.

3. HIPÓTESIS

La producción de biobutanol empleando una cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum* súper productora de butanol y resistente a concentraciones superiores a 20 g/L de solventes permitirá diseñar un proceso de fermentación ABE cuyos rendimientos y productividades serán superiores a los obtenidos con el cultivo de las cepas silvestres de la mencionada bacteria.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un proceso de producción de biobutanol, con mayor productividad que la que se obtiene empleando cepas silvestres, utilizando una mutante de *Clostridium acetobutylicum* y, como sustrato, suero de quesería.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Generar una cepa mutante de *Clostridium acetobutylicum* súper productora de biobutanol, resistente a la presencia de un concentración de solventes de 20 g/L.
- 2) Diseñar un sistema de fermentación ABE a partir de suero de quesería que favorezca al incremento de la productividad y rendimiento del proceso fermentativo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MICROORGANISMOS

5.1.1 *Clostridium acetobutylicum* CDBB-B-797

Obtenida de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del I.P.N.

Acrónimos: NBRC 13948, ATCC 824, BCRC 10639, CCUG 42182, CCRC 10639, DSM 792, IAM 19013, JCM 1419, KCTC 1790, LMG 5701, NCCB 84048, NRRL B-527, NCCB 29024, NCCB 84048, NCIMB 8052, VKM B-1787.

Características: cepa tipo, McCoy et al. 1926 emend. Keis et al. 2001. Aislada de harina de maíz.

5.1.1.1 ESPORAS LIOFILIZADAS (CDBB-B-797 (1))

La cepa se recibió en forma de esporas liofilizadas en una ampolleta sellada. Para recuperar la cepa se efectuaron los pasos que a continuación se describen.

5.1.1.1.1 APERTURA DE AMPOLLETA Y REHIDRATACIÓN

1. Con un cortador de vidrio se hizo una marca o rasguño en el centro de la ampolleta.
2. Se colocó la ampolleta en etanol al 70 % durante unos minutos.
3. Se ajustó la ampolleta en una tira de papel o tela de fieltro.
4. Se rompió la ampolleta en la marca hecha con el cortador.
5. Se transfirió la pastilla liofilizada al medio de rehidratación.
6. Se desecharon las mitades de la ampolleta en solución desinfectante.

El microorganismo liofilizado se colocó en el medio de rehidratación e incubó a 35-37°C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis, lograda en frascos sellados efectuando el consumo total de oxígeno por combustión.

5.1.1.1.2 REACTIVACIÓN DE ESPORAS

Se sometió a las esporas rehidratadas a choque térmico a 80°C (Parekh y Blaschek, 1999) durante 3 minutos, posteriormente se les colocó en un medio de cultivo para *C. acetobutylicum* y se incubaron a 35-37°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis (AMBI-HI-LO Chamber 3550, Lab-line Instruments).

5.1.1.1.3 MANTENIMIENTO DE CEPA BACTERIANA

La cepa de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 (1) fue resembrada con una periodicidad de 14 días sobre medio sólido para *C. acetobutylicum*. Cada resiembra fue incubada a 35-37°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis (AMBI-HI-LO Chamber 3550, Lab-line Instruments) y posteriormente almacenada en refrigeración a 4°C.

5.1.1.2 CÉLULAS VEGETATIVAS (CDBB-B-797 (2))

Se recibió nuevamente la cepa bacteriana pero en esta ocasión como células vegetativas en crecimiento exponencial a 37°C en medio reforzado para *Clostridium*.

5.1.1.2.1 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA POR CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO

La cepa bacteriana fue resembrada en tres medios de cultivo sólidos: medio para *C. acetobutylicum*, medio reforzado para *Clostridium* y agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja desfibrinada. Los cultivos se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis (AMBI-HI-LO Chamber 3550, Lab-line Instruments) hasta observar la aparición de colonias bacterianas. Se observaron las características de las colonias obtenidas y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.1.1.2.2 MANTENIMIENTO DE CEPA BACTERIANA

La cepa de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 (2) fue resemebrada con una periodicidad de 14 días sobre medio sólido para *C. acetobutylicum*. Cada resiembra fue incubada a 35-37°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis (AMBI-HI-LO Chamber 3550, Lab-line Instruments) y posteriormente almacenada en refrigeración a 4°C.

5.1.2 *Clostridium acetobutylicum* ATCC® 824™

Obtenida de la American Type Culture Collection.

Designaciones: CCRC 10639, CCUG 42182, DSM 792, IAM 19013, IFO 13948, JCM 1419, KCTC 1790, L.S. McClung 2291, LMG 5710, McCoy and McClung strain W, NCCB 29024, NCCD 84048, NCIMB 8052, VMK B-1787.

Características: cepa tipo, McCoy et al. 1926 emend. Keis et al. 2001. Aislada de harina de maíz.

La cepa se recibió en forma de esporas liofilizadas comprimidas en una tableta dentro de una ampolleta sellada. Para recuperar la cepa se efectuaron los pasos que a continuación se describen.

5.1.2.1 APERTURA DE AMPOLLETA Y REHIDRATACIÓN

1. Con un cortador de vidrio se hizo una marca o rasguño en el centro de la ampolleta.
2. Se colocó la ampolleta en etanol al 70% durante unos minutos.
3. Se ajustó la ampolleta en una tira de papel o tela de fieltro.
4. Se rompió la ampolleta en la marca hecha con el cortador.
5. Se transfirió la pastilla liofilizada al medio de rehidratación (RCM)
6. Se desecharon las mitades de la ampolleta en solución desinfectante.

El microorganismo liofilizado se colocó en el medio RCM líquido; se diluyó la tableta comprimida en 6 ml de medio de cultivo previamente esterilizado. Una vez disuelta la tableta se tomaron 2 alícuotas de 0.5 mL de la suspensión y se colocaron en tubos con 5 mL c/u de medio RCM líquido. Por indicaciones del proveedor se tomaron también 2 alícuotas de 0.2 mL y se dispersaron sobre placas de agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja. Los caldos de cultivo y 1 de las placas fueron incubados a 37°C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis, lograda en frascos sellados efectuando el consumo total de oxígeno por combustión. La otra placa fue cultivada en condiciones de anaerobiosis para descartar contaminación por microorganismos aerobios.

5.1.2.2 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA POR CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO

La cepa bacteriana fue sembrada en agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja desfibrinada, por indicaciones del proveedor (ATCC). Los cultivos se incubaron a 37°C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis hasta observar la aparición de colonias bacterianas típicas. Según la hoja del producto ATCC 824 deben observarse dos tipos de colonias, ambas circulares, grises y no hemolíticas. La colonia de mayor presencia debe ser lisa y traslúcida mientras que la otra colonia debe ser traslúcida y adherirse al agar. Al observarse el crecimiento de colonias típicas puede comenzar a trabajarse con la cepa bacteriana en los procesos fermentativos.

5.1.2.3 MANTENIMIENTO DE CEPA BACTERIANA

La cepa de *C. acetobutylicum* ATCC 824 fue resembrada con una periodicidad de 14 días sobre medio sólido para *C. acetobutylicum*. Cada resiembra fue incubada a 35-37°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis y posteriormente almacenada en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.2 MEDIOS DE CULTIVO

5.2.1 MEDIO DE CULTIVO DE REHIDRATACIÓN

Se empleó en la rehidratación de esporas liofilizadas. Recomendado por los proveedores de la cepa bacteriana. Composición por litro:

-Bactopeptona (BIOXON)	10g
-Extracto de levadura (BIOXON)	2g
-MgSO ₄ 7H ₂ O (Productos Químicos Monterrey, 99.5%)	1g

Modo de preparación: los componentes se diluyeron en agua destilada aforando a volumen final de 1 litro. Se ajustó pH a 7.0 empleando NaOH 1M y se esterilizó en autoclave a 15 psi – 121°C por 15 minutos. Se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.2.2 MEDIO DE CULTIVO PARA *Clostridium acetobutylicum* (MPC)

Medio para crecimiento y mantenimiento celular específico para *C. acetobutylicum* reportado por Atlas (2004).

Composición por litro para medio líquido:

- Hojuelas de papa secas (Verde Valle)	40 g
- Glucosa (Karal, 99.9%)	6 g
- CaCO ₃ (Golden Bell, USP)	2 g
- L-cisteína-HCl-H ₂ O (Sigma-Aldrich, 99%)	0.5 g
- Resazurina, sal sódica (Sigma-Aldrich, 100%)	1.0 mg

Para medio sólido adicionar por litro:

- Agar bacteriológico (BD)	15 g
----------------------------	------

Modo de preparación: Se disolvieron las hojuelas de papa y el CaCO_3 en agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1 litro. Para diluir las hojuelas de papa fue necesario calentar la solución sin llegar a ebullición, aproximadamente a 60°C . Esterilizar en autoclave por 30 minutos a 15 psi- 121°C . El medio esterilizado y frío se filtró en manta de cielo y posteriormente en papel filtro cuantitativo (Ahlstrom, grado 54). Al filtrado se le adicionaron el resto de los componentes; la rezasurina se adicionó en solución (1 mg/mL en agua destilada). Se aforó nuevamente a 1 litro, se ajustó el pH del medio a 7.0 empleando NaOH 1 M y se esterilizó nuevamente en autoclave a 15 psi- 121°C por 20 minutos.

Cuando se preparó medio sólido el medio estéril enfriado a aproximadamente 50°C se vertió en cajas de Petri, colocando de 15 a 20 mL por caja, cuidando siempre las condiciones de esterilidad.

El medio se almacenó a 4°C hasta su uso, para poder ser utilizado debía tener una coloración rosa característica indicadora de las condiciones de reducción en el medio.

5.2.2.1 MPC ADICIONADO CON BUTANOL

Medio para selección, crecimiento y mantenimiento celular de cepas mutantes resistentes a butanol.

Se empleó medio sólido para *Clostridium acetobutylicum* (MPC) cuyo método de preparación ha sido previamente descrito. Para adicionar el butanol al medio debió agregarse la cantidad deseada al matraz que contenía el medio estéril y caliente antes de ser colocado en las cajas de Petri. El butanol adicionado debió mezclarse perfectamente con el medio de cultivo antes de que éste comenzara a solidificarse (aproximadamente a 50°C), esto para asegurar la distribución homogénea del solvente en el medio de cultivo.

Se empleó butanol (J.T. Baker, 99.4%) a concentraciones 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 3.0, 4.0 y 5.0 % v/v.

Lo medios adicionados con butanol fueron sellados y almacenados en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.2.3 MEDIO REFORZADO PARA CLOSTRIOS MODIFICADO (RCM)

Medio ATCC 2107, recomendado para el crecimiento y mantenimiento celular de *C. acetobutylicum*.

Composición por litro para medio líquido:

- Peptona (BIOXON)	10 g
- Extracto de carne (BIOXON)	10 g
- Extracto de levadura (BIOXON)	3 g
- Dextrosa (Karal, 99.9%)	5 g
- NaCl (J.T. Baker, 100%)	5 g
- Almidón soluble (Merck)	1 g
- L-cisteína-HCl-H ₂ O (Sigma-Aldrich, 99%)	0.5 g
- Acetato de sodio (J.T. Baker, 99.6%)	3 g
- Resazurina, sál sódica (Sigma-Aldrich, 100%)	1.0 mg

Para medio sólido adicionar por litro:

- Agar bacteriológico (BD)	15 g
----------------------------	------

Modo de preparación: se disolvieron todos los reactivos en agua destilada aforando a un volumen final de 1 litro. La Resazurina se adicionó en solución (1 mg/mL en agua destilada), se ajustó el pH del medio a 6.8 empleando NaOH 1M y se esterilizó en autoclave a 15 psi-121°C por 15 minutos.

Cuando se preparó medio sólido el medio estéril enfriado a aproximadamente 50°C se vertió en cajas de Petri, colocando de 15 a 20 mL por caja, cuidando siempre las condiciones de esterilidad. El medio se almacenó a 4°C hasta su uso.

**5.2.4 AGAR SOYA TRIPTICASEÍNA CON 5% SANGRE DE OVEJA
(DEFIBRINADA)**

Medio ATCC 260, recomendado para identificación de colonias típicas de *C. acetobutylicum*.

Composición por litro:

- Caldo soya tripticaseína (BIOXON 211670) 40 g
- Sangre de oveja defibrinada 50 ml
- Agar bacteriológico (BD) 15 g

Modo de preparación: el caldo soya tripticaseína y el agar se diluyeron en agua destilada hasta alcanzar un volumen de 950 mL, el pH del medio debía ser 7.3 ± 0.2 , el medio se esterilizó en autoclave a 15 psi-121°C por 15 minutos. Por separado 50 mL de sangre de oveja fueron defibrinados por agitación constante de la sangre con perlas de cristal previamente esterilizadas hasta que se dejara de escuchar el golpeteo de las perlas. El medio estéril se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C y se le adicionó la sangre defibrinada. El medio se colocó en placas de Petri, con 15-20 mL por caja. Antes de inocular las cajas se debió probar su esterilidad incubándolas 24 horas a 37°C, al no observarse ningún crecimiento en el medio éste fue almacenado en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.3 MEDIOS DE FERMENTACIÓN

5.3.1 SUERO DE QUESERÍA DESPROTEINIZADO

El suero de leche fresco obtenido de desuerado de requesón de la Posta zootécnica de la UAA se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta ser utilizado. Para la desproteización del suero se ajustó el pH del mismo a 5.2 empleando HCl 1M y se esterilizó en autoclave a 14 psi-115°C durante 15 minutos. pH = 5.2 punto isoeléctrico de la β -lactoglobulina, proteína más abundante del lactosuero con una concentración de 2 a 4 mg/mL (Gil-Zamora, 2007). Al ajustar el pH a este valor se busca retirar la mayor

cantidad de proteínas presente en el lactosuero, sin embargo existen otras proteínas de suero como la alfa lactalbúmina (presente en suero de vaca de 1 a 1.5 mg/mL, punto isoeléctrico 4.8), inmunoglobulinas (0.4 a 1 mg/mL), seroalbúmina (alrededor de 0.4 mg/mL), glicomacropéptido y lactoferrina (punto isoeléctrico 9) que pueden permanecer en solución y servir como una fuente de nitrógeno para el microorganismo (Gil-Zamora, 2007). Es importante cuidar que la temperatura de esterilización no exceda los 115°C ya que pueden caramelizarse los azúcares del suero.

Una vez esterilizado el suero se filtró para eliminar las proteínas precipitadas; la filtración se efectuó en primera instancia en manta de cielo para retener las partículas de mayor tamaño y posteriormente empleando papel filtro cuantitativo (Ahlstrom, grado 54). Todo el proceso de filtrado se realizó empleando material estéril y en condiciones asépticas. El pH del suero se reajustó a 7.0, empleando para ello NaOH 1M estéril. El suero con pH ajustado fue almacenado en refrigeración a 4°C hasta ser empleado para las fermentaciones.

5.3.1.1 SUERO DE QUESERÍA ADICIONADO CON HIERRO (Fe^{+3})

El suero previamente desproteínizado y ajustado a pH 7.0 fue adicionado con $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Jalmex, 99.0%) en cantidades necesarias para alcanzar una concentración final de 10 mg Fe/L y 20 mg Fe/L en el suero según los requerimientos de la fermentación. El hierro fue adicionado justo antes del montaje de la fermentación.

Se suministra fuente de hierro para permitir que *C. acetobutylicum* produzca la ferredoxina requerida para dirigir su metabolismo hacia la ruta solventogénica y no hacia la producción de lactato (Gheshlaghi et al., 2009; Lee et al., 2008; Ennis, 1987).

5.3.1.2 SUERO DE QUESERÍA ADICIONADO CON HIERRO (Fe^{+2})

El suero previamente desproteínizado y ajustado a pH 7.0 fue adicionado con $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Productos Químicos Monterrey, 99.0%) en cantidades necesarias para alcanzar una concentración final de 10 mg Fe/L y 20 mg Fe/L en el suero según los

requerimientos de la fermentación. El hierro fue adicionado justo antes de montar la fermentación.

Se emplea esta fuente de hierro por encontrarse referenciada en los trabajos de Li et al. (2014), Foda et al. (2010), Groot et al. (1989), Ennis (1987), Lin et al.(1983), Bahl et al. (1982), entre otros.

5.3.1.3 SUERO DE QUESERÍA ADICIONADO CON EXTRACTO DE LEVADURA

El suero previamente desproteinizado y ajustado a pH 7.0 fue adicionado con extracto de levadura (BIOXON) a concentración de 5 g/L. Para preparar el medio el extracto de levadura se pesa y esteriliza en autoclave a 15 psi-121°C por 15 minutos y posteriormente se mezcla con el suero previamente preparado. El medio de fermentación se almacena en refrigeración a 4°C hasta su uso.

La adición de este componente se realizó para verificar si ayuda a mejorar el proceso fermentativo fungiendo como fuente de biotina y algunos iones que no estuvieran presentes en el suero de leche según lo reportado por Weizmann y Rosenfeld (1937). El medio adicionado con extracto de levadura no fue suplementado con ninguna fuente adicional de hierro.

5.3.1.4 SUERO DE QUESERÍA FORTIFICADO

El suero previamente desproteinizado y ajustado a pH 7.0 fue adicionado con una serie de nutrientes reportados por Ennis (1987) para verificar la influencia de estos nutrientes sobre el proceso fermentativo y la producción de solventes deseados.

Composición por litro:

- Extracto de levadura (BIOXON) 5 g
- Acetato de amonio (Productos Químicos Monterrey, 98.0%) 2 g
- NaCl (J.T. Baker, 100%) 1 g

- L-cisteína-HCl-H ₂ O (Sigma-Aldrich, 99%)	0.5 g
- KH ₂ PO ₄ (J.T. Baker, 99.7%)	0.75 g
- K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker, 100%)	0.75 g
- MgSO ₄ 7H ₂ O (Productos Químicos Monterrey, 99.5%)	0.41 g
- MnSO ₄ 4H ₂ O (Merck, 98.5%)	0.008 g
- FeSO ₄ 7H ₂ O (Productos Químicos Monterrey, 99.0%)	0.01 g
- Suero de leche desproteínizado estéril pH 7.0	c.b.p. 1 L

Modo de preparación: se pesaron todos los reactivos a excepción del suero de leche y se esterilizaron en autoclave a 15 psi-121°C por 15 minutos. Bajo condiciones asépticas se adicionó a la mezcla de reactivos suero de leche previamente desproteínizado y ajustado su pH a 7.0, hasta alcanzar un volumen de 1 litro. Se agitó el medio hasta la completa dilución de todos sus componentes. El medio de fermentación se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.3.1.5 SUERO DE QUESERÍA SUPLEMENTADO CON EXTRACTO DE LEVADURA, CARBONATO DE CALCIO Y HIERRO

El suero previamente desproteínizado fue adicionado con extracto de levadura (BIOXON) a concentración de 5 g/L y carbonato de calcio (Golden Bell, USP) a una concentración de 18 g/L, nutrientes reportados por Napoli et al. (2009), para verificar la influencia de estos nutrientes sobre el proceso fermentativo y la producción de solventes deseados al emplear la lactosa del suero como fuente de carbono. Adicionalmente este suero fue suplementado con dos fuentes de hierro distintas: FeCl₃ 6H₂O (Jalmex, 99.0%) y FeSO₄ 7H₂O (Productos Químicos Monterrey, 99.0%), a concentraciones finales de 20 mg Fe/L, esto para evaluar el efecto de la adición del hierro sobre el metabolismo fermentativo de *C. acetobutylicum*. El suero se preparó agregando el extracto de levadura y carbonato de calcio, ajustando el pH del mismo a 7.0. El hierro fue adicionado justo antes de montar la fermentación.

5.3.2 MEDIOS SINTÉTICOS SIMULANDO SUERO DE QUESERÍA

5.3.2.1 CALDO LACTOSADO

Composición por litro:

- Lactosa (ANALAR, 99.5%) 50 g
- Extracto de levadura (BIOXON) 5 g
- CaCO₃ (Golden Bell, USP) 1.8 g
- Fuente de hierro
 - o FeCl₃·6H₂O (Jalmex, 99.0%)
 - o FeSO₄·7H₂O (Productos Químicos Monterrey, 99.0%)

Modo de preparación: la lactosa, extracto de levadura y carbonato de calcio se pesaron y disolvieron en agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1 litro. Se ajustó el pH de la solución a 7.0 empleando NaOH 1M y se esterilizó en autoclave a 15pi-121°C por 15 minutos. El caldo lactosado se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su uso. Justo antes de ser utilizado se adicionó al caldo la fuente de hierro requerida (FeCl₃·6H₂O o FeSO₄·7H₂O) para lograr concentraciones finales de 10 mg Fe/L o 20 mg Fe/L según el experimento, indicando siempre la fuente de hierro y la concentración empleada.

5.3.2.2 CALDO LACTOSADO NAPOLI

Medio sintético que simula suero de leche reportado por Napoli et al. (2009) en el que se ha demostrado la capacidad de *C. acetobutylicum* DSM 792 (acrónimo de ATCC 824) para producir los solventes de interés: producción de butanol de 9.9 g/L en cultivo por lote.

Composición por litro:

- Lactosa (ANALAR, 99.5%) 50 g
- Extracto de levadura (BIOXON) 5 g
- CaCO₃ (Golden Bell, USP) 18 g

Modo de preparación: los reactivos se pesan y disuelven en agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 1 litro. Se ajusta el pH del medio a 7.0 empleando NaOH 1M y se esteriliza en autoclave a 15 psi-121°C por 15 minutos. El medio se almacena en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.3.2.3 CALDO LACTOSADO ENNIS

Medio sintético que simula suero de leche reportado por Ennis (1987) en el que se ha demostrado la capacidad de *C. acetobutylicum* P 262 para producir los solventes de interés: producción de butanol de 6.7 g/L en cultivo por lote.

Composición por litro:

- Lactosa (ANALAR, 99.5%)	50 g
- Extracto de levadura (BIOXON)	5 g
- Acetato de amonio (Productos Químicos Monterrey, 98.0%)	2 g
- NaCl (J.T. Baker, 100%)	1 g
- L-cisteína-HCl-H ₂ O (Sigma-Aldrich, 99%)	0.5 g
- KH ₂ PO ₄ (J.T. Baker, 99.7%)	0.75 g
- K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker, 100%)	0.75 g
- MgSO ₄ 7H ₂ O (Productos Químicos Monterrey, 99.5%)	0.41 g
- MnSO ₄ 4H ₂ O (Merck, 98.5%)	0.008 g
- FeSO ₄ 7H ₂ O (Productos Químicos Monterrey, 99.0%)	0.01 g

Modo de preparación: los reactivos se pesan y disuelven en agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 1 litro. Se ajusta el pH del medio a 7.0 empleando NaOH 1M y se esteriliza en autoclave a 15 psi-121°C por 15 minutos. El medio se almacena en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.3.2.4 CALDO GLUCOSADO ENNIS

Medio sintético que simula suero de leche reportado por Ennis (1987) en el que se ha demostrado la capacidad de *C. acetobutylicum* P 262 para producir los solventes de interés: producción de butanol de 3.8 g/L en cultivo por lote.

Composición por litro:

- Glucosa (Karal, 99.9%)	50 g
- Extracto de levadura (BIOXON)	5 g
- Acetato de amonio (Productos Químicos Monterrey, 98.0%)	2 g
- NaCl (J.T. Baker, 100%)	1 g
- L-cisteína-HCl-H ₂ O (Sigma-Aldrich, 99%)	0.5 g
- KH ₂ PO ₄ (J.T. Baker, 99.7%)	0.75 g
- K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker, 100%)	0.75 g
- MgSO ₄ 7H ₂ O (Productos Químicos Monterrey, 99.5%)	0.41 g
- MnSO ₄ 4H ₂ O (Merck, 98.5%)	0.008 g
- FeSO ₄ 7H ₂ O (Productos Químicos Monterrey, 99.0%)	0.01 g

Modo de preparación: los reactivos se pesan y disuelven en agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 1 litro. Se ajusta el pH del medio a 7.0 empleando NaOH 1M y se esteriliza en autoclave a 15 psi-121°C por 15 minutos. El medio se almacena en refrigeración a 4°C hasta su uso.

5.4 MUTAGÉNESIS NO DIRIGIDA DE *C. acetobutylicum*

Para generar cepas mutantes de *C. acetobutylicum* resistentes a concentraciones de butanol superiores a los 20 g/L se empleó un método de mutación no dirigida exponiendo a la cepa a luz ultravioleta UV-C ($\lambda=254\text{nm}$).

Las cepas originales de *C. acetobutylicum* (CDBB-797 y ATCC 824), cultivadas en MPC adicionado con butanol a la máxima concentración soportada (2% v/v) fueron expuestas a radiación con luz ultravioleta por lapsos de 0, 5, 10, 30, 45 y 60 minutos.

Tras cada tiempo de exposición cada microorganismo fue resembrado en medios de cultivo MPC adicionados con concentraciones de butanol superiores a las soportadas. Las cajas de cultivo fueron incubadas en anaerobiosis (AMBI-HI-LO Chamber 3550, Lab-line Instruments) a 35-37°C y se observaron diariamente para registrar el crecimiento de las cepas mutadas. La radiación ultravioleta con longitud de onda de 254 nm fue suministrada con una lámpara UV Spretroline modelo ENF-24 (Fisher Scientific).

La selección de las mutantes a emplear en las fermentaciones se realizó en base a su buen crecimiento y a la capacidad de soportar la presencia del butanol a una concentración dada tras 4 pases de resiembra.

5.4.1 MANTENIMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS MUTADAS

Las mutantes seleccionadas para trabajar en las fermentaciones fueron resembradas con una periodicidad de 28 días sobre medio sólido para *C. acetobutylicum* adicionado con butanol. Cada resiembra fue incubada a 35-37°C en condiciones de anaerobiosis (AMBI-HI-LO Chamber 3550, Lab-line Instruments) hasta observar la aparición de las colonias bacterianas y posteriormente fueron almacenadas en refrigeración a 4°C.

Se efectuó una revisión diaria para detección de contaminantes en los cultivos. Los cultivos contaminados fueron descartados.

5.5 PRODUCCIÓN DE BUTANOL MEDIANTE FERMENTACIÓN ABE

5.5.1 PREPARACIÓN DE INÓCULOS

El tamaño del inóculo fue del 10% del volumen final del medio para las pruebas preliminares y primeras fermentaciones, y del 20% del volumen final en las corridas subsecuentes.

La inoculación del medio de fermentación se efectuó colocando trozos de agar MPC con *C. acetobutylicum* en crecimiento incubado por 48 horas a 35-37°C en el medio

previamente preparado y esterilizado; se colocó el contenido de 1 caja de Petri de 10 cm de diámetro por cada 100 mL de inóculo a preparar. Se eliminó el oxígeno disuelto del medio recién inoculado inyectando (burbujeando) nitrógeno gaseoso (INFRA) a 10 psi durante 1 minuto, salvo que se indique que la fermentación no fue efectuada en anaerobiosis.

El medio inoculado se incubó a 35-37°C por 72 horas en agitación orbital (agitador SK-300, Lab. Companion) a 125 rpm, salvo en algunas fermentaciones de las pruebas preliminares donde el tiempo de incubación fue de 120 horas.

5.5.2 CULTIVO POR LOTE

Fue efectuado en botellas ámbar herméticamente cerradas con tapón de caucho de capacidad de 500 mL y un volumen de trabajo de 400 mL. Cada fermentación se efectuó en condiciones microaerofílicas o de completa anaerobiosis, según se indique en cada corrida fermentativa.

El inóculo previamente preparado e incubado se vertió en los frascos de fermentación. Las condiciones microaerofílicas se lograron empleando botellas cerradas herméticamente; la total anaerobiosis se consiguió burbujeando nitrógeno (INFRA) a 10 psi durante 3 minutos para desplazar el oxígeno disuelto en el medio de cultivo antes de sellar las botellas. Las fermentaciones fueron incubadas a temperatura de 35-37°C con agitación orbital (agitador SK-300, Lab. Companion) a una velocidad de 125 rpm.

La duración de las fermentaciones varió desde los 7 hasta los 28 días, en cada corrida fermentativa se indica el tiempo de duración.

5.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.6.1 MEDICIÓN DE pH

Para cada una de las fermentaciones en cada tiempo de muestro se realizó lo siguiente: empleando una jeringa limpia con aguja estéril se extrajeron del fermentador 2

mL de caldo de cultivo, se colocaron en un tubo de ensaye y se registró el pH del caldo con ayuda de un potenciómetro pH/mV meter UB1-10 Ultrabasic (Denver Instruments). Finalizada la determinación de pH se desechó la muestra.

5.6.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR (BIOMASA)

Para determinar la concentración de biomasa en los caldos de fermentación se emplearon las técnicas de densidad óptica y determinación de peso seco, posteriormente se estableció una correlación entre ellos.

5.6.2.1 DENSIDAD ÓPTICA

En la literatura se encontraron reportadas tres longitudes de onda distintas para determinar la concentración celular de *Clostridium acetobutylicum*: $\lambda = 578$ nm (Bahl et al., 1982); $\lambda = 585$ nm (Lin y Blaschek, 1983); $\lambda = 600$ nm (Napoli, Olivieri, Russo, et al., 2009).

Para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia bajo las condiciones fermentativas empleadas una muestra de 2 mL de medio de cultivo inoculado con *C. acetobutylicum* se colocó en una celdilla desechable de 1 cm de longitud, sobre la muestra se efectuó un barrido en el espectro de 500 a 600 nm, obteniéndose como longitud de onda de máxima absorbancia $\lambda = 585$ nm.

Para cada una de las fermentaciones en cada tiempo de muestro se realizó lo siguiente: empleando una jeringa limpia con aguja estéril se extrajeron del fermentador 2 mL de caldo de cultivo, se colocaron en una celdilla desechable de 1cm de longitud y se midió su densidad óptica a 585nm empleando para ello el espectrofotómetro Evolution 201 UV-visible Spectrophotometer (Thermo Scientific). El blanco empleado en cada una de las determinaciones fue el medio de cultivo idéntico al que se empleó para la fermentación, pero sin ser inoculado. Una vez realizada la medición se desechó la muestra.

5.6.2.2 PESO SECO

En tubos eppendorf previamente pesados y marcados se colocó 1 mL de cada muestra perfectamente homogenizada, después de registrar su densidad óptica. El contenido de los tubos se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 min (Napoli et al., 2008), empleando para ello la centrífuga Micro 17TR (Hanil Science Industrial Co.) El sobrenadante se retiró y el precipitado se secó en estufa precalentada a 110°C por 24 horas (Groot et al., 1989). Se registró nuevamente el peso de cada tubo tras 24 horas de secado y hasta registrar pesos constantes. Se calculó por diferencia de peso el peso de la biomasa contenida en 1mL de medio de cultivo. El blanco empleado para las determinaciones de peso seco fue 1 mL de medio de cultivo sin inocular, para restar el peso debido a sólidos presentes en el caldo de cultivo. Cada determinación se realizó por triplicado.

5.6.2.3 CORRELACIÓN ENTRE DENSIDAD ÓPTICA Y PESO SECO

Para cada una de las cepas (CDBB-797 y ATCC 824) fue determinada una correlación entre los valores registrados para absorbancia a 585 nm y el peso seco de biomasa contenido en el medio de cultivo. Para determinar esta correlación se consideraron las densidades ópticas y pesos secos registrados para las muestras durante la fase exponencial de crecimiento y la fase de deceleración. Con los datos registrados se determinó un coeficiente que se empleó para determinar la concentración celular sin necesidad de efectuar las determinaciones de peso seco, únicamente registrado las lecturas de densidad óptica.

5.6.3 CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DNS

Se realizó según lo reportado por Sumner (1921), empleando lactosa como estándar.

5.6.3.1 PREPARACIÓN DEL REACTIVO DNS

Composición por 100 mL:

- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)(Sigma-Aldrich, 98.0%) 1 g
- NaOH (J.T. Baker, 98.3%9) 1.6 g
- Tartrato de sodio y potasio (J.T. Baker, 99.0%) 30 g

Modo de preparación: para preparar 100 mL de solución se hirvieron 50 mL de agua destilada y se disolvió en ellos el DNS. Por separado se disolvió el NaOH en 20 mL de agua destilada. Una vez que las soluciones estaban listas se mezclaron y posteriormente se les adicionó el tartrato de sodio-potasio, poco a poco hasta su completa disolución. Una vez que el tartrato estaba totalmente disuelto se aforó la solución a un volumen final de 100mL y se almacenó en frascos protegidos contra la luz (frascos ámbar) a temperatura ambiente hasta su uso.

5.6.3.2 PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Se preparó una solución madre de lactosa (ANALAR, 99.5%) a una concentración de 6 mg/mL. A partir de la solución madre se prepararon diluciones con concentraciones de lactosa de 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg/mL. De cada una de las soluciones se tomaron 200 μ L y se les adicionaron 200 μ L de la solución de DNS; se mezclaron las soluciones y se calentaron a ebullición en baño maría durante 5 minutos, posteriormente se dejaron enfriar en baño de hielo y se les adicionaron 5 mL de agua destilada, las soluciones se mezclaron perfectamente y se registró su absorbancia a 540 nm empleando el Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific), con celdillas desechables de 1cm de longitud. Para realizar la lectura de absorbancia debió emplearse como blanco la primera dilución de lactosa (0 mg/mL). Cada determinación fue efectuada por triplicado.

Para generar la curva patrón se graficaron los valores de absorbancia registrados para cada una de las soluciones con concentración conocida de lactosa en cada una de sus repeticiones. Se efectuó una regresión lineal de los datos y se obtuvo la ecuación de la recta generada y la correlación entre las variables estudiadas.

5.6.3.3 ENSAYO DE AZÚCARES REDUCTORES

Para cada fermentación en cada tiempo de muestreo se extrajo 1 mL de caldo de cultivo empleando una jeringa limpia con aguja estéril. Cada muestra se colocó en un tubo eppendorf y se centrifugó a 15,000 rpm por 5 minutos en la centrífuga Micro 17TR (Hanil Science Industrial Co.) para eliminar los sólidos suspendidos y las células de *Clostridium acetobutylicum* del caldo de fermentación que pudieran interferir con el método de determinación de azúcares. El sobrenadante se recuperó, se colocó en un tubo limpio y fue almacenado en refrigeración hasta que fue efectuada la determinación de azúcares. Toda solución problema que se creía que tenía una concentración de lactosa superior a los 6 mg/mL debía ser diluida para obtener lecturas de absorbancia confiables.

De cada muestra problema, o su dilución, se tomaron 200 μ L y se les adicionaron 200 μ L de la solución de DNS; se mezclaron las soluciones y se calentaron a ebullición en baño maría durante 5 minutos, posteriormente se dejaron enfriar en baño de hielo y se les adicionaron 5 mL de agua destilada, las soluciones se mezclaron perfectamente y se registró su absorbancia a 540 nm. En base a la absorbancia registrada se efectuó el cálculo de la concentración de azúcares reductores, como lactosa, en la muestra, haciendo uso de la ecuación obtenida en la curva patrón.

5.6.4 CONCENTRACIÓN DE PRODUCTOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

La producción de ácidos y solventes de interés en las corridas fermentativas fue efectuada mediante cromatografía de gases. Los cromatógrafos empleados y la forma de analizar las muestras variaron conforme a las necesidades de la tesis como se describe a continuación.

5.6.4.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para todas las corridas fermentativas en todos los puntos de muestreo la muestra fue colectada empleando una jeringa limpia con aguja estéril, se tomó un volumen de 1.5 mL del caldo de cultivo perfectamente homogenizado.

Durante las primeras corridas cromatográficas el análisis de productos de la fermentación se efectuó sobre destilados, para ello al volumen conocido de fermento se le adicionó un volumen igual de agua destilada, se mezclaron perfectamente y se destiló la mezcla a 130°C en destiladores simples a microescala hasta obtener un volumen de destilado igual al volumen de fermento originalmente tomado como muestra. El destilado se recuperó y almacenó en viales cerrados herméticamente hasta su análisis.

El análisis cromatográfico fue modificado una vez que se detectó la pérdida de productos debida al proceso de destilación. La presencia de productos de fermentación fue evaluada directamente en el caldo de cultivo, para ello la muestra de fermento tomada se colocó en tubos eppendorf y se centrifugó a 15,000 rpm por 5 minutos en la centrífuga Micro 17TR (Hanil Science Industrial Co.), posteriormente se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de acrodiscos de 45 μm (Millipore), el sobrenadante ya filtrado fue almacenado en tubos eppendorf limpios en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

5.6.4.2 ANÁLISIS CUALITATIVOS

Se realizaron empleando el cromatógrafo de gases Varian modelo CP 3800 equipado con una columna capilar de 10m de longitud, 0.1 mm de diámetro y 0.2 μm de luz del capilar, la columna está recubierta con CP-Wax 52 CB. Para el análisis se inyectó automáticamente al cromatógrafo 1 μL de la muestra y se corrió una rampa de calentamiento de 60 a 150°C.

Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases fueron:

- Temperatura del inyector: 250°C
- Volumen de inyección de gases constante a 4mL/min (para pruebas preliminares).
- Presión de gases constante a 10 psi (para experimentos iniciales).
- Temperatura de la columna variable de 60 a 150 °C: 1 min a 60°C, seguido de un incremento gradual de temperatura de 10°C/min, concluye con un mantenimiento de la temperatura a 150°C por 5 minutos.
- Tiempo total de corrida: 15 minutos.

- Se empleó un detector de ionización en flama a 250°C.

Los flujos de operación de los gases para generar la flama del cromatógrafo de gas fueron: N₂ 80 psi , aire seco 60 psi, Helio 80 psi e H₂ 40 psi.

Cada corrida cromatográfica debía ir acompañada de cinco estándares de solventes adicionados a concentración conocida. Los estándares empleados fueron solución de etanol, acetona, butanol, ácido butírico y ácido acético al 1% en agua destilada. En base a las corridas cromatográficas de los estándares se determinaron los tiempos de retención para cada uno de los productos de interés. En base a los cromatogramas obtenidos para las muestras, y los tiempos de retención definidos con los estándares, se determinó la presencia o ausencia de los productos de fermentación ABE en cada caldo de cultivo analizado.

5.6.4.3 ANÁLISIS CUANTITATIVOS

Se realizaron empleando el cromatógrafo de gases HP 6890 series (Hewlett Packard, California, USA) equipado con un detector de ionización en flama (FID) y una columna capilar HP-Innowax 19091N-133 de 30m de longitud, 0.25mm de diámetro y una película de 0.25 µm (Agilent JyW GC Columns, California, USA).

Para el análisis se inyectó manualmente al cromatógrafo 1 µL de la muestra y se corrió una rampa de calentamiento de 60 a 150°C.

Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases fueron:

- Temperatura del inyector: 250°C
- Presión de gases:

Helio	60 psi
H ₂	40 psi
Aire extra seco	60 psi
- Volumen de inyección de gases constante a 4mL/min

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Temperatura de la columna variable de 60 a 150 °C: 1 min a 60°C, seguido de un incremento gradual de temperatura de 10°C/min, concluye con un mantenimiento de la temperatura a 150°C por 5 minutos.
 - Tiempo total de corrida: 15 minutos.
 - Temperatura del detector FID: 250°C.

Cada corrida cromatográfica debió ir acompañada de estándares de solventes (acetona, etanol, butanol) y ácidos (acético, butírico, láctico) a concentración conocida. En base a los cromatogramas obtenidos para las muestras y estándares se determinó la presencia o ausencia de los productos de fermentación ABE en el caldo de cultivo. Efectuando cálculos de área bajo la curva en los cromatogramas obtenidos se determinó la concentración de cada uno de los componentes, los cálculos de área bajo la curva se realizaron empleando el software Peak Simple 3.21® (SRI Instruments, California, US).

5.6.4.3.1 CONSTRUCCIÓN DE CURVA PATRÓN DE SOLVENTES Y ÁCIDOS

Para poder determinar la concentración de cada uno de los compuestos de interés en las muestras analizadas se construyeron curvas patrón empleando soluciones de acetona, etanol, butanol, ácido acético, ácido butírico y ácido láctico a concentraciones conocidas, todas las diluciones fueron preparadas empleando agua destilada.

Las concentraciones empleadas de cada uno de los compuestos para la construcción de las curvas se muestran en la tabla 11.

Se determinaron los tiempos de retención observados para cada uno de los compuestos bajo las condiciones de corrida descritas. Registrando el área bajo la curva para cada uno de los picos correspondientes a los compuestos de interés en cada una de las concentraciones analizadas se construyeron las curvas estándar para la determinación de la concentración de productos.

Tabla 11. Concentración de estándares para cromatografía de gases.

C O N C E N T R A C I O N (g/L)	acetona	butanol	etanol	Ac. acético	Ac. burítico	Ac. láctico
	6.850	7.115	7.760	11.26	12.26	13.27
	3.425	3.558	3.880	5.630	6.130	6.635
	1.370	1.423	1.552	2.815	3.065	3.317
	0.685	0.712	0.776	1.126	1.226	1.327
	0.343	0.356	0.388	0.563	0.613	0.332
	0.137	0.142	0.155	0.282	0.307	0.133

5.7 CÁLCULOS DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO, RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD

VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (μ):

$$\mu = \frac{\ln x_1/x_0}{t_1 - t_0}$$

Dónde:

- X_1 : concentración celular en el tiempo de fermentación 1.
- X_0 : concentración celular en el tiempo de fermentación 0.
- t_1 : tiempo de fermentación 1.
- t_0 : tiempo de fermentación 0.

RENDIMIENTO:

$$\text{RENDIMIENTO DE PRODUCTOS } (Y_p) = \frac{\text{gramos de producto generado}}{\text{gramos de sustrato consumido}}$$

PRODUCTIVIDAD:

$$\text{PRODUCTIVIDAD (P)} = \frac{\text{producto generado (g)}}{(\text{volumen de fermentación (L)})(\text{tiempo de fermentación (h)})}$$

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis se realizaron utilizando Statgraphics Centurion XVI® (Statpoint Technologies, Virginia, US).

5.8.1 ANOVA

Se utilizó para la comparación de la capacidad de producción de butanol por las cepas silvestres y las mutantes con las que se deseaban comprar. Se buscaba confirmar si la capacidad de producción de butanol era significativamente diferente entre cepas. $p < 0.05$ fue considerado significativo.

5.8.2 PRUEBAS DE RANGOS MÚLTIPLES

Se realizaron con un nivel de confianza del 95.0% para detectar diferencias significativas entre las capacidades productivas de las cepas analizadas, definiendo cual cepa presentaba mejor capacidad de producción de butanol y solventes totales.

5.9 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL PLÁSMIDO pSOL1 en *C. acetobutylicum*

Cada una de las cepas a analizar se cultivó en MPC líquido. Cada muestra se trabajó por lo menos en duplicado. La extracción de ADN plasmídico se efectuó empleando el método de Birnboim y Doly (1979):

- 1) Se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano y se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 minutos en la centrífuga MIKRO 120 (Hettich) para coleccionar la bacteria. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso en caso de ser necesario para enriquecer la pastilla.

- 2) Se resuspendió la pastilla en 150 μL de la solución I BD (Solución de lisis: Tris HCl 25 mM pH8, EDTA 10mM, glucosa 50 mM y agua destilada). Se mezcló con Vórtex.
- 3) Se añadieron 300 μL de la solución II BD (SDS Alcalino: NaOH 0.2 N, SDS 1% y agua destilada), se agitó por inversión cinco veces; se dejó 5 minutos en baño de hielo.
- 4) Se añadieron 300 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
- 5) Se añadieron 300 μL de la solución III BD (Buffer acetato: Acetato de potasio 5M, ácido acético glacial y agua destilada). Se mezcló por inversión 100 veces. Se reposó 5 minutos en baño de hielo.
- 6) Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 14,000 rpm en la centrífuga MIKRO 120 (Hettich) y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.
- 7) Se agregaron 700 μL de isopropanol frío, se agitó bruscamente por inversión y se mantuvo por 20 minutos a -20°C .
- 8) Se centrifugaron las muestras 15 minutos a 14,000 rpm en la centrífuga MIKRO 120 (Hettich) y se eliminó el sobrenadante.
- 9) Se agregaron 1000 μL de etanol al 70%, se despegó la pastilla y se lavó sin resuspender. Se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm y se eliminó el sobrenadante.
- 10) se repitió el paso 9.
- 11) Se secó la pastilla calentando a 60°C en termo block.
- 12) Se resuspendió la pastilla en 50 μL de TE estéril o agua desionizada estéril.

Los extractos obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La electroforesis se efectuó a 90 Hz en una cámara electroforética Enduro E1007-7 (Scientiis). Finalizada la electroforesis se tiñeron los geles de agarosa con bromuro de etidio y se revelaron en una cámara de luz UV DyNA Light U1000 (Scientiis).

6. RESULTADOS

6.1 ESTÁNDARES Y CURVAS PATRÓN

6.1.1 CORRELACIÓN ENTRE DENSIDAD ÓPTICA Y PESO SECO (CDBB-B-797)

Fue determinada una correlación entre los valores registrados para absorbancia a 585 nm y el peso seco de biomasa contenido en el medio de cultivo. Para determinar esta correlación se consideraron las densidades ópticas y pesos secos registrados para las muestras durante la fase exponencial de crecimiento y la fase de deceleración. Los puntos fueron graficados por dispersión (figura 20) y se calculó la correlación entre ellos ($R^2= 0.982$). Se graficó la línea de tendencia y se determinó una ecuación de correlación $Y= 5.0913X - 1.3455$.

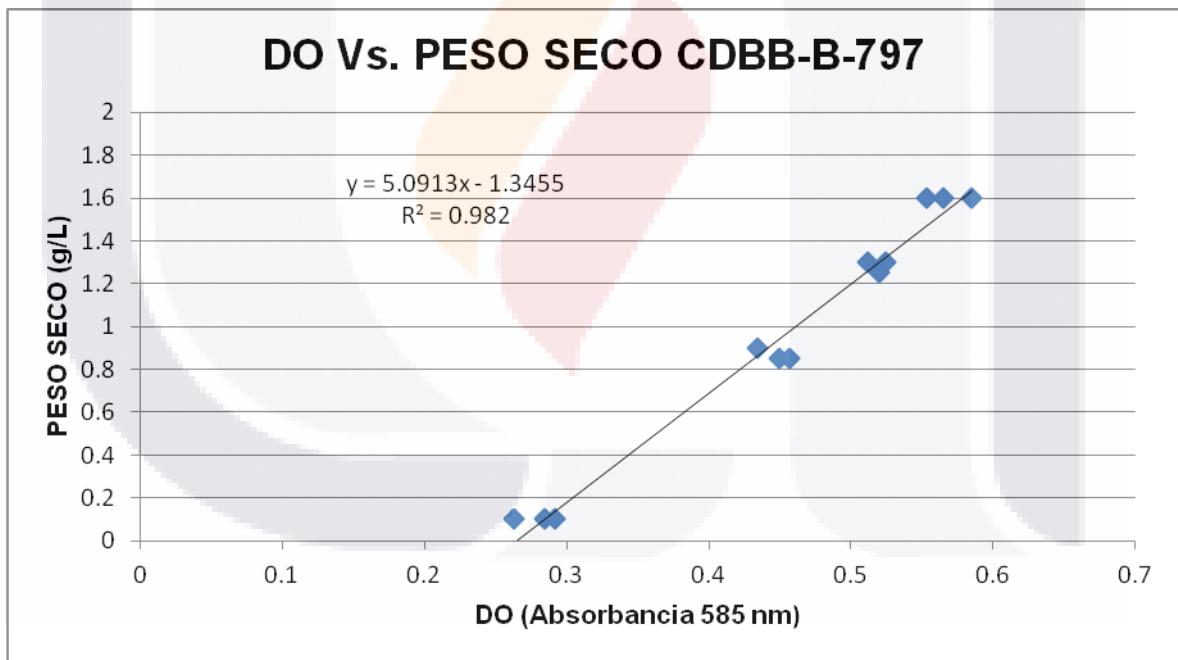


Figura 20. Gráfico DO Vs. Peso seco. Datos registrados para las fermentaciones efectuadas con la cepa silvestre CDBB-B-797 (n=3). (◆) representa cada punto de muestreo; la línea continua representa la línea de tendencia.

En base a la ecuación de la recta obtenida para el gráfico se determinó que una unidad de densidad óptica a 585 nm equivale a una concentración celular de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 de 3.75 gramos de biomasa seca (g_{bs}) por litro. $1 DO_{585nm} =$

3.75 g_{bs}/L. Este coeficiente se empleó para determinar la concentración celular sin necesidad de efectuar las determinaciones de peso seco, únicamente registrado las lecturas de densidad óptica.

6.1.2 CORRELACIÓN ENTRE DENSIDAD ÓPTICA Y PESO SECO (ATCC 824)

Fue determinada una correlación entre los valores registrados para absorbancia a 585 nm y el peso seco de biomasa contenido en el medio de cultivo. Para determinar esta correlación se consideraron las densidades ópticas y pesos secos registrados para las muestras durante la fase exponencial de crecimiento y la fase de deceleración. Los puntos fueron graficados por dispersión (figura 21) y se calculó la correlación entre ellos ($R^2 = 0.9859$). Se graficó la línea de tendencia y se determinó una ecuación de correlación $Y = 3.6326X - 0.5968$.

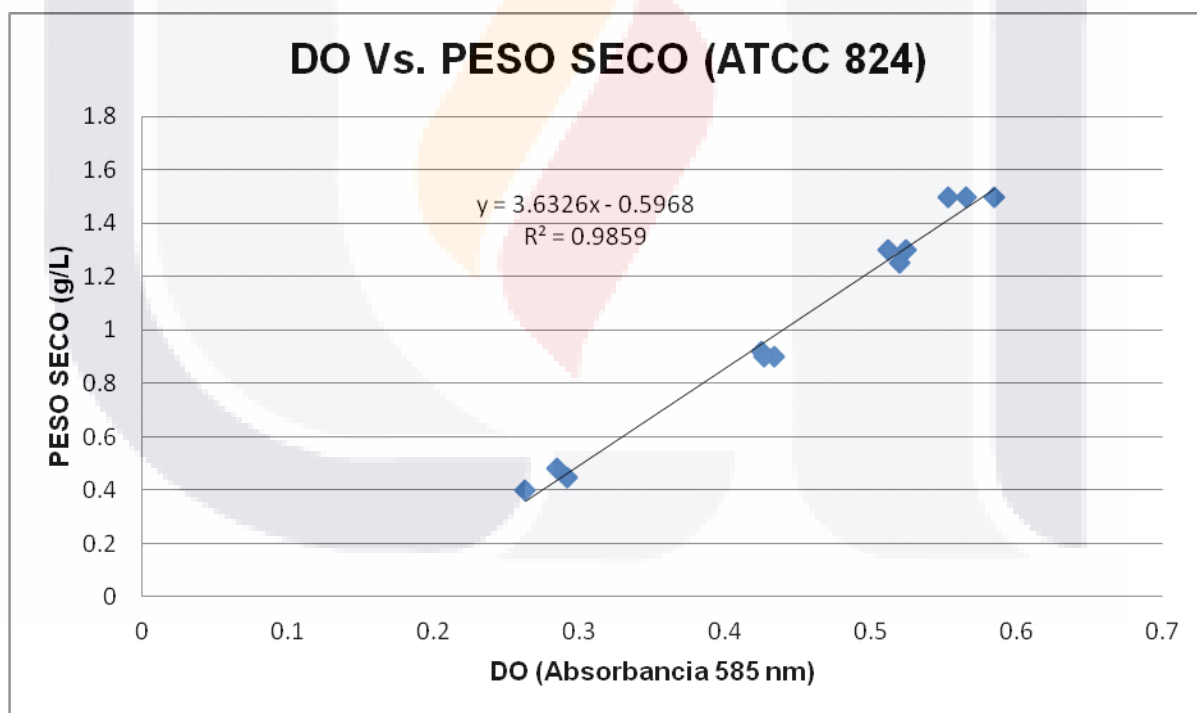


Figura 21. Gráfico DO Vs. Peso seco. Datos registrados para las fermentaciones efectuadas con la cepa silvestre ATCC 824 (n=3). ♦) representa cada punto de muestreo; la línea continua representa la línea de tendencia.

En base a la ecuación de la recta obtenida para el gráfico se determinó que una unidad de densidad óptica a 585 nm equivale a una concentración celular de C.

acetobutylicum ATCC 824 de 3.04 gramos de biomasa seca (g_{bs}) por litro. $1 DO_{585nm} = 3.04 g_{bs}/L$. Este coeficiente se empleó para determinar la concentración celular sin necesidad de efectuar las determinaciones de peso seco, únicamente registrado las lecturas de densidad óptica.

6.1.3 CURVA PATRÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Para generar la curva patrón se graficaron los valores de absorbancia registrados para cada una de las soluciones con concentración conocida de lactosa en cada una de sus repeticiones (figura 22). Se efectuó una regresión lineal de los datos y se obtuvo la ecuación de la recta generada: $Y = 0.1639x + 0.007$, con una correlación ($R^2 = 0.9904$).

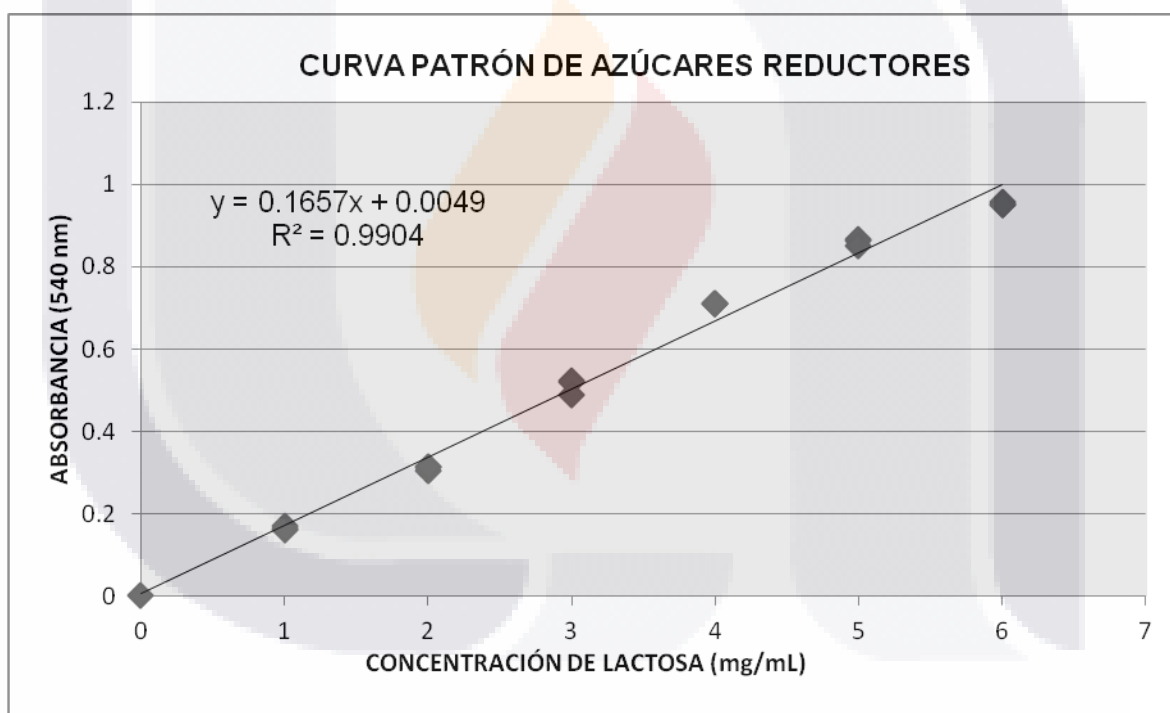


Figura 22. Gráfico. Curva patrón de concentración de azúcares reductores (lactosa), ($n=3$). () representan cada valor registrado para la absorbancia de una muestra de concentración conocida; la línea recta continua representa la línea de tendencia.

En base a la ecuación de la recta obtenida para el gráfico se determinó que una unidad de densidad óptica a 540 nm equivale a una concentración de azúcares reductores, reportados como lactosa, de 6.005 mg/ml. $1DO_{540nm} = 6.005$ mg azúcares reductores/mL.

6.1.4 TIEMPOS DE RETENCIÓN DE PRODUCTOS PARA ANÁLISIS CUALITATIVOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

En base a las corridas cromatográficas de los estándares se determinaron los tiempos de retención para cada uno de los productos de interés (Tabla12).

Tabla 12. Tiempos de retención de compuestos de interés, análisis cualitativo.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min.)
ACETONA (J.T. Baker, 99.4%)	2.0840
ETANOL (J.T.Baker, 95.0%)	2.7353
BUTANOL (J.T. Baker, 99.4%)	4.8925
ÁCIDO ACÉTICO (J.T. Baker, 99.0%)	8.8700
ÁCIDO BUTÍRICO (J. T. Baker, 99.0%)	11.1400

Los tiempos de retención indicados son válidos para las corridas cromatográficas cualitativas empleando el cromatógrafo Varian CP 3800 equipado con una columna CP-Wax 52 CB y bajo las condiciones de análisis descritas.

En base a los cromatogramas obtenidos para las muestras, y los tiempos de retención definidos con los estándares, se determinó la presencia o ausencia de los productos de fermentación ABE en cada caldo de cultivo analizado.

6.1.5 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PRODUCTOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Los tiempos de retención, en minutos, observados para cada uno de los compuestos bajo las condiciones de corrida descritas en el apartado de materiales y métodos se encuentran resumidos en la tabla 13.

Registrando el área bajo la curva para cada uno de los picos correspondientes a los compuestos de interés en cada una de las concentraciones analizadas se construyó el grafico Concentración de compuestos Vs. Área bajo la curva que se muestra en la figura 23.

Tabla 13. Tiempos de retención de compuestos de interés. Análisis cuantitativos.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min.)
ACETONA (J.T. Baker, 99.4%)	1.67
ETANOL (J.T. Baker, 95.0%)	2.10
BUTANOL (J.T. Baker, 99.4%)	3.99
ÁCIDO ACÉTICO (J.T. Baker, 99.0%)	8.1
ÁCIDO BUTÍRICO (J. T. Baker, 99.0%)	9.9
ÁCIDO LÁCTICO (J.T. BAKER, 85.0%)	14.0

Los tiempos de retención indicados son válidos para las corridas cromatográficas cuantitativas empleando el cromatógrafo HP 6890 series (Hewlett Packard) equipado con un detector de ionización en flama (FID) y una columna capilar HP-Innowax 19091N-133 de 30m de longitud, 0.25mm de diámetro y una película de 0.25 μm (Agilent JyW GC Columns) y bajo las condiciones de análisis descritas.

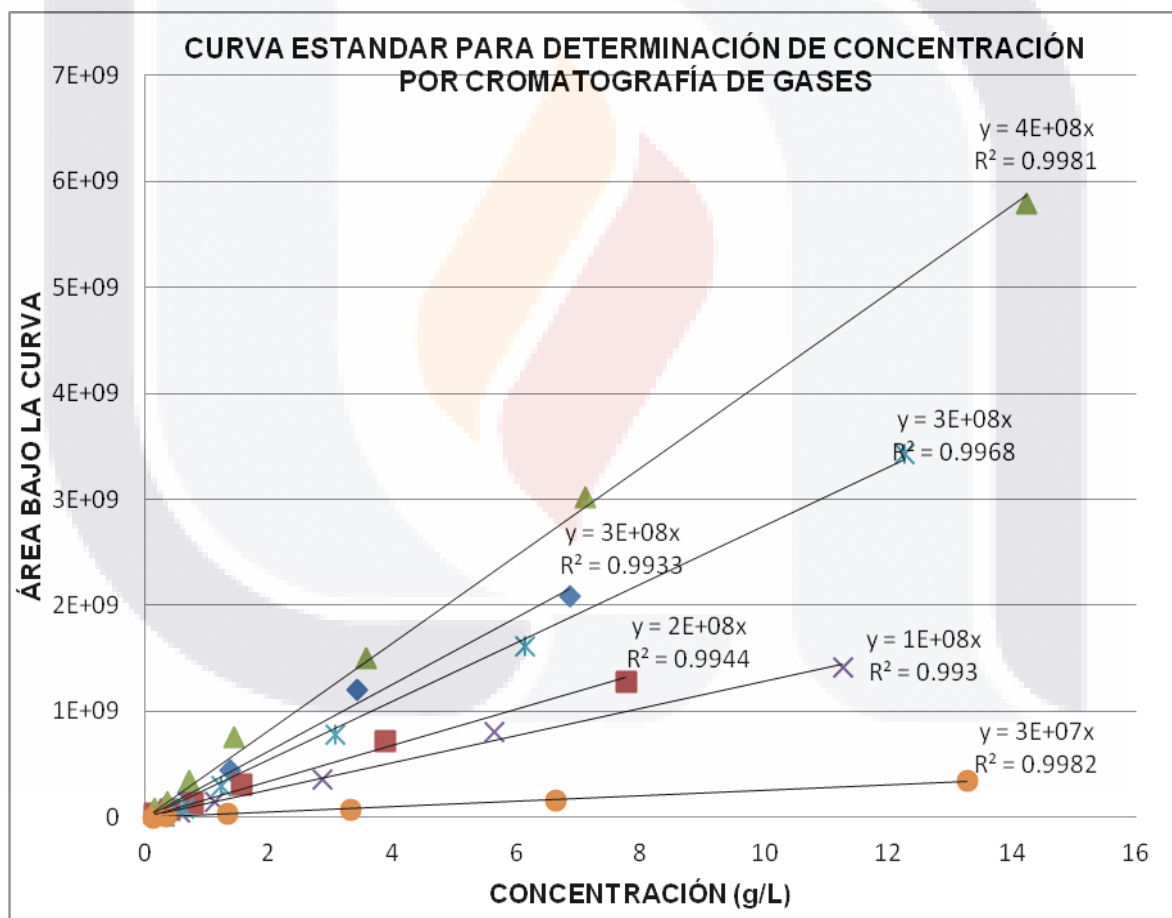


Figura 23. Curva patrón de estándares para determinación de concentración de productos por cromatografía de gases. Concentración del compuesto Vs. Área bajo la curva. Se muestran los coeficientes de correlación y las ecuaciones de la recta para cada compuesto. (◆) acetona; (■) etanol; (▲) butanol; (×) ácido acético; (*) ácido butírico, (◆) ácido láctico. Las líneas rectas continuas representan las líneas de tendencia.

De las curvas patrón se obtuvieron las ecuaciones de la recta que permitirán determinar las concentraciones de los compuestos de interés en las muestras analizadas.

Acetona: Concentración (g/L)= área bajo la curva/3*10⁸

Etanol: Concentración (g/L)= área bajo la curva/2*10⁸

Butanol: Concentración (g/L)= área bajo la curva/4*10⁸

Ácido acético (acetato): Concentración (g/L)= área bajo la curva/1*10⁸

Ácido butírico (butirato): Concentración (g/L)= área bajo la curva/3*10⁸

Ácido láctico (lactato): Concentración (g/L)= área bajo la curva/3*10⁷

6.2 PRODUCCIÓN DE BUTANOL CON *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 (1)

Se realizaron pruebas preliminares para encontrar las condiciones de crecimiento y producción de solventes a emplear durante la experimentación con la cepa silvestre de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 recuperada de esporas liofilizadas. Se probaron dos fuentes de hierro en diferente estado de oxidación (Fe⁺² y Fe⁺³) y diversos pH iniciales. Únicamente las corridas fermentativas adicionadas con FeCl₃ mostraron producción de acetona, butanol y etanol, aunque a muy bajas concentraciones (mg/L). En base a los resultados obtenidos en diversas corridas fermentativas se determinó que el tiempo de incubación de inóculos debía ser de 3 días (72 horas), el volumen del inóculo 20% del volumen final y el tiempo total de fermentación 168 horas (7 días). De igual manera se determinó que el pH inicial de la muestra debía ser 7.0 para que se lograra producir una mayor cantidad de ácidos, precursores de la formación de los solventes de interés.

Definida las condiciones de cultivo procedió a generar cepas mutantes. Tras la exposición al agente mutágeno, luz ultravioleta, se logró obtener crecimiento de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 en medios de cultivo adicionados con butanol a concentraciones de M1: 20.25 g/L (2.5% v/v) y M2: 24.30 g/L (3.0% v/v), concentraciones inhibitorias del crecimiento para la cepa original. Tras 28 días de fermentación se determinó que la producción total de solventes de cada una de las cepas fue de (μ±SD): CDBB-B-797 (0.0032±0.0024 g/L), M1 (1.1283±0.4941 g/L) y M2 (0.6508±0.0436 g/L). El análisis de varianza indicó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad total de solventes producidos por cada una

de las cepas, con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.01$). La prueba de rangos múltiples indicó que para la producción total de solventes existe diferencia estadísticamente significativa entre la cepa original CDBB-B-797 y las cepas mutantes, sin embargo indica que no existe diferencia estadísticamente significativa al comparar las mutantes entre sí. Evaluando únicamente la producción de butanol empleando cada una de las cepas se obtuvo ($\mu \pm SD$): CDBB-B-797 ($0.0007 \pm 0.0006 \text{g/L}$), M1 ($0.9630 \pm 0.2129 \text{g/L}$) y M2 ($0.6503 \pm 0.0438 \text{g/L}$). El análisis de varianza indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad total de butanol producida por cada una de las cepas, con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.01$). La prueba de rangos múltiples indica que para la producción de butanol existe diferencia estadísticamente significativa entre las tres cepas evaluadas.

En base a los resultados obtenidos puede afirmarse que las cepas mutadas generadas tienen un mejor desempeño fermentativo que la cepa silvestre CDBB-B-797 bajo igualdad de condiciones fermentativas. Sin embargo, al obtenerse producciones de butanol muy inferiores a las reportadas en la literatura es necesario mejorar las condiciones en las que se efectúa la fermentación.

Tras diversas series fermentativas efectuadas con *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 y sus mutantes M1 y M2 se observaron desvíos muy importantes en las rutas metabólicas seguidas por la bacteria. Se detectó producción de acetoína y ácido láctico principalmente, en otras ocasiones los productos principales fueron ácido láctico y etanol pero no se lograba dirigir la ruta metabólica hacia la producción de los solventes de interés: acetona, etanol y butanol. Para determinar por qué la cepa no está siguiendo la ruta fermentativa deseada se plantearon diferentes experimentos:

- 1) Determinar por extracción de DNA plasmídico la presencia del plásmido pSOL1, el cual contiene los genes involucrados en la producción de solventes (Nölling et al., 2001).
- 2) Probar una fuente de hierro distinta al cloruro férrico, para verificar si es la causa de la desviación en la ruta metabólica. Se probará como fuente de hierro FeSO_4 , reportada por Li et al. (2014), Foda et al. (2010), Groot et al. (1989), Ennis (1987), Lin et al. (1983), Bahl et al. (1982), entre otros.

- 3) Verificar si el suero de leche utilizado es la causa de la falla en los resultados. Se probarán sueros de leche de otra fuente diferente a la posta zootécnica y caldos lactosados simulando suero de leche.
- 4) Determinar si la falta de producción de ácido butírico y butanol es debida a las condiciones microaerofílicas de los fermentadores. Se inyectará nitrógeno a los frascos donde se efectúan las fermentaciones para eliminar el oxígeno disuelto en el suero de leche.

Para determinar la presencia del plásmido pSOL1 cada una de las cepas a analizar se cultivó en MPC líquido. Las cepas analizadas fueron CDBB-B-797 primera resiembra conservada en aceite mineral, CDBB-B-797 resiembra de junio de 2013, M1 resiembra de junio de 2013 y M2 resiembra de junio de 2013. De la cepa CDBB-B-797 se utilizó la cepa original conservada como control positivo de la presencia del plásmido. Cada muestra se trabajó por lo menos en duplicado.

La figura 24 muestra una fotografía tomada al gel de agarosa revelado en la cámara de luz UV DyNA Light U1000 (Scientiis).

En la imagen puede observarse la clara presencia de una banda correspondiente al DNA plasmídico extraído. Al no contar con un marcador de peso molecular superior a las 2,000 pb no es posible determinar el tamaño exacto del plásmido, sin embargo, por la forma en que funciona el método de extracción, extrayendo únicamente ADN plasmídico, y la posición de la banda en el gel, muy por encima de los 2,000 pb puede suponerse que la banda observada en el gel corresponde al plásmido pSOL1 (192 Kpb) responsable de la solventogénesis, la banda del plásmido aparece en todas las cepas analizadas, por lo que todas deberían tener la capacidad de producir los solventes deseados. En todas las pruebas fermentativas efectuadas no se detectó la producción de los solventes de interés.

Tras haber determinado que las cepas empleadas si poseen el plásmido pSOL1 que contiene los genes involucrados en la solventogénesis y haber probado diversas condiciones fermentativas: microaerofilia, anaerobiosis total, fermentación en suero de quesería, fermentación en medio sintético, además de emplear dos fuentes diferentes de

hierro y no obtener resultados positivos se decidió suspender el trabajo con esta cepa bacteriana.

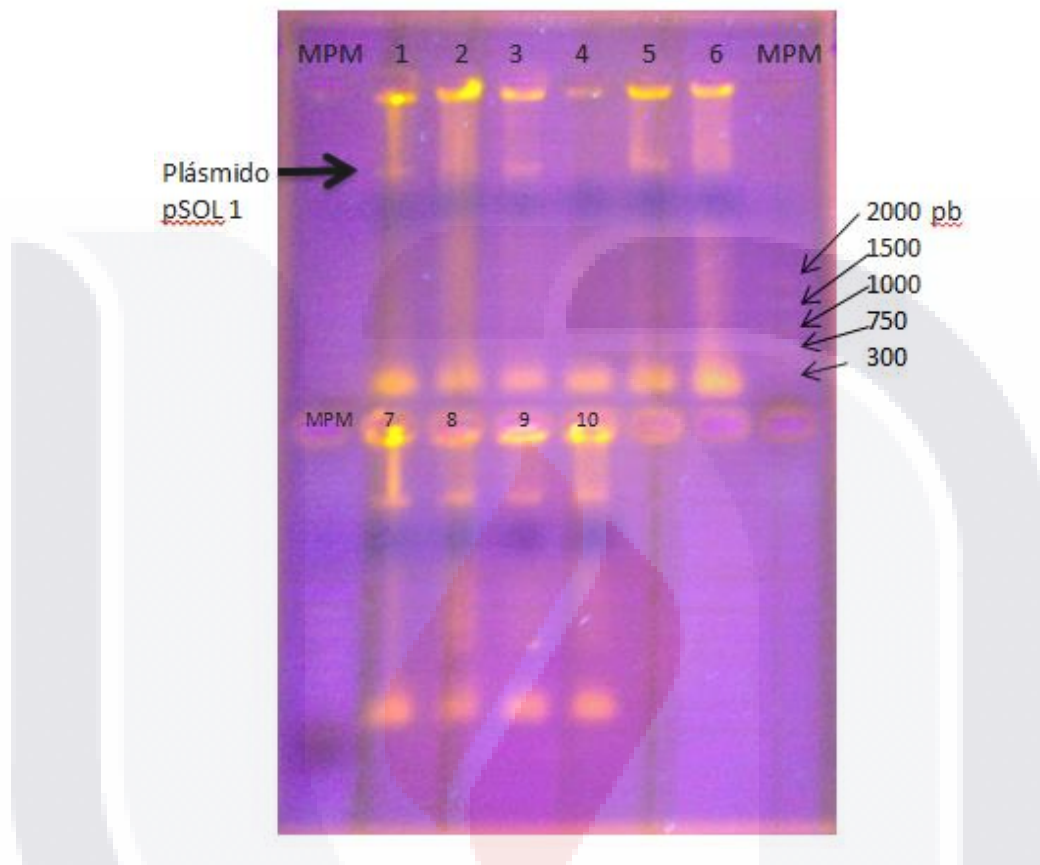


Figura 24. Determinación de la presencia del plásmido pSQL1. Fotografía del gel de agarosa conteniendo el ADN plasmídico extraído de *C. acetobutylicum*. La flecha gruesa indica la ubicación de la banda correspondiente al plásmido; las flechas delgadas indican la ubicación de cada una de las bandas de peso molecular conocido el marcador de peso molecular (MPM). Los números sobre los pocillos indican el carril correspondiente a las diferentes muestras: 1) CDBB-B-797 recuperada de aceite mineral (repetición 1), 2) CDBB-B-797 recuperada de aceite mineral (repetición 2), 3) CDBB-B-797 recuperada de aceite mineral (repetición 3), 4) CDBB-B-797 resiembra de junio 2013 (repetición 1), 5) CDBB-B-797 resiembra de junio 2013 (repetición 2), 6) CDBB-B-797 resiembra de junio 2013 (repetición 3), 7) M1 resiembra junio 2013 (repetición 1), 8) M1 resiembra junio 2013 (repetición 2), 9) M2 resiembra junio 2013 (repetición 1), 10) M2 resiembra junio 2013 (repetición 2).

6.2 PRODUCCIÓN DE BUTANOL CON *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 (2)

La cepa bacteriana que se había venido trabajando, *C. acetobutylicum* CDBB-B-797, fue adquirida nuevamente de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV-IPN. Para probar nuevamente su capacidad para efectuar la fermentación ABE y producir el compuesto de interés: butanol.

6.3.1 IDENTIFICACIÓN POR CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO

La cepa se recibió como células vegetativas en fase exponencial de crecimiento en RCM líquido a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Fue resembrada en tres medios sólidos distintos cuya formulación fue reportada en el apartado correspondiente: RCM, MPC y Agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja. Las placas resembradas se incubaron a 35-37°C, en anaerobiosis, y fueron observadas diariamente hasta registrar la aparición de colonias detectables a simple vista. Los resultados obtenidos en cada medio de cultivo fueron los siguientes:

- MPC: tras 24 horas de incubación se observa el crecimiento de colonias blancas circulares convexas y la pérdida de la coloración rosa típica del medio de cultivo (figura 25) indicativo de que el medio ha perdido su condición reducida. A pesar de que la cepa bacteriana es la misma que se venía trabajando en esta ocasión su crecimiento en placa fue distinto. Las colonias poseen la misma forma circular convexa pero su coloración es distinta. Ahora es blanca y previamente se había observado rosa.

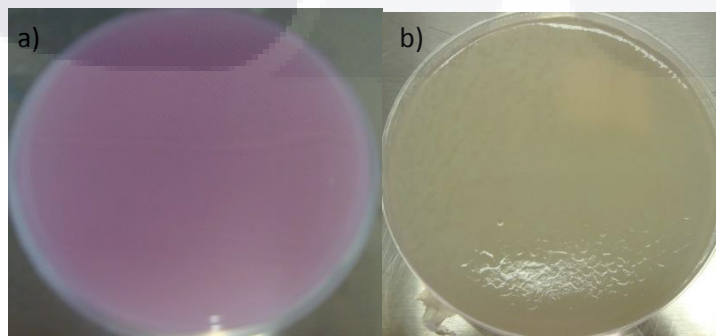


Figura 25. Crecimiento de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 (2) en MPC. La figura a) muestra el medio de cultivo al instante de la inoculación, la figura b) muestra el crecimiento de colonias sobre toda la placa tras 48 horas de incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Se observa el crecimiento microbiano de color blanco translúcido y la decoloración completa del medio.

- RCM: tras 24 horas de incubación se observa el crecimiento de colonias blancas convexas (figura 26). Se observa también decoloración del medio de cultivo que pasa de rojo-anaranjado a amarillo.

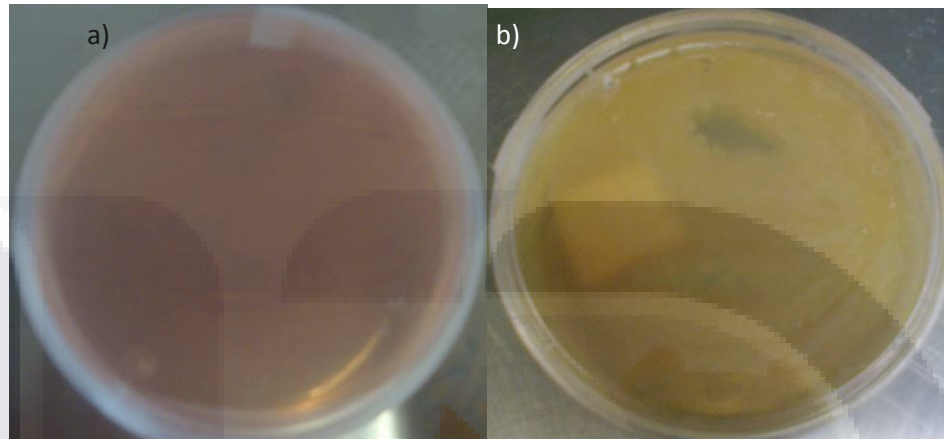


Figura 26. Crecimiento de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 (2) en RCM. La figura a) muestra el medio de cultivo al instante de la inoculación, la figura b) muestra el crecimiento de la colonia tras 48 horas de incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Se observa el crecimiento microbiano y el cambio de coloración del medio.

- Agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja (Agar ATCC #260): tras 24 horas de incubación se observa el crecimiento de colonias grisáceas lisas y planas no hemolíticas (figura 27). Su crecimiento es similar al reportado para *C. acetobutylicum* ATCC 824 en la página oficial de ATCC.

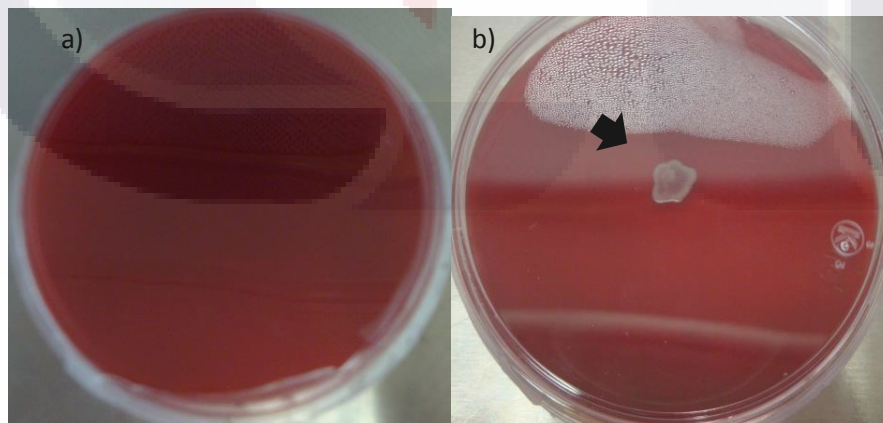


Figura 27. Crecimiento de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 (2) en agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja defibrinada. La figura a) muestra el medio de cultivo al instante de la inoculación, la figura b) muestra el crecimiento de la colonia tras 48 horas de incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis. La flecha negra señala la colonia bacteriana de coloración gris, no se observa hemólisis.

Por el crecimiento mostrado en el agar soya tripticaseína, comparándolo con lo reportado en la literatura, se determina que la cepa con la que se cuenta es en efecto *C. acetobutylicum*.

6.3.2 FERMENTACIÓN EN MEDIOS REPORTADOS EN LA LITERATURA

Habiendo comprobado por crecimiento en placa que la cepa adquirida es, en efecto, *C. acetobutylicum* se procedió a probar su capacidad para efectuar la fermentación ABE y producir butanol.

Se emplearon 5 medios de fermentación:

- Caldo glucosado Ennis
- Caldo lactosado Ennis
- Caldo lactosado Napoli
- Suero de quesería fortificado
- Suero de quesería adicionado con extracto de levadura.

Se montó una fermentación por cada medio, en todas las fermentaciones se empleó *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 (2) bajo las siguientes condiciones:

- pH inicial \approx 7.0
- Temperatura de fermentación: entre 35 y 37 °C.
- Volumen de inóculo: 80 mL
- Volumen total de fermentación: 400 mL
- Agitación orbital a 125 rpm.
- Anaerobiosis total por inyección de nitrógeno en los caldos de cultivo previo al inicio de la fermentación.

Para cada fermentación se monitoreó el comportamiento del pH, crecimiento celular y consumo de azúcares a 0, 100 y 168 horas. Se determinó la producción de ácidos y solventes a término de la fermentación (168 h). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 28 a 32.

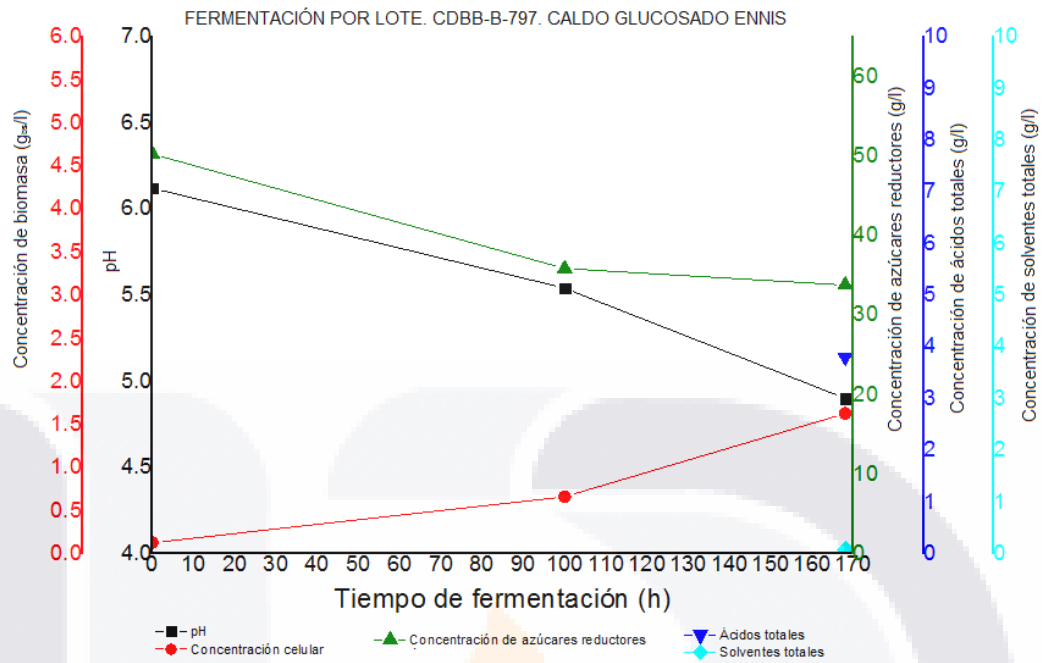


Figura 28. Fermentación por lote en caldo glucosado Ennis, empleando CDBB-B-797. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

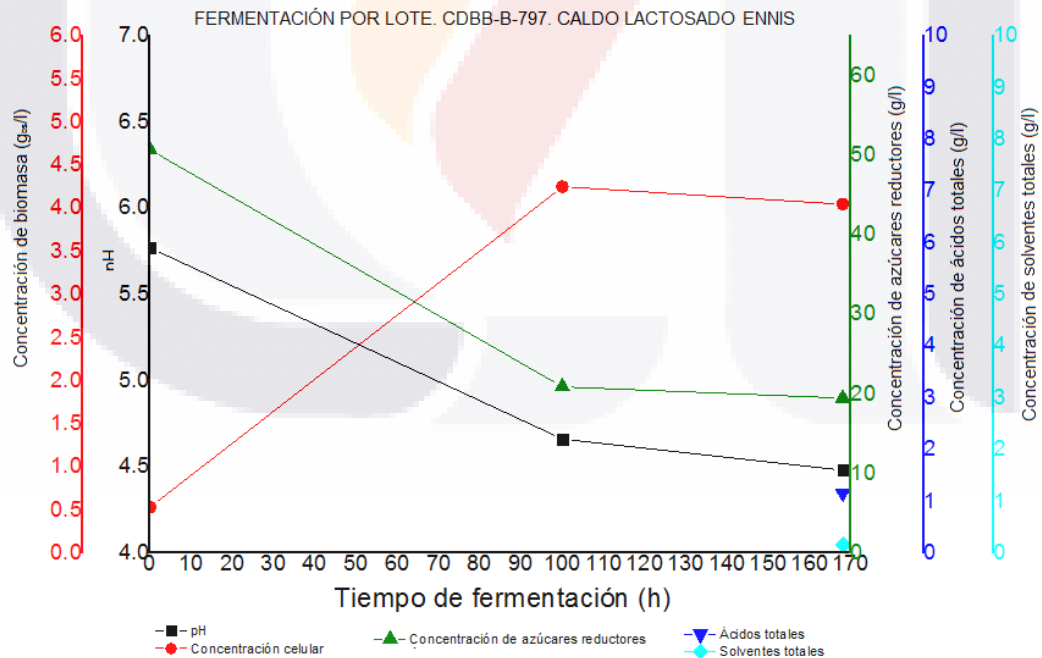


Figura 29. Fermentación por lote en caldo lactosado Ennis, empleando CDBB-B-797. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

En las figuras 28 y 29 se observa que *C. acetobutylicum* empleando glucosa como fuente de carbono es capaz de aprovecharla mejor que la lactosa para la producción de ácidos. A partir de la glucosa consumida se generó una menor cantidad de biomasa (una tercera parte) que en el medio lactosado, sin embargo, la producción de ácidos fue 4 veces superior.

El principal ácido producido fue el acético, seguido de ácido láctico y butírico. El ácido butírico se produjo en el orden de los miligramos por litro, además no se esperaba la presencia de ácido láctico en la fermentación. Una vez más el microorganismo no está siguiendo la ruta metabólica deseada para generar los productos de interés, sobre todo el butanol.

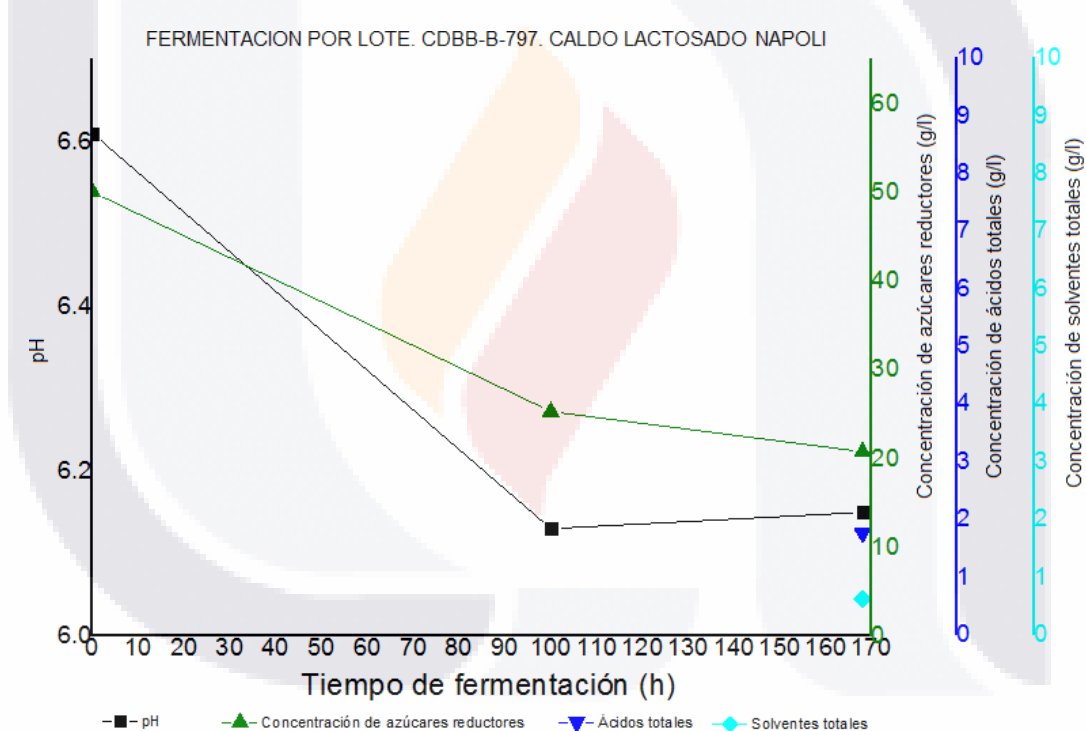


Figura 30. Fermentación por lote en caldo lactosado Napoli, empleando CDBB-B-797. Gráfico pH, concentración de azúcares y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

En la figura 30 no fue graficada la concentración celular debido a que la formulación del medio de cultivo no permite su determinación por densidad óptica ni por peso seco. Se observa que el pH no logró disminuir hasta el valor deseado de 4.5 debido

a la capacidad amortiguante del CaCO_3 que posee en elevadas concentraciones y a la baja producción de ácidos (menos de 2 g/L en total). Los resultados difieren considerablemente con los reportados por Napoli et al. (2008), quienes afirman que empleando el mismo medio de cultivo y la bacteria *C. acetobutylicum* DSM 792 (acrónimo de ATCC 824 y CDBB-B.797) se logra disminuir el pH del medio de 6 hasta 4 en sólo 20 horas de fermentación, y que, a partir de 22 horas se detecta ya la producción del solvente de interés: butanol; alcanzando una concentración máxima de aproximadamente 3 g/L tras 92 horas de fermentación manteniéndose hasta el término de la misma (140 horas), con un rendimiento máximo de butanol reportado en 0.2 g butanol/ g lactosa.

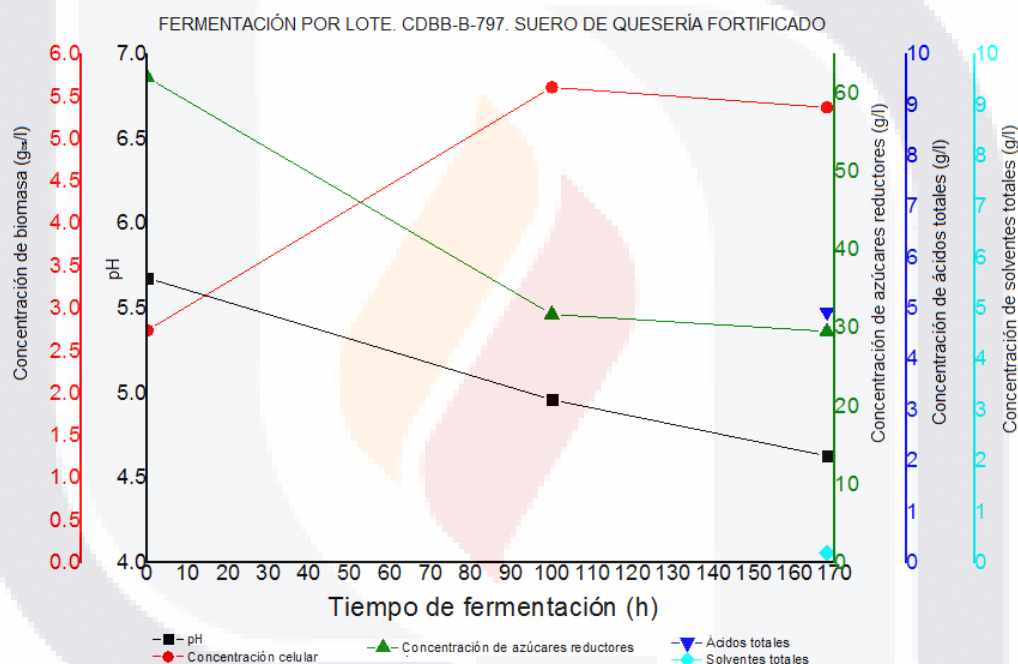


Figura 31. Fermentación por lote en suero de quesería fortificado empleando CDBB-B-797. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

En la figura 31 se observa que al emplear los azúcares del suero de leche como fuente de carbono se logra producir una mayor cantidad de biomasa ($\approx 5.5 \text{ g}_{\text{bs}}/\text{L}$) en comparación a la obtenida con el caldo sintético cuya fuente de carbono es glucosa ($\approx 1.5 \text{ g}_{\text{bs}}/\text{L}$) o lactosa ($\approx 4.5 \text{ g}_{\text{bs}}/\text{L}$); por su parte la producción de ácidos es 20% superior a la obtenida con el caldo glucosado Ennis y 500% superior a la obtenida con el caldo lactosado Ennis, recordando que salvo la fuente de carbono todos los componentes del

medio de cultivo son idénticos para estos 3 caldos fermentativos. Lamentablemente la producción de solventes es casi nula (≈ 0.18 g/L), teniendo al etanol como el principal producto de la fermentación y produciendo butanol en el orden de los miligramos por litro, valores que distan mucho de los reportados por Ennis (1987) quien afirma que empleando *C. acetobutylicum* ATCC 824 en un medio a base desuero de leche, idéntico al empleado en esta tesis, se logran producir 9.2 g/L de butanol en una fermentación por lote de 120 horas de duración.

La posibilidad de que a la fermentación le haga falta tiempo para que los ácidos sean convertidos en solventes fue descartada al observar al microscopio la formación de endoesporas en los bacilos (figura 33), recordando que las endoesporas son cuerpos de resistencia y no son productivos.

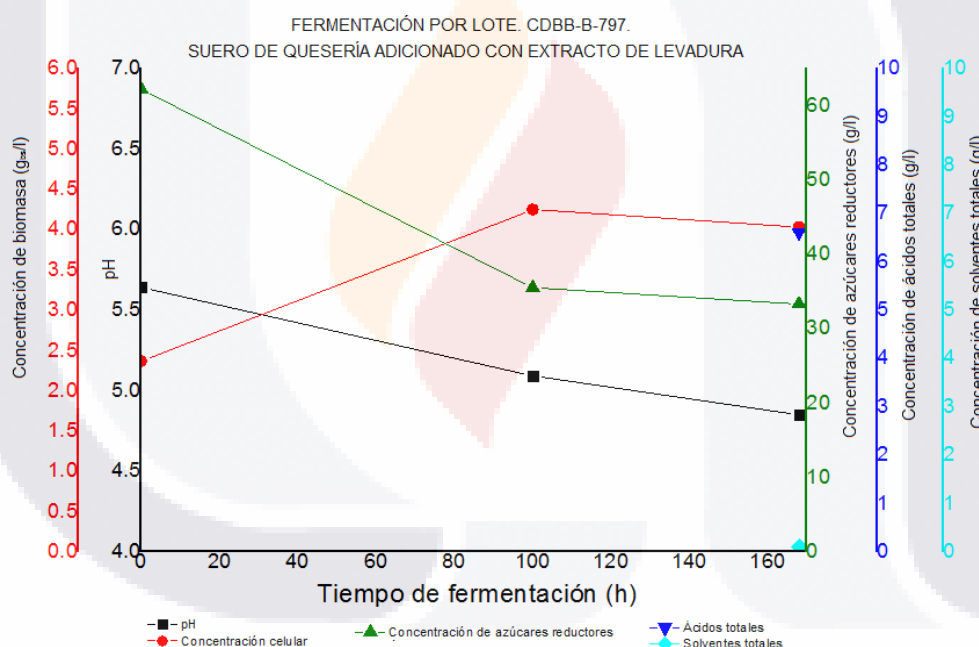


Figura 32. Fermentación por lote en suero de quesería adicionado con extracto de levadura, empleando CDBB-B-797. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

En la figura 32 puede observarse que la adición de extracto de levadura al suero de quesería ayuda a que se incremente la concentración de biomasa y la producción de ácidos en el caldo de fermentación, sin embargo, se observa también una muy baja

producción de solventes (≈ 0.10 g/L), teniendo al etanol como el principal producto de la fermentación y produciendo butanol en el orden de los miligramos por litro.

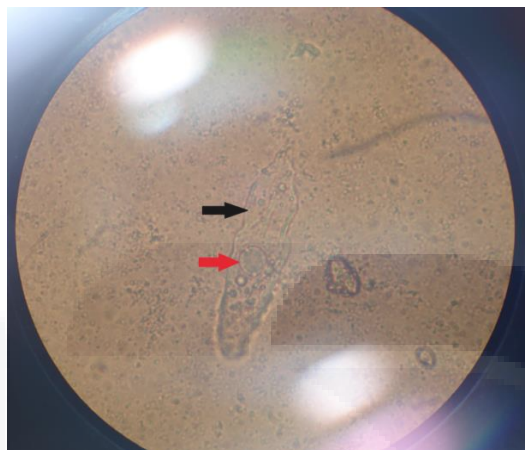


Figura 33. Formación de endoesporas de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797. Fotografía al microscopio 100X, tomada de la fermentación en suero de quesería fortificado a las 168 horas de fermentación. La flecha negra señala la posición del bacilo, la flecha roja señala la endoespora formada.

Los resultados completos de la cuantificación de productos de fermentación se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Concentraciones de productos de fermentación en caldos de cultivo reportados en la literatura empleando *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 (2).

MEDIO FERMENTATIVO	ACETONA (g/L)	ETANOL (g/L)	BUTANOL (g/L)	ÁCIDO ACÉTICO (g/L)	ÁCIDO BUTÍRICO (g/L)	ÁCIDO LÁCTICO (g/L)
CALDO GLUCOSADO ENNIS	0.0230	0.0600	0.0004	3.6729	0.0244	0.1029
CALDO LACTOSADO ENNIS	0.0066	0.1479	0.0003	1.1087	0.0046	0.0413
CALDO LACTOSADO NAPOLI	0.0044	0.6307	0.0003	1.0189	0.0149	0.7448
SUERO DE QUESERÍA FORTIFICADO	0.0069	0.1737	0.0007	4.8486	0.0198	0.0607
SUERO DE QUESERÍA ADICIONADO CON EXTRACTO DE LEVADURA	0.0100	0.0938	0.0003	5.7483	0.0418	0.8144

Se muestran los resultados obtenidos para las fermentaciones efectuadas con la cepa silvestre CDBB-B-797 en diversos medios fermentativos reportados en la literatura. La cuantificación de productos se hizo a término de la fermentación por lote (168 horas; 7 días).

En base a los consumos de azúcares y las concentraciones de productos generados se efectuaron los cálculos de productividad y rendimiento, mismos que se encuentran resumidos en la tabla 15.

Tabla 15. Rendimientos y productividades para las fermentaciones por lote con *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 (2) empleando medios de cultivo reportados en la literatura.

MEDIO	RENDIMIENTO			
	Ácidos totales (g _{ácidos} /g _{lactosa})	Solventes totales (g _{solvente} /g _{lactosa})	Ácido acético (g _{ácido} /g _{lactosa})	Etanol (g _{etanol} /g _{lactosa})
CALDO GLUCOSADO ENNIS	0.231	0.005	0.223	0.004
CALDO LACTOSADO ENNIS	0.037	0.005	0.036	0.005
CALDO LACTOSADO NAPOLI	0.061	0.022	0.035	0.022
SUERO DE QUESERÍA FORTIFICADO	0.152	0.006	0.150	0.005
SUERO DE QUESERÍA ADICIONADO CON EXTRACTO DE LEVADURA	0.229	0.004	0.199	0.003
MEDIO	PRODUCTIVIDAD			
	Ácidos totales (g _{ácidos} /Lh)	Solventes totales (g _{solvente} /Lh)	Ácido acético (g _{ácido} /Lh)	Etanol (g _{etanol} /Lh)
CALDO GLUCOSADO ENNIS	0.023	0.000	0.022	>0.001
CALDO LACTOSADO ENNIS	0.007	0.001	0.007	>0.001
CALDO LACTOSADO NAPOLI	0.011	0.004	0.006	>0.001
SUERO DE QUESERÍA FORTIFICADO	0.029	0.001	0.029	>0.001
SUERO DE QUESERÍA ADICIONADO CON EXTRACTO DE LEVADURA	0.039	0.001	0.034	>0.001

Se reportan rendimientos y productividades para la concentración de ácidos totales, solventes totales, ácido acético y etanol obtenidos a 168 horas de fermentación por lote.

Debido a que no se detectó la presencia del principal producto de interés (butanol), no se efectuó la comparación en la capacidad productiva de la cepa empleando los diferentes medios.

Nuevamente se observa que *C. acetobutylicum* cepa CDBB-B-797 de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV-IPN no tiene la capacidad de efectuar la fermentación ABE, por lo menos bajo las condiciones de cultivo probadas en la presente tesis. Al no obtener los resultados buscados se decidió dejar de utilizar esta cepa.



6.4 PRODUCCIÓN DE BUTANOL CON *C. acetobutylicum* ATCC ® 824™

6.4.1 IDENTIFICACIÓN POR CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO

La cepa se recibió como esporas liofilizadas (Figura 34 a, b y c) las cuales fueron rehidratadas en RCM líquido e incubadas a 37°C en anaerobiosis por 24 horas (Figura 34 d). Tras la rehidratación la cepa bacteriana fue sembrada en Agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja (Figura 34 e) para verificar el crecimiento de las colonias típicas de *C. acetobutylicum* y verificar que estuviera libre de contaminación aerobia y anaerobia. Se sembraron placas con este agar adicionando 200 µl de suspensión de esporas rehidratadas por cada placa. Las placas se incubaron a 37°C en anaerobiosis (Figura 34 f) y aerobiosis (por separado), y fueron observadas diariamente hasta registrar la aparición de colonias detectables a simple vista.

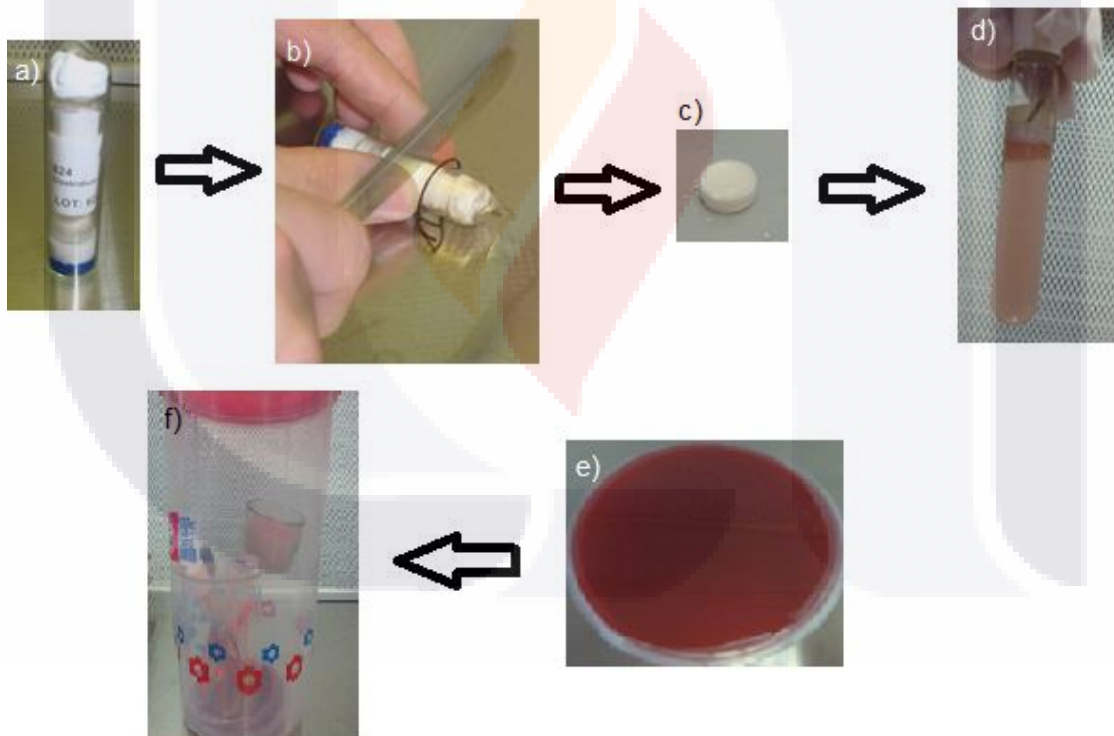


Figura 34. Recepción y rehidratación de cepa bacteriana *C. acetobutylicum* ATCC 824. a) Ampolleta sellada que contiene la tableta de liofilizado; b) Apertura de ampolleta por corte del vidrio; c) Tableta de liofilizado; d) Medio líquido RCM con tableta de liofilizado resuspendida; e) Placa de agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja recién inoculada con la suspensión de esporas; f) incubación en anaerobiosis a 37°C.

Tras 72 horas de incubación se lograron observar a simple vista colonias circulares grises traslúcidas lisas no hemolíticas en las placas de agar soya tripticaseína con 5%

sangre de oveja incubadas en anaerobiosis (Figura 35). En las placas incubadas en aerobiosis no se registró crecimiento alguno tras 72 horas de incubación.

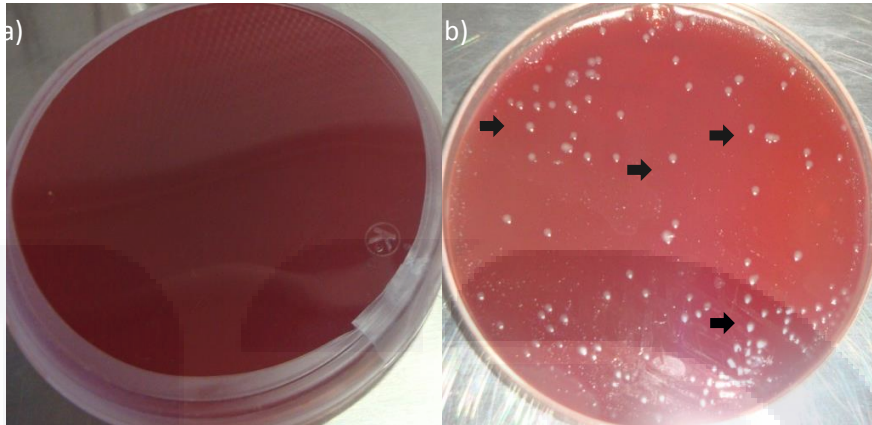


Figura 35. Crecimiento de *C. acetobutylicum* ATCC 824 en agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja desfibrinada. La figura a) muestra el medio de cultivo al instante de la inoculación, la figura b) muestra el crecimiento de la colonia tras 72 horas de incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Las flechas negras señalan algunas de las colonias grises detectadas. No se observa hemólisis.

El crecimiento observado en las placas incubadas en anaerobiosis es el típico para *C. acetobutylicum* según lo reportado en la hoja del producto de ATCC 824.

Por otra parte, empleando microscopía simple sin tinción logró observarse a las esporas rehidratadas (Figura 36a) y las células vegetativas (Figura 36b) de forma bacilar germinadas de las esporas adquiridas.

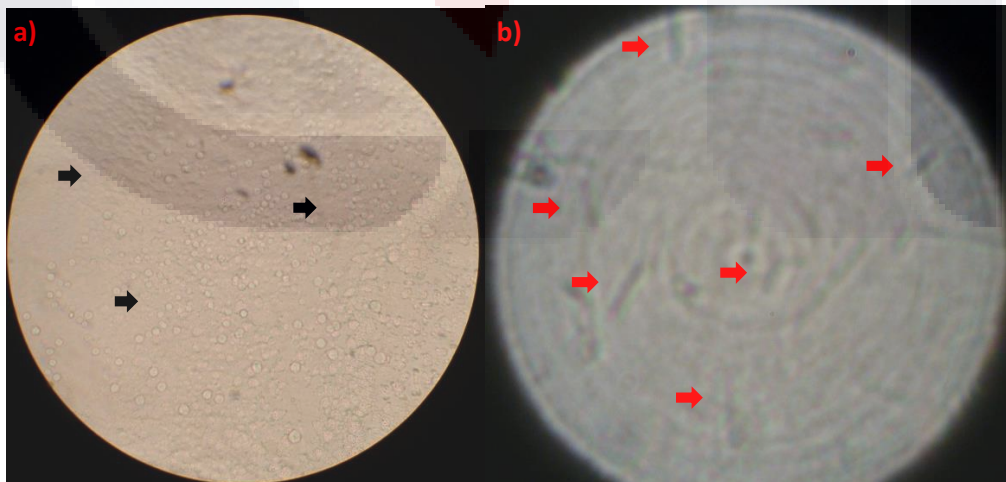


Figura 36. Fotografías de microscopía simple de *C. acetobutylicum* ATCC 824 a 100X. a) Muestra las esporas liofilizadas y rehidratadas en medio RCM a 24 horas de rehidratación. Las flechas negras señalan algunas de las esporas observadas. b) Muestra las bacterias con forma de bacilo germinadas a partir de las esporas tras 72 horas de incubación y crecimiento en agar soya tripticaseína con 5% sangre de oveja. Las flechas rojas indican la ubicación de los bacilos.

6.4.2 FERMENTACIÓN EN MEDIOS REPORTADOS EN LA LITERATURA

Habiendo comprobado por crecimiento en placa que la cepa adquirida es, en efecto, *C. acetobutylicum* se procedió a probar su capacidad para efectuar la fermentación ABE y producir butanol.

Se emplearon 5 medios de fermentación:

- Caldo glucosado Ennis
- Caldo lactosado Ennis
- Caldo lactosado Napoli
- Suero de quesería fortificado
- Suero de quesería adicionado con extracto de levadura.

Se montó una fermentación por cada medio, en todas las fermentaciones se empleó *C. acetobutylicum* ATCC 824 bajo las siguientes condiciones:

- pH inicial \approx 7.0
- Temperatura de fermentación: 37 °C.
- Volumen de inóculo: 80 mL
- Volumen total de fermentación: 400 mL
- Agitación orbital a 125 rpm.
- Anaerobiosis total por inyección de nitrógeno en los caldos de cultivo previo al inicio de la fermentación.

Para cada fermentación se monitoreó el comportamiento del pH, crecimiento celular y consumo de azúcares a 0, 12, 24, 36, 48, 64, 114 y 168 horas. Se determinó también la producción de ácidos y solventes por cromatografía de gases a término de la fermentación, excepto para la fermentación en caldo lactosado Napoli donde la concentración de productos se determinó a las 0, 12, 48, 114 y 168 horas. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 37 a 41.

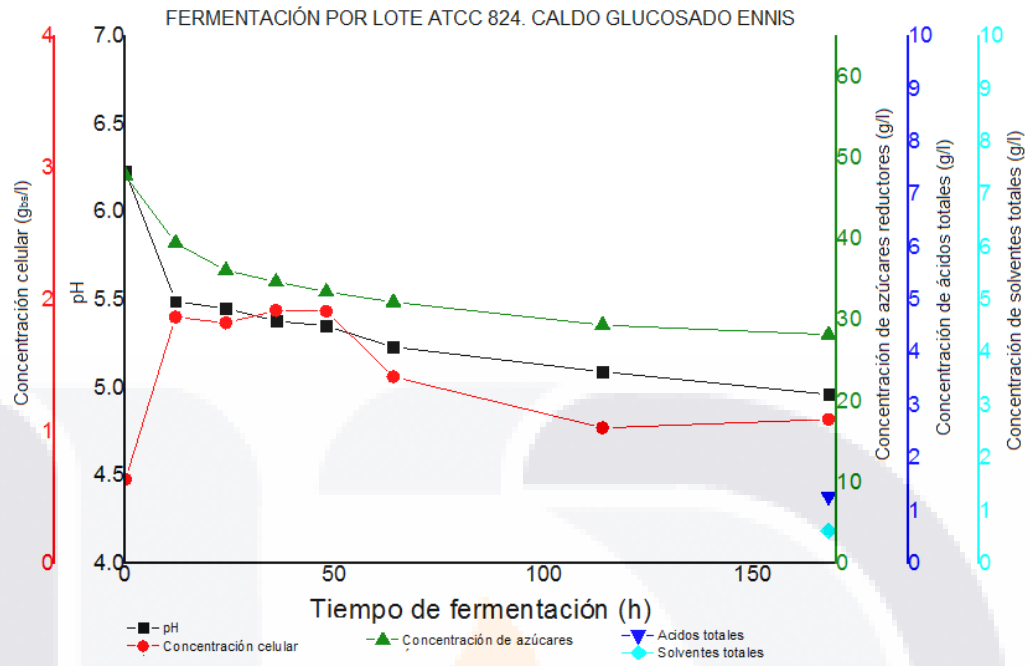


Figura 37. Fermentación por lote en caldo glucosado Ennis, empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

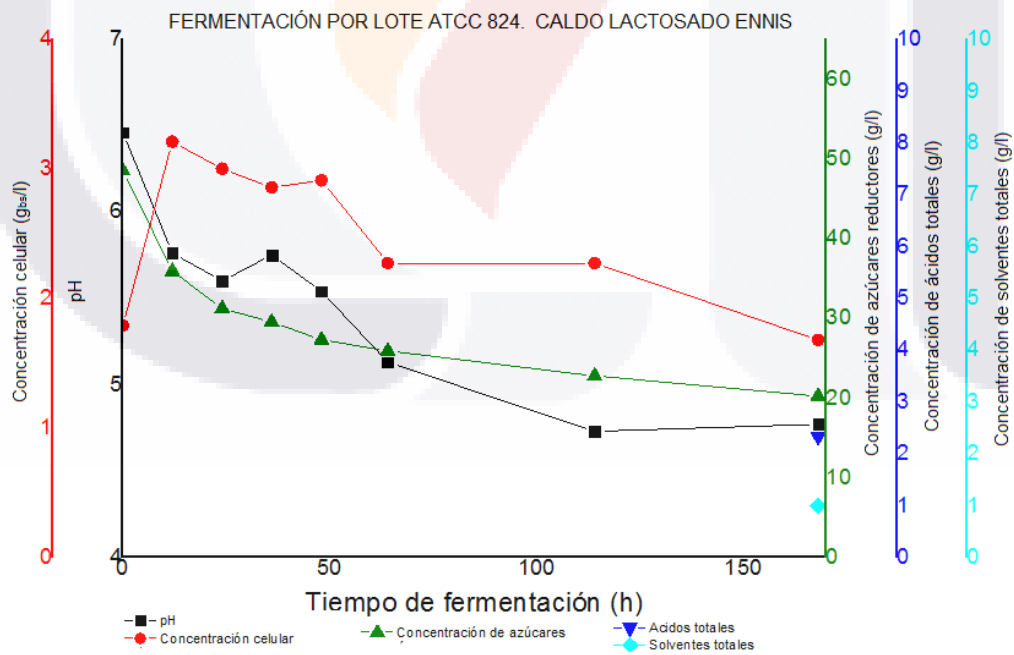


Figura 38. Fermentación por lote en caldo lactosado Ennis, empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

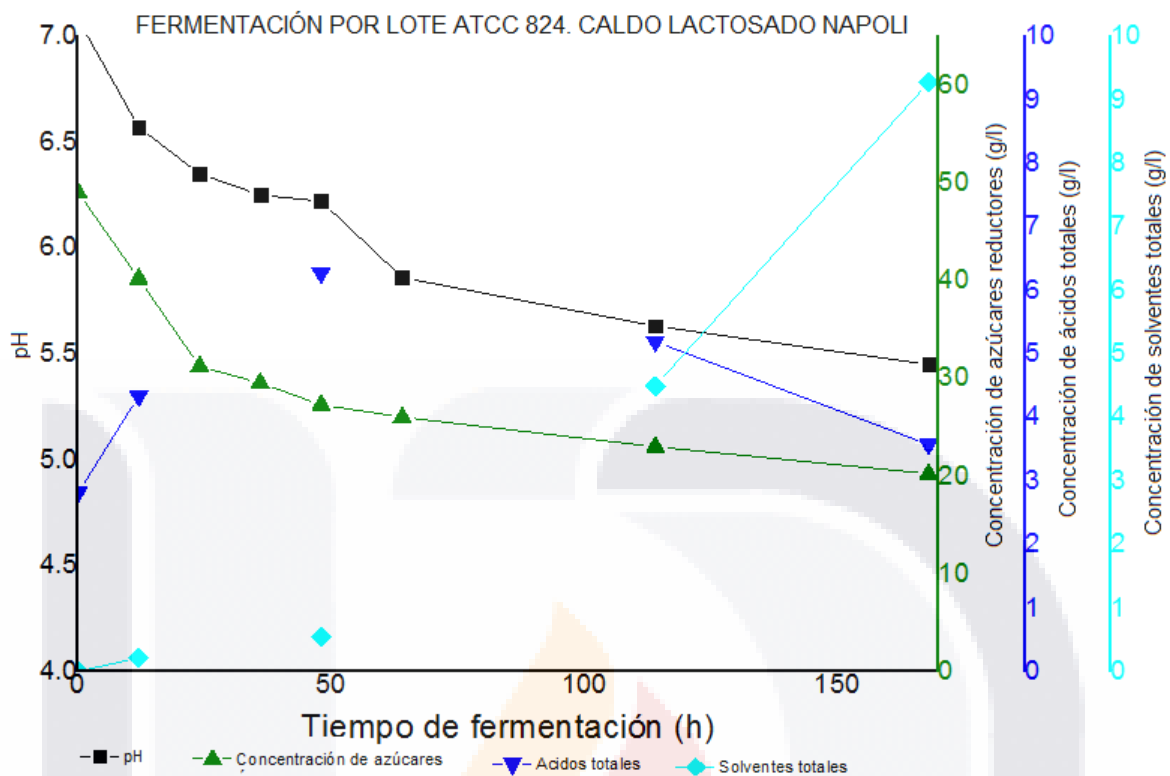


Figura 39. Fermentación por lote en caldo lactosado Napoli, empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

En la figura 39 no fue graficada la concentración celular debido a que la formulación del medio de cultivo no permite su determinación por densidad óptica ni por peso seco. Se observa que el pH no logró disminuir hasta el valor deseado de 4.5 debido a la capacidad reguladora del CaCO_3 que posee en elevadas concentraciones. Los resultados difieren considerablemente con los reportados por Napoli et al. (2008), quienes afirman que empleando el mismo medio de cultivo y la bacteria *C. acetobutylicum* DSM 792 (acrónimo de ATCC 824) se logra disminuir el pH del medio de 6 hasta 4 en sólo 20 horas de fermentación. Por otra parte se observa que la producción total de solventes alcanzó una concentración de 9.27 g/L tras 7 días de fermentación (168 h), produciéndose 3.6 g/L del deseado butanol. Napoli et al. (2008) reportan únicamente la producción de 3 g/L de butanol empleando este medio de cultivo, sin embargo, ellos reportan muy baja producción de acetona y etanol (menos de 1 g/L en conjunto).

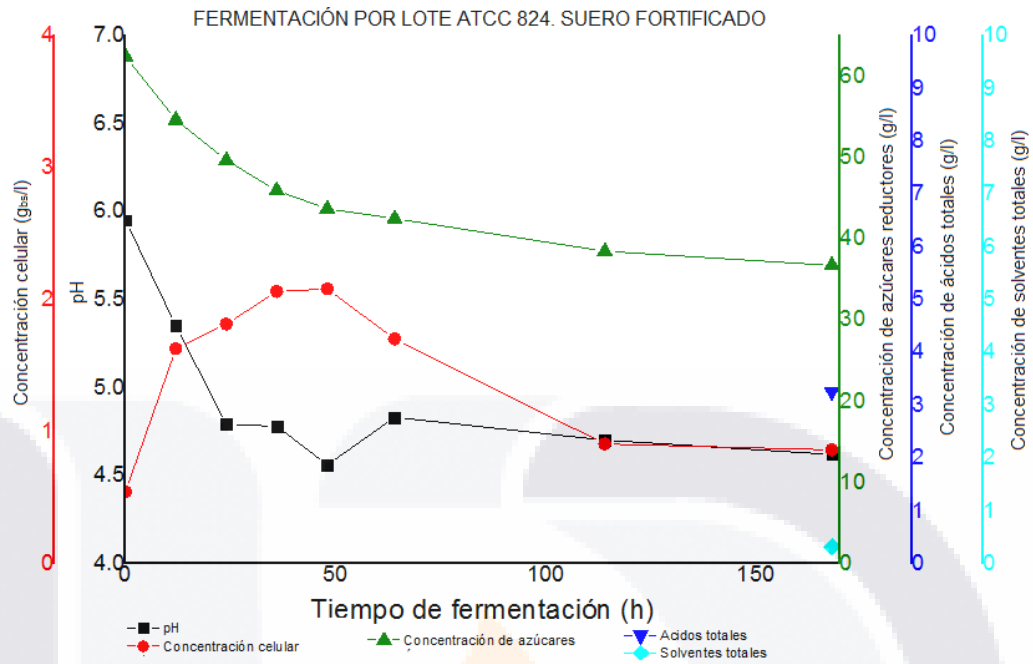


Figura 40. Fermentación por lote en suero de quesería fortificado empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

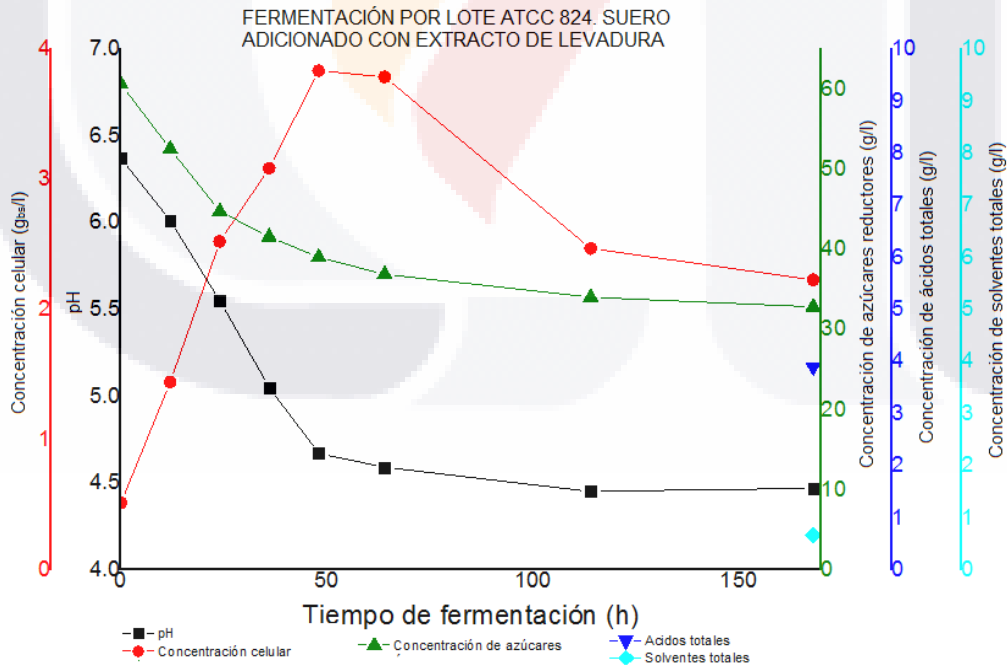


Figura 41. Fermentación por lote en suero de quesería adicionado con extracto de levadura, empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración celular concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

Los resultados completos de la cuantificación de productos de fermentación al término de éstas (168 h) se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Concentraciones de productos de fermentación en caldos de cultivo reportados en la literatura empleando *C. acetobutylicum* ATCC 824.

MEDIO FERMENTATIVO	ACETONA (g/L)	ETANOL (g/L)	BUTANOL (g/L)	ÁCIDO ACÉTICO (g/L)	ÁCIDO BUTÍRICO (g/L)	ÁCIDO LÁCTICO (g/L)
CALDO GLUCOSADO ENNIS	0.072	0.548	0.001	1.245	0.025	0.001
CALDO LACTOSADO ENNIS	0.024	0.956	0.007	2.042	0.068	0.216
CALDO LACTOSADO NAPOLI	0.114	5.541	3.618	1.911	1.232	0.428
SUERO DE QUESERÍA FORTIFICADO	0.050	0.265	0.003	3.010	0.165	0.078
SUERO DE QUESERÍA ADICIONADO CON EXTRACTO DE LEVADURA	0.043	0.606	0.007	2.919	0.154	0.821

Se muestran los resultados obtenidos para las fermentaciones efectuadas con la cepa silvestre ATCC 824 en diversos medios fermentativos reportados en la literatura. La cuantificación de productos se hizo a término de la fermentación por lote (168 horas; 7 días).

Como puede observarse en la tabla anterior los productos principalmente generados en todas las fermentaciones son el ácido acético y el etanol, sin embargo, en la fermentación efectuada empleando caldo lactosado Napoli existe también una buena producción de ácido butírico y butanol.

Al haberse registrado la producción del solvente de mayor interés se efectuó el análisis cromatográfico de muestras tomadas de esta fermentación a diferentes tiempos para buscar determinar el tiempo en el que comienza o en el que se dispara la producción de butanol. La concentración de cada uno de los productos se encuentra graficada en la figura 42. Por otra parte, en base a los consumos de azúcares y las concentraciones de productos generados se efectuaron los cálculos de productividad y rendimiento, mismos que se encuentran resumidos en la tabla 17.

Tabla 17. Rendimientos y productividades para las fermentaciones por lote con *C. acetobutylicum* ATCC 824 empleando medios de cultivo reportados en la literatura.

MEDIO	RENDIMIENTO			
	Ácidos totales (gácidos/gazúcar)	Solventes totales (gsolvente/gazúcar)	Ácido butírico (gácido/gazúcar)	Butanol (gbutanol/gazúcar)
CALDO GLUCOSADO ENNIS	0.065	0.032	0.001	>0.001
CALDO LACTOSADO ENNIS	0.082	0.035	0.002	>0.001
CALDO LACTOSADO NAPOLI	0.222	0.328	0.043	0.128
SUERO DE QUESERÍA FORTIFICADO	0.126	0.012	0.006	>0.001
SUERO DE QUESERÍA ADICIONADO CON EXTRACTO DE LEVADURA	0.140	0.024	0.006	>0.001
MEDIO	PRODUCTIVIDAD			
	Ácidos totales (gácidos/Lh)	Solventes totales (gsolvente/Lh)	Ácido butírico (gácido/Lh)	Butanol (gbutanol/Lh)
CALDO GLUCOSADO ENNIS	0.008	0.004	> 0.001	>0.001
CALDO LACTOSADO ENNIS	0.014	0.006	> 0.001	>0.001
CALDO LACTOSADO NAPOLI	0.037	0.055	0.007	0.022
SUERO DE QUESERÍA FORTIFICADO	0.019	0.002	>0.001	>0.001
SUERO DE QUESERÍA ADICIONADO CON EXTRACTO DE LEVADURA	0.023	0.004	>0.001	>0.001

Se reportan rendimientos y productividades para la concentración de ácidos totales, solventes totales, ácido butírico y butanol obtenidos a 168 horas de fermentación por lote.

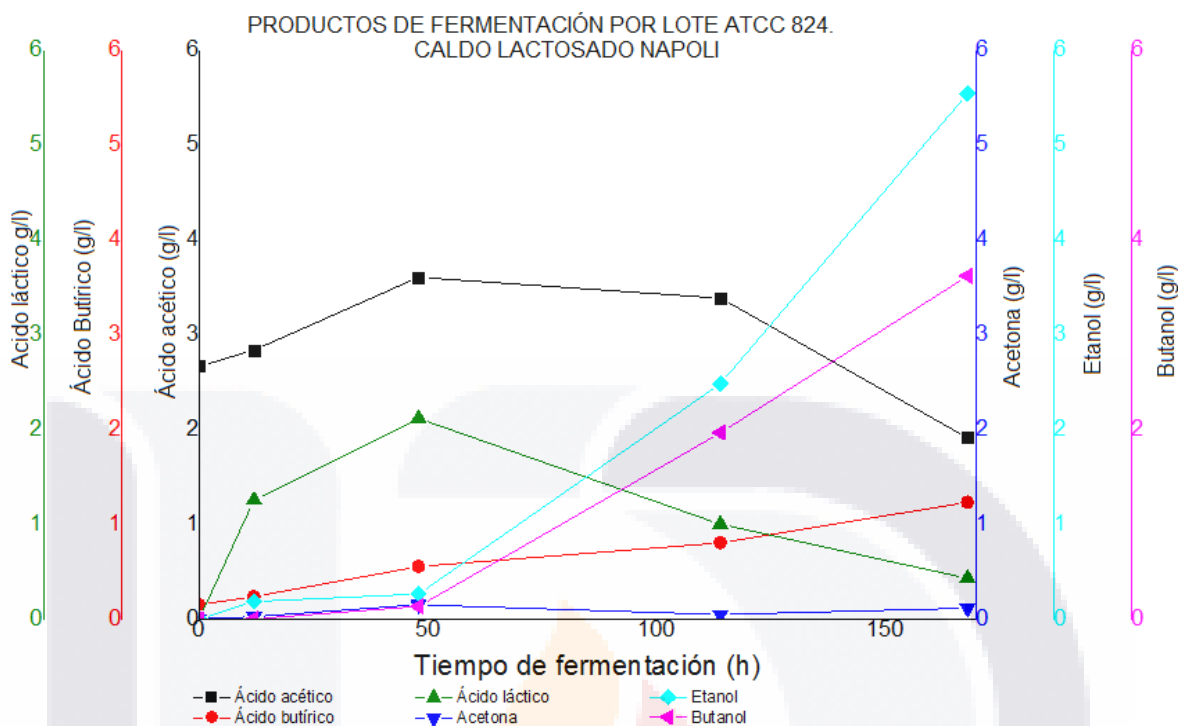


Figura 42. Productos obtenidos mediante fermentación por lote en caldo lactosado Napoli empleando la cepa silvestre ATCC 824 en anaerobiosis.

Habiendo obtenido los mejores resultados al emplear el caldo lactosado Napoli, se procedió a experimentar con fermentaciones en suero de quesería adicionado con los nutrientes añadidos a dicho caldo. Por otra parte, sabiendo que el hierro es un nutriente esencial se probaron 2 fuentes de hierro distintas para comparar su efecto sobre el metabolismo fermentativo de *C. acetobutylicum* ATCC 824.

6.4.3 FERMENTACIÓN EN SUERO DE QUESERÍA SUPLEMENTADO CON EXTRACTO DE LEVADURA, CARBONATO DE CALCIO Y HIERRO.

Se prepararon 3 tipos de medio de cultivo diferentes, generando 3 grupos de fermentación:

-Grupo 0: se empleó suero de quesería suplementado con 5g/L de extracto de levadura y 18 g/L de carbonato de calcio (nutrientes empleados en caldo Napoli).

- Grupo FeSO_4 : se empleó suero de quesería suplementado con 5g/L de extracto de levadura y 18 g/L de carbonato de calcio (nutrientes empleados en caldo Napoli). Además se le adicionaron 20mgFe/L como FeSO_4 .

- Grupo FeCl_3 : se empleó suero de quesería suplementado con 5g/L de extracto de levadura y 18 g/L de carbonato de calcio (nutrientes empleados en caldo Napoli). Además se le adicionaron 20mgFe/L como FeCl_3 .

Se montaron un total de 9 fermentaciones, 3 fermentaciones por cada uno de los grupos. En todas las fermentaciones se empleó *C. acetobutylicum* ATCC 824 bajo las siguientes condiciones:

- pH inicial ≈ 7.0
- Temperatura de fermentación: 37 °C.
- Volumen de inóculo: 80 mL
- Volumen total de fermentación: 400 mL
- Agitación orbital a 125 rpm.
- Anaerobiosis total por inyección de nitrógeno en los caldos de cultivo previo al inicio de la fermentación.

Para cada fermentación se monitoreó el comportamiento del pH, consumo de azúcares y producción de ácidos y solventes a 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 y 168 horas. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 43 a 45.

Se determinaron las concentraciones de cada uno de los productos detectados y en base a ello se calculó el porcentaje de utilización de lactosa, rendimiento y proporción de solventes generado en cada grupo de fermentaciones. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 18.

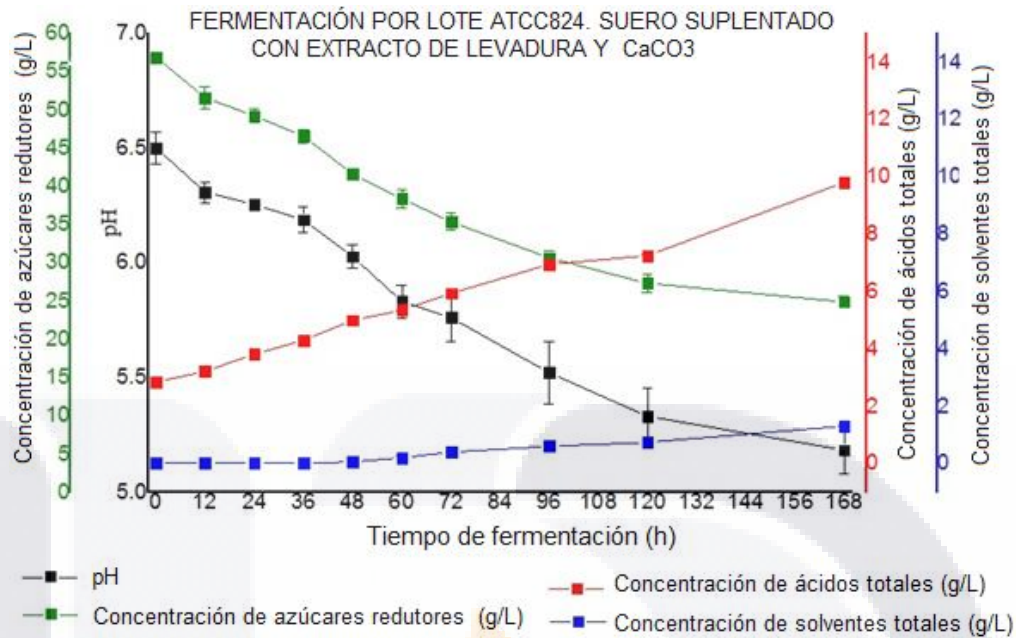


Figura 43. Fermentación por lote en suero de quesería suplementado con extracto de levadura y carbonato de calcio, sin fuente adicional de hierro empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. Se grafican valores promedio (n=3), las barras señalan la desviación estándar. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

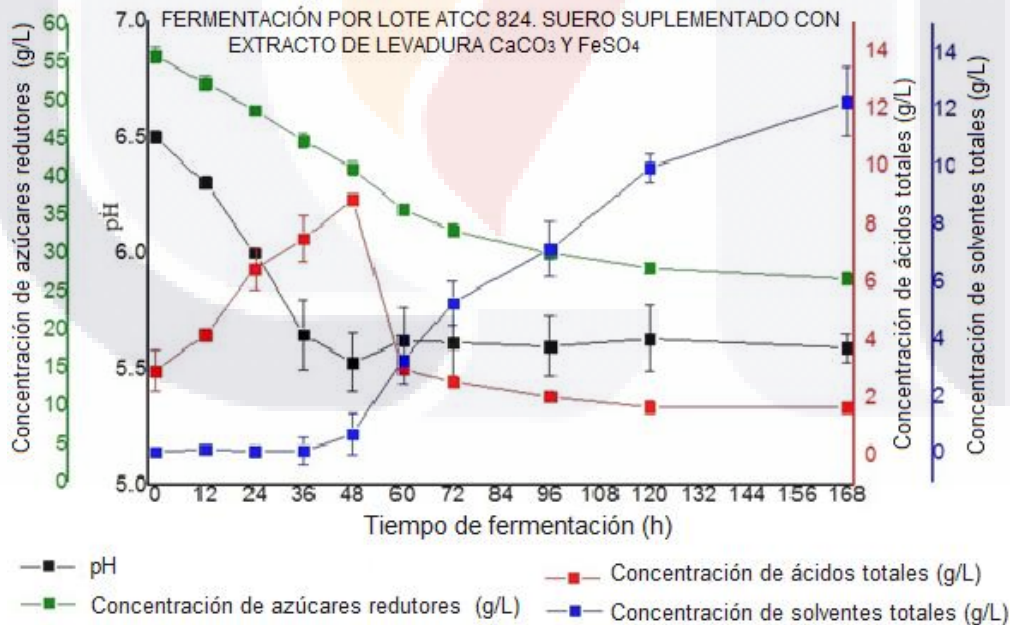


Figura 84. Fermentación por lote en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y 20 mg/L de hierro como FeSO₄, empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. Se grafican valores promedio (n=3), las barras señalan la desviación estándar. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

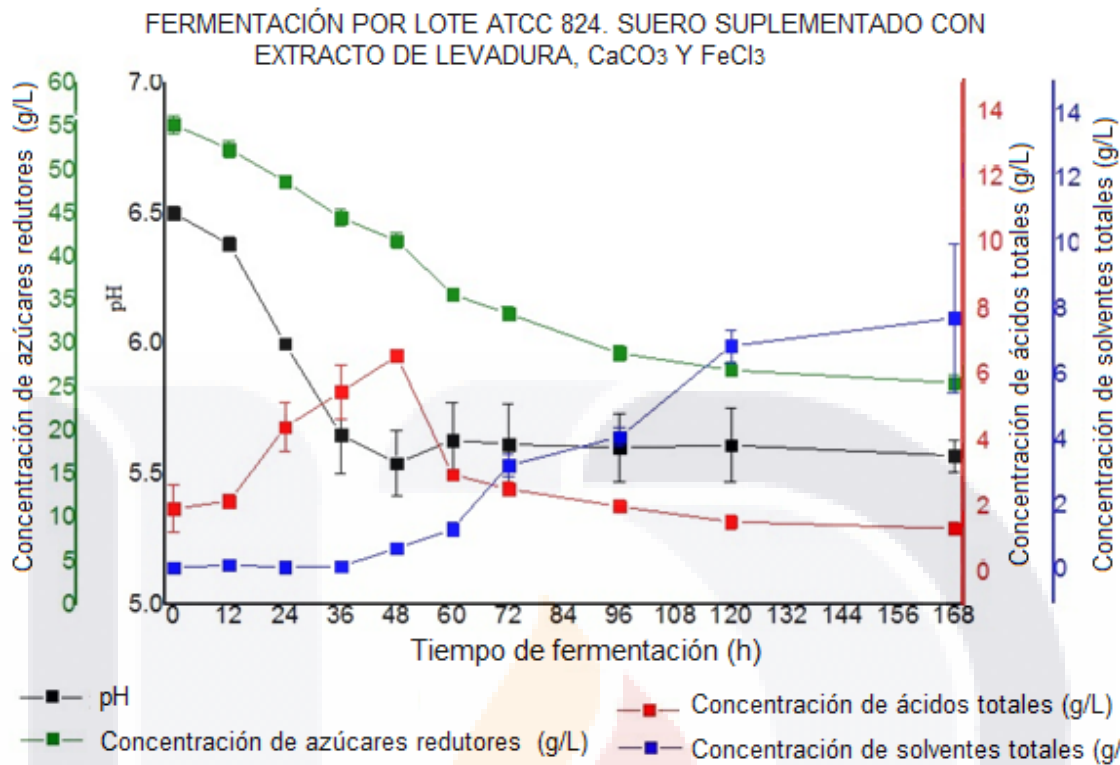


Figura 45. Fermentación por lote en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y 20 mg/L de hierro como FeCl₃, empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares y concentración de productos de fermentación Vs. Tiempo de fermentación. Se grafican valores promedio (n=3), las barras señalan la desviación estándar. En la concentración total de ácidos se consideró la concentración registrada para el ácido acético, ácido láctico y ácido butírico; para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

Tabla 18. Desempeño fermentativo de ATCC 824 en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y hierro a 168 h.

Producto	Grupo 0	Grupo FeSO ₄	Grupo FeCl ₃
Acetato (g/L)	2.61 ± 0.34	0.972 ± 0.08	1.44 ± 0.28
Butirato (g/L)	1.70 ± 0.53	0.650 ± 0.12	1.27 ± 0.35
Lactato (g/L)	5.49 ± 0.69	No detectado	No detectado
Acetona (g/L)	0.04 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Butanol (g/L)	0.06 ± 0.10	7.13 ± 1.53	4.32 ± 0.94
Etanol (g/L)	1.20 ± 0.10	5.11 ± 1.65	3.46 ± 1.37
Solventes totales (g/L)	1.30 ± 0.21	12.24 ± 3.18	7.78 ± 2.30
Consumo de lactosa(%)	56.24 ± 0.65	52.28 ± 0.62	53.80 ± 0.60
Rendimiento (g _p /g _s)	0.04 ± 0.01	0.42 ± 0.10	0.25 ± 0.07
Proporción A:B:E	0.31:0.46:9.23	0.0:5.87:4.13	0.0:5.61:4.39

Las fermentaciones en suero de quesería suplementadas con hierro (Grupo FeSO₄ y Grupo FeCl₃) mostraron el comportamiento típico de dos etapas de una fermentación ABE (Figuras 44 y 45, respectivamente). En la primera etapa, que dura aproximadamente

48 h, se dio el consumo de la lactosa y se produjeron los ácidos acético y butírico, lo que causa la reducción del valor de pH hasta que fue sustancialmente constante alrededor de un valor de 5.5. Entre 48 y 60 h de fermentación comenzó la segunda etapa, caracterizada por la disminución del consumo de la lactosa, la re-asimilación de ácidos y la producción de los solventes deseados: acetona, butanol y etanol, alcanzando una concentración máxima solventes después de 168 h de fermentación.

El producto principal de la fermentación fue el butanol, seguido de etanol, y sólo se detectaron cantidades casi insignificantes de acetona en los caldos de fermentación. Esto podría atribuirse a dos hechos: 1) se ha demostrado que el uso de lactosa como fuente de carbono favorece la producción de butanol sobre acetona (Bahl et al, 1986; Maddox, 1980), y 2) las condiciones de cultivo, específicamente agitación y temperatura (37 ° C), promovió la volatilización acetona por lo que es difícil de detectar en el caldo de cultivo.

Las fermentaciones del Grupo 0 no muestran el comportamiento típico de dos etapas (Figura 43). El consumo de lactosa se produjo pero la producción de ácido acético y butírico fue notablemente baja (menos de 4.5 g/L combinado), en cambio, se produjeron cantidades sustanciales de ácido láctico (5.49 ± 0.69 g/L) (Tabla 18). No se observó re-asimilación de ácidos, pero se registró producción de etanol.

6.4.3.1 COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD PRODUCTIVA DE *C. acetobutylicum* ATCC 824 EN SUERO DE QUESERÍA SUPLEMENTADO CON DIVERSAS FUENTES DE HIERRO

Para evaluar si el factor estudiado (fuente de hierro) tiene un efecto real sobre la capacidad productora de solventes totales y de butanol por parte de *C. acetobutylicum* ATCC 824 se realizaron análisis de varianza. Se efectuaron también pruebas de rangos múltiples para determinar la fuente de hierro que permite obtener el mejor desempeño fermentativo.

Tras 7 días de fermentación se determinó que la producción total de solventes para cada grupo de fermentaciones fue de ($\mu \pm SD$): Grupo 0 (1.30 ± 0.21 g/L), Grupo $FeSO_4$ (12.24 ± 3.18 g/L) y Grupo $FeCl_3$ (7.78 ± 2.30 g/L). El análisis de varianza indica

que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad total de solventes producidos en fermentaciones suplementadas con hierro y las no suplementadas ($p < 0.005$) (Tabla 19).

Tabla 19. ANOVA para solventes totales producidos (g/L) por fuente de hierro.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	180.866	2	90.4332	17.34	0.0032
Within groups	31.2857	6	5.21429		
Total (Corr.)	212.152	8			

Se reporta el resultado del ANOVA univariado evaluando la concentración de solventes totales obtenida a término de la fermentación (7 días).

La prueba de rangos múltiples mostró que la producción total de solventes presenta diferencias estadísticamente significativas entre el suero de quesería sin suplementación con hierro y el mismo sustrato con una fuente extra de hierro, sin embargo, no existió ninguna diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon las dos fuentes de hierro diferentes, es decir, FeSO_4 y FeCl_3 (Tabla 20, Figura 46).

Tabla 20. Prueba de rangos múltiples para solventes totales producidos (g/L) por fuente de hierro.

Método: 95.0 % LSD			
B.HIERRO	Count	Mean	Homogeneous Groups
sin hierro (0)	3	1.30133	X
FeCl_3	3	7.78333	X
FeSO_4	3	12.2183	X
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
FeSO_4 - FeCl_3		4.435	4.56217
FeSO_4 - sin hierro	*	10.917	4.56217
FeCl_3 - sin hierro	*	6.482	4.56217

Se reporta el resultado de la prueba de rangos múltiples evaluando la concentración de solventes totales obtenida a término de la fermentación (7 días). (*) denota una diferencia estadísticamente significativa

Evaluando únicamente la producción de butanol para cada grupo de fermentaciones se obtuvo ($\mu \pm \text{SD}$): Grupo 0 (0.06 ± 0.10 g/L), Grupo FeSO_4 (7.13 ± 1.53 g/L) y Grupo FeCl_3 (4.32 ± 0.94 g/L). El análisis de varianza indicó que hay una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad total de butanol producido por cada condición de fermentación probada, ($p < 0.001$) (Tabla 21).

MEDIAS E INTERVALOS LSD AL 95%

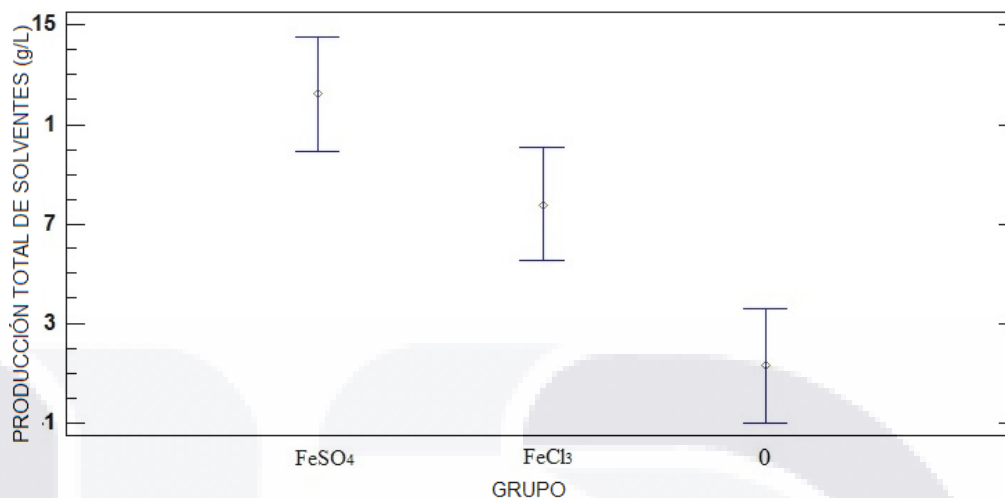


Figura 46. Medias e intervalos LSD 95.0% para la producción de solventes totales por cada una de las fuentes de hierro evaluadas.

Tabla 21. ANOVA para butanol producido (g/L) por fuente de hierro.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	76.0259	2	38.0129	35.54	0.0005
Within groups	6.41734	6	1.06956		
Total (Corr.)	82.4432	8			

Se reporta el resultado del ANOVA univariado evaluando la concentración de butanol obtenida a término de la fermentación (7 días).

La prueba de rangos múltiples indicó que, para la producción de butanol, existe diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos (Tabla 22, Figura 47).

Tabla 22. Prueba de rangos múltiples para butanol producido (g/L) por fuente de hierro.

Método: 95.0 % LSD			
B.HIERRO	Count	Mean	Homogeneous Groups
sin hierro (0)	3	0.0613333	X
FeCl ₃	3	4.32267	X
FeSO ₄	3	7.131	X
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
FeSO ₄ - FeCl ₃	*	2.80833	2.06622
FeSO ₄ - sin hierro	*	7.06967	2.06622
FeCl ₃ - sin hierro	*	4.26133	2.06622

Se reporta el resultado de la prueba de rangos múltiples evaluando la concentración butanol obtenida a término de la fermentación (7 días). (*) denota una diferencia estadísticamente significativa.

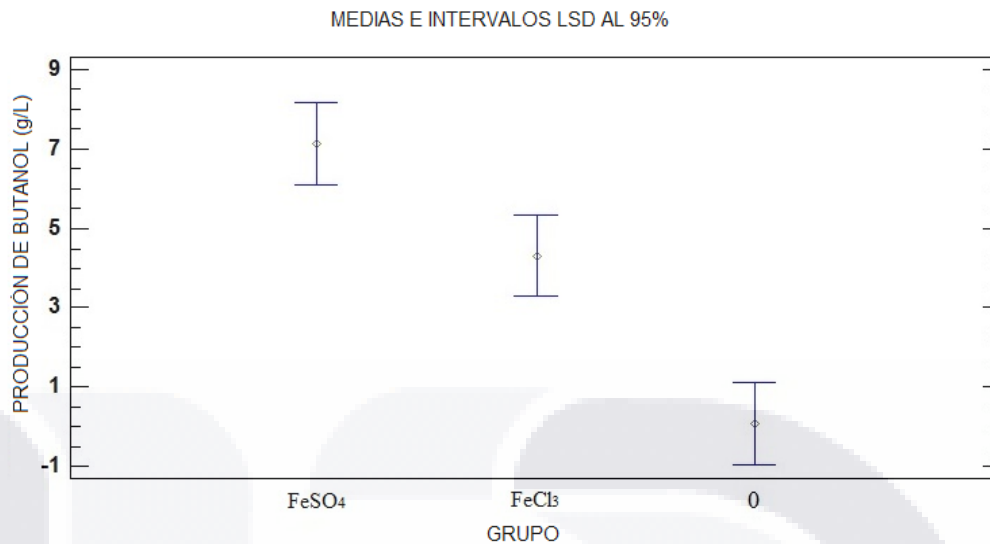


Figura 47. Medias e intervalos LSD 95.0% para la producción de butanol por cada una de las fuentes de hierro evaluadas.

Ambas fuentes de hierro probadas mostraron una producción prácticamente nula de acetona, pero la proporción de butanol fue superior empleando FeSO₄ (0.0: 5.87: 4.13), en comparación con FeCl₃ (0.0: 5.61: 4.39). El uso de FeSO₄ como fuente de hierro aumentó la producción de butanol en un 65% en comparación con lo logrado mediante el empleo de FeCl₃, esto puede deberse tanto a la presencia de hierro como de azufre, ambos componentes esenciales para la producción de ferredoxina, la proteína clave para el enrutamiento del metabolismo fermentativo de *C. acetobutylicum*. Adicionalmente las fermentaciones del grupo FeSO₄ mostraron un mayor rendimiento para la producción de solventes totales (0.42 ± 0.10) comparado con el Grupo FeCl₃ (0.25 ± 0.07), a pesar de consumos casi iguales de azúcar. Estos resultados mostraron que la conversión de azúcar a ácidos y la re-asimilación de estos ácidos se desarrollaron mejor cuando la fuente de hierro también incluyó azufre, bajo condiciones ensayadas.

6.4.4 GENERACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE ATCC 824

Para determinar la concentración máxima de butanol en la que la cepa silvestre *C. acetobutylicum* ATCC 824 es capaz de crecer la cepa fue sembrada en medios de cultivo MPC sin butanol (Figura 48a) con butanol al 1.0% v/v (Figura 48b), 1.5% v/v (Figura 48c), 2.0% v/v (Figura 48d), 2.5% v/v (Figura 48e) y 3.0% v/v (Figura 48f). Los medios inoculados fueron incubados a 37°C en condiciones de anaerobiosis hasta observar la

aparición de crecimiento bacteriano típico de *C. acetobutylicum*: colonias blancas traslúcidas con decoloración completa del medio de cultivo.

En la figura 48 puede observarse que la máxima concentración de butanol en la que *C. acetobutylicum* ATCC 824 es capaz de crecer de forma natural es a 2.5% v/v (20.25 g_{butanol}/L). A concentración de 3.0% v/v tras 10 días de incubación no se logró observar la aparición de colonias típicas de la bacteria ni se observó cambio alguno en el medio de cultivo.

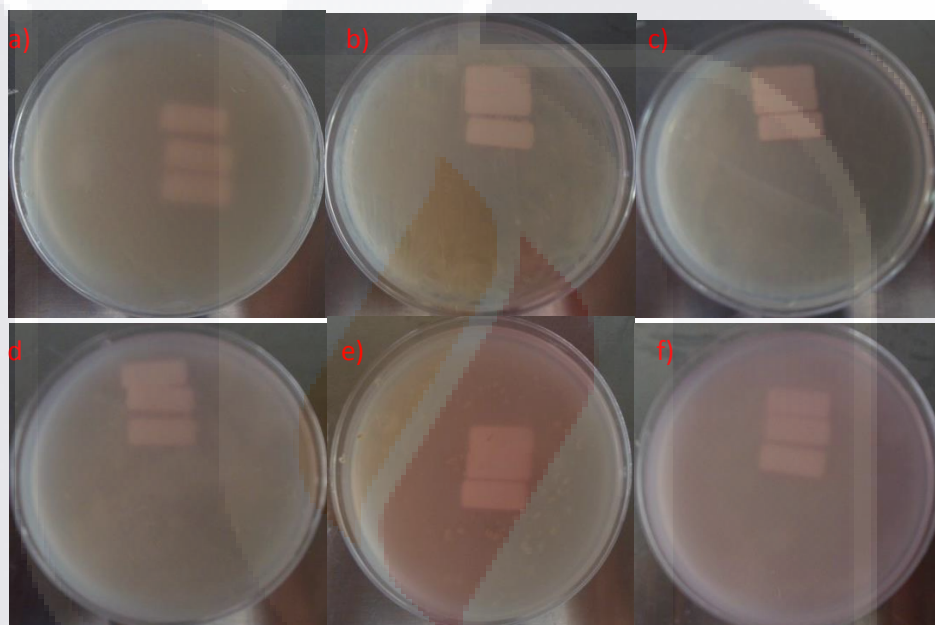


Figura 48. Crecimiento de *C. acetobutylicum* ATCC 824 en MPC sólido adicionado con diferentes concentraciones de butanol. a) MPC sin butanol tras 24 horas de incubación; b) MPC + butanol 1.0% tras 24 horas de incubación; c) MPC + butanol 1.5% tras 48 horas de incubación; d) MPC + butanol 2.0% tras 48 horas de incubación; e) MPC + butanol 2.5% tras 48 horas de incubación; f) MPC + butanol 3.0% tras 240 horas de incubación (10días).

La cepa silvestre fue resembrada en MPC adicionado con 2.5% v/v de butanol, incubada 48 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis y posteriormente expuesta al agente mutágeno: luz ultravioleta (254 nm). Tras 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos de exposición al mutágeno la bacteria fue resembrada en MPC sólido adicionado con 3.0% v/v, 4.0% v/v y 5.0% v/v de butanol respectivamente.

- 2.5% v/v (20.25 g/l): concentración máxima de butanol, reportada en la literatura, en la que puede crecer una cepa de *C. acetobutylicum* y

concentración máxima donde se registró crecimiento de *C. acetobutylicum* ATCC 824.

- 3.0% v/v (24.30 g/l): concentración a la que se logró obtener mutantes al emplear la cepa CDBB-B-797.
- 4.0% v/v (32.40 g/l)
- 5.0% v/v (40.5 g/l): concentración a la cual, si se logran obtener mutantes, se tendrá una cepa resistente al doble de la concentración de butanol originalmente soportada.

La cepa original sin exposición a radiación ultravioleta fue incubada en igualdad de condiciones que la cepa expuesta a radiación por lapsos de 5, 10, 30, 45 y 60 minutos. Las cajas de cultivo incubadas fueron observadas diariamente para detectar el crecimiento bacteriano. Se registró el día de aparición de colonias bacterianas observables a simple vista para cada una de las condiciones de cultivo dadas. En las únicas condiciones en las que se encontró crecimiento bacteriano típico de *C. acetobutylicum* fue en las placas de cultivo con 3% v/v de butanol, resemebradas con la cepa ATCC 824 expuesta durante 30 y 45 minutos a la luz UV (en ambos casos las colonias típicas aparecieron tras 4 días de incubación). El resto de las placas no presentó crecimiento bacteriano y tras 28 días de incubación fueron desechadas.

La mutante expuesta durante 45 minutos a luz ultravioleta fue la que logró resistir la presencia de $24.3 \text{ g}_{\text{butanol}}/\text{L}$ tras ser resemebrada en MPC. Esta cepa fue designada como Mutante 3 (M3) y empleada para las pruebas fermentativas.

6.4.5 FERMENTACIÓN POR LOTE EN SUERO DE QUESERÍA Y CALDO LACTOSADO SUPLEMENTADO CON EXTRACTO DE LEVADURA, CARBONATO DE CALCIO Y FeSO_4 EMPELANDO ATCC 824 Y SU MUTANTE SELECCIONADA M3.

Se montaron un total de 12 fermentaciones divididas en 4 grupos; el primer grupo correspondió a ATCC 824 fermentando caldo lactosado suplementado, el segundo grupo ATCC 824 fermentando suero de quesería suplementado, el tercer grupo la mutante M3 fermentando caldo lactosado suplementado y finalmente el grupo 4 la mutante M3 fermentando suero de quesería suplementado. Las condiciones de fermentación fueron las siguientes:

- pH inicial \approx 7.0
- Temperatura de fermentación: 37 °C.
- Volumen de inóculo: 80 mL
- Volumen total de fermentación: 400 mL
- Agitación orbital a 125 rpm.
- Anaerobiosis total por inyección de nitrógeno en los caldos de cultivo previo al inicio de la fermentación.
- Fuente de hierro: FeSO_4 (20 mgFe/L)

Para cada fermentación se monitoreó el comportamiento del pH y consumo de azúcares a 0, 12, 24, 48, 72, 120 y 168 horas. La producción de solventes se determinó al final de la fermentación (168 h). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 49 a 52.

Se determinaron las concentraciones de cada uno de los productos detectados y en base a ello se calculó el porcentaje de utilización de lactosa, rendimiento y proporción de solventes generado en cada grupo de fermentaciones. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 23.

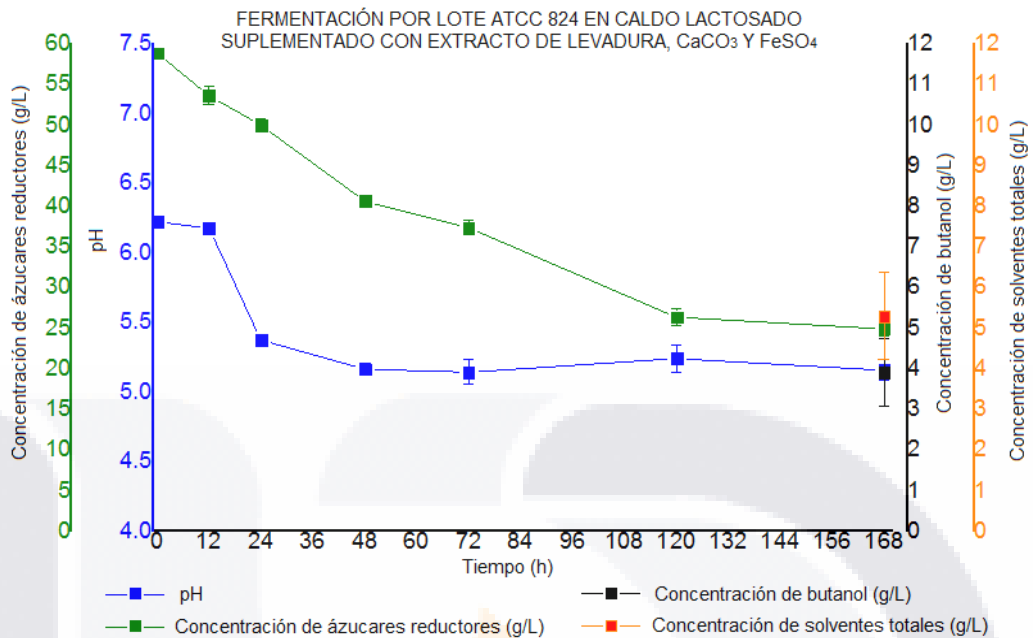


Figura 49. Fermentación por lote en caldo lactosado suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO₄ empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración de butanol y concentración de solventes totales Vs. Tiempo de fermentación. Se grafican valores promedio (n=3), las barras señalan la desviación estándar. Para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

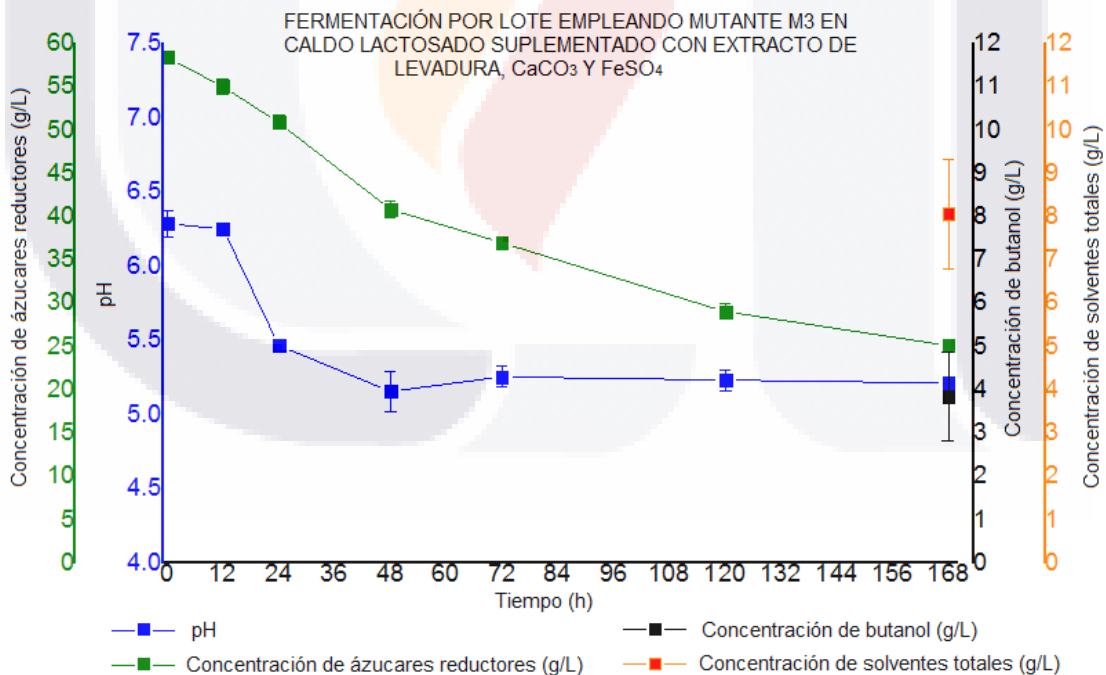


Figura 50. Fermentación por lote en caldo lactosado suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO₄ empleando M3. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración de butanol y concentración de solventes totales Vs. Tiempo de fermentación. Se grafican valores promedio (n=3), las barras señalan la desviación estándar. Para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

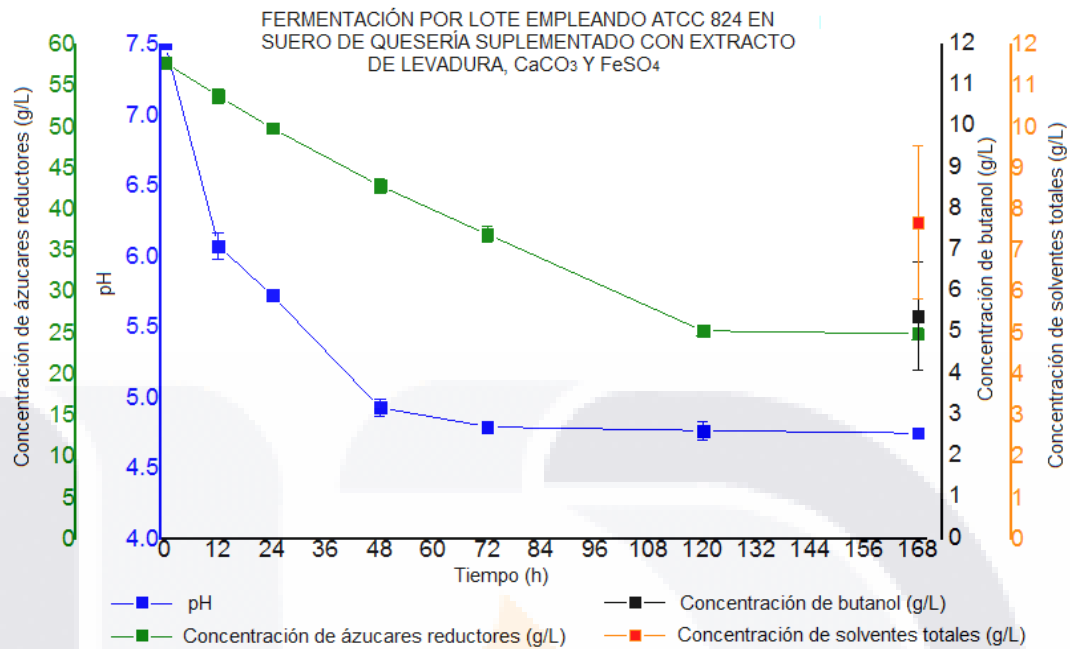


Figura 51. Fermentación por lote en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO₄ empleando ATCC 824. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración de butanol y concentración de solventes totales Vs. Tiempo de fermentación. Se grafican valores promedio (n=3), las barras señalan la desviación estándar. Para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

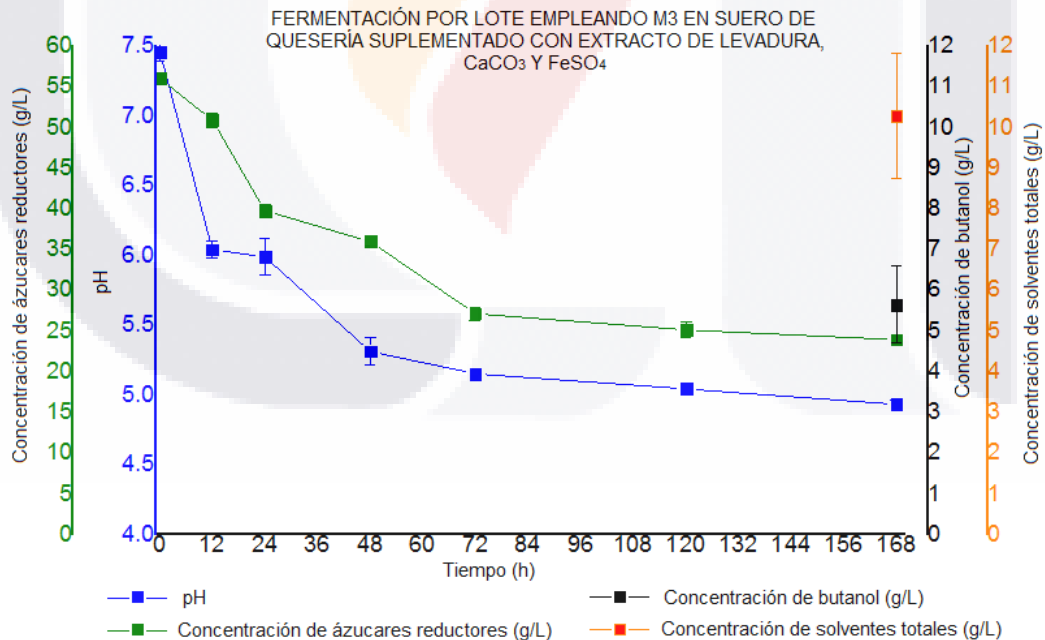


Figura 52. Fermentación por lote en suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO₄ empleando M3. Gráfico pH, concentración de azúcares, concentración de butanol y concentración de solventes totales Vs. Tiempo de fermentación. Se grafican valores promedio (n=3), las barras señalan la desviación estándar. Para la concentración total de solventes fueron considerados los registros para acetona, etanol y butanol.

Tabla 23. Desempeño fermentativo de ATCC 824 y M3 en caldo lactosado y suero de quesería suplementado con extracto de levadura, carbonato de calcio y FeSO₄ a 168h.

Producto	ATCC 824 caldo suplementado	ATCC 824 suero suplementado	M3 caldo suplementado	M3 suero suplementado
Acetato (g/L)	2.83± 0.53	3.13 ± 0.34	1.65 ± 0.39	2.52 ± 0.63
Butirato (g/L)	2.70 ± 1.33	0.26 ± 0.20	2.09 ± 1.81	0.32 ± 0.27
Lactato (g/L)	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
Acetona (g/L)	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Butanol (g/L)	3.90 ± 0.84	5.40 ± 1.31	3.84 ± 1.02	5.64 ± 0.91
Etanol (g/L)	1.37 ± 0.89	2.28 ± 1.65	4.20 ± 1.72	4.64 ± 1.57
Solventes totales (g/L)	5.29 ± 1.07	7.68 ± 1.85	8.06 ± 1.27	10.28 ± 1.53
Consumo de lactosa (%)	57.73 ± 0.58	56.99 ± 0.82	57.03 ± 0.50	57.37± 0.60
Rendimiento (g _p /g _s)	0.16 ± 0.10	0.23 ± 0.18	0.24 ± 0.07	0.32 ± 0.04
Proporción A:B:E	0.04:7.37:2.59	0.0:7.03:2.97	0.03:4.76:5.21	0.0:5.49:4.51

Al comparar las fermentaciones efectuadas se tiene que el empleo del suero de quesería como sustrato incrementa la producción total de solventes, para ambas cepas empleadas: ATCC 824 y M3. El producto principal de la fermentación fue el butanol, seguido de etanol (excepto en el grupo de fermentaciones efectuadas con M3 en caldo suplementado, donde se observó una mayor producción de etanol), y sólo se detectaron cantidades casi insignificantes de acetona en los caldos de fermentación. Esto podría atribuirse a dos hechos: 1) se ha demostrado que el uso de lactosa como fuente de carbono favorece la producción de butanol sobre acetona (Bahl et al, 1986; Maddox, 1980), y 2) las condiciones de cultivo, específicamente agitación y temperatura (37 ° C), promovió la volatilización acetona por lo que es difícil de detectar en el caldo de cultivo.

De manera general se observa que la cepa mutante M3 tiene la capacidad de producir una mayor cantidad de solventes que la cepa original de donde se derivó en igualdad de condiciones fermentativas. Esto genera el incremento en la productividad fermentativa de 0.16 g/g a 0.23 g/g empleando como sustratos caldos lactosados y de 0.24 a 0.32 g/g empleando como sustrato el suero de quesería. Lamentablemente el incremento en la producción de solventes es debido a un incremento en la producción de etanol y no de butanol como se deseaba. En la Tabla 23 puede observarse el incremento

en la producción de etanol sin mostrar mejoras para la producción de butanol lo que ocasiona un incremento en la proporción de etanol con respecto al butanol producido.

6.4.5.1 COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD PRODUCTIVA DE *C. acetobutylicum* ATCC 824 Y SU MUTANTE SELECCIONADA M3 EMPLENADO COMO SUSTRATOS CALDO LACTOSADO Y SUERO DE QUESERÍA SUPLEMENTADO

Se realizaron análisis de varianza para evaluar si la cepa mutante generada tiene un efecto real sobre la capacidad productora de solventes totales y de butanol, en comparación con *C. acetobutylicum* ATCC 824. Se efectuaron también pruebas de rangos múltiples para determinar la cepa bacteriana y el sustrato empleado que permita obtener el mejor desempeño fermentativo.

Se efectuó un análisis de varianza multifactorial para la producción total de solventes a 7 días (168 h) de fermentación. Los factores involucrados son la cepa empleada: ATCC 824 y mutante M3; y el sustrato: caldo lactosado suplementado y suero de quesería suplementado. El análisis de varianza indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad total de solventes producidos al emplear suero de quesería suplementado como sustrato en comparación con el empleo de caldo lactosado ($p < 0.05$) (Tabla 24). De igual manera existe una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de solventes totales producidos al emplear la cepa mutante M3 en comparación con la cepa ATCC 824 ($p < 0.05$) (Tabla 24). La interacción entre los factores sustrato-cepa no presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.1$).

Tabla 24. ANOVA para solventes totales producidos (g/L) por sustrato por cepa.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:SUSTRATO	15.9621	1	15.9621	7.62	0.0247
B:CEPA	21.4936	1	21.4936	10.26	0.0126
INTERACTIONS					
AB	0.0176333	1	0.0176333	0.01	0.9292
RESIDUAL	16.7579	8	2.09473		
TOTAL (CORRECTED)	54.2313	11			

Se reporta el resultado del ANOVA multifactorial evaluando la concentración de solventes totales obtenida a término de la fermentación (7 días).

La prueba de rangos múltiples estableció que existe diferencia estadísticamente significativa en la producción total de solventes por la cepa mutante M3 en comparación con ATCC 824 (Tabla 25, Figura 53). La prueba de rangos múltiples para la variable sustrato indicó que existe diferencia estadísticamente significativa entre emplear como sustrato el suero de quesería y el caldo lactosado, enriquecidos con los mismos suplementos (Tabla 26, Figura 53). El análisis de interacción de los factores indicó que sin importar cual cepa sea empleada utilizar suero de quesería como sustrato generará una mayor producción total de solventes (Figura 53).

Tabla 25. Prueba de rangos múltiples para solventes totales producidos (g/L) por cepa.

Método: 95.0 % LSD				
CEPA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
ATCC 824	6	6.48833	0.590866	X
M3	6	9.165	0.590866	X
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>	
ATCC 824 - M3	*	-2.67667	1.92693	

Se reporta el resultado de la prueba de rangos múltiples evaluando la concentración de solventes totales por cepa obtenida a término de la fermentación (7 días). (*) denota una diferencia estadísticamente significativa

Tabla 26. Prueba de rangos múltiples para solventes totales producidos (g/L) por sustrato.

Método: 95.0 % LSD				
SUSTRATO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
CALDO LACTOSADO	6	6.67333	0.590866	X
SUERO DE QUESERÍA	6	8.98	0.590866	X
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>	
CALDO LACTOSADO - SUERO DE QUESERÍA	*	-2.30667	1.92693	

Se reporta el resultado de la prueba de rangos múltiples evaluando la concentración de solventes totales por sustrato obtenida a término de la fermentación (7 días). (*) denota una diferencia estadísticamente significativa

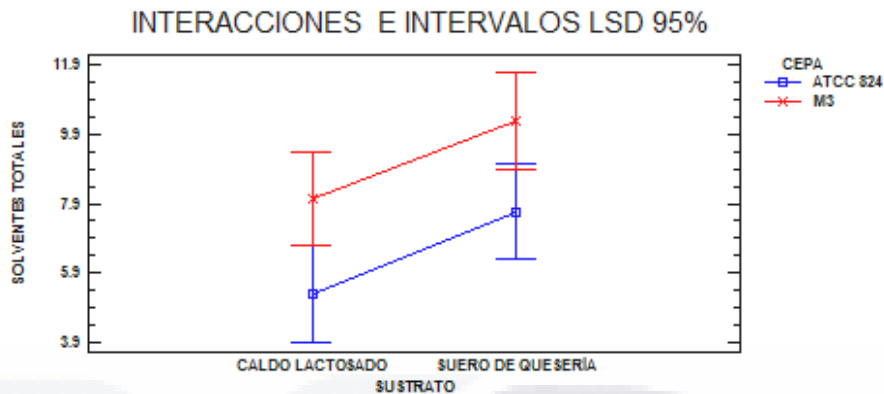


Figura 53. Interacción de los factores e intervalos LSD para producción de solventes totales empleando dos cepas y dos sustratos diferentes.

Evaluando únicamente la producción de butanol el análisis de varianza multifactorial indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de butanol producido al emplear suero de quesería suplementado como sustrato en comparación con el empleo de caldo lactosado ($p < 0.05$) (Tabla 27). Sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de butanol producido al emplear la cepa mutante M3 en comparación con la cepa ATCC 824 ($p > 0.1$) (Tabla 27). La interacción entre los factores sustrato-cepa no presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.1$).

Tabla 27. ANOVA para butanol producido (g/L) por sustrato por cepa.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:SUSTRATO	8.11808	1	8.11808	7.66	0.0244
B:CEPA	0.0184083	1	0.0184083	0.02	0.8984
INTERACTIONS					
AB	0.063075	1	0.063075	0.06	0.8134
RESIDUAL	8.47993	8	1.05999		
TOTAL (CORRECTED)	16.6795	11			

Se reporta el resultado del ANOVA multifactorial evaluando la concentración de butanol obtenida a término de la fermentación (7 días).

La prueba de rangos múltiples estableció que no existe diferencia estadísticamente significativa en la producción de butanol por la cepa mutante M3 en comparación con ATCC 824 (Tabla 28, Figura 54). La prueba de rangos múltiples para la variable sustrato indicó que existe diferencia estadísticamente significativa entre emplear como sustrato el suero de quesería y el caldo lactosado, enriquecidos con los mismo suplementos (Tabla 29, Figura 54). El análisis de interacción de los factores indicó que sin importar cual cepa

sea empleada utilizar suero de quesería como sustrato generará una mayor producción de butanol (Figura 54).

Tabla 28. Prueba de rangos múltiples para butanol producido (g/L) por cepa.

Método: 95.0 % LSD				
CEPA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
ATCC 824	6	4.65	0.420316	X
M3	6	4.72833	0.420316	X
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits	
ATCC 824 - M3		-0.0783333	1.37073	

Se reporta el resultado de la prueba de rangos múltiples evaluando la concentración de butanol por cepa obtenida a término de la fermentación (7 días). (*) denota una diferencia estadísticamente significativa

Tabla 29. Prueba de rangos múltiples para butanol producido (g/L) por sustrato.

Método: 95.0 % LSD				
SUSTRATO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
CALDO LACTOSADO	6	6.67333	0.590866	X
SUERO DE QUESERÍA	6	8.98	0.590866	X
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits	
CALDO LACTOSADO - SUERO DE QUESERÍA	*	-1.645	1.37073	

Se reporta el resultado de la prueba de rangos múltiples evaluando la concentración de butanol por sustrato obtenida a término de la fermentación (7 días). (*) denota una diferencia estadísticamente significativa

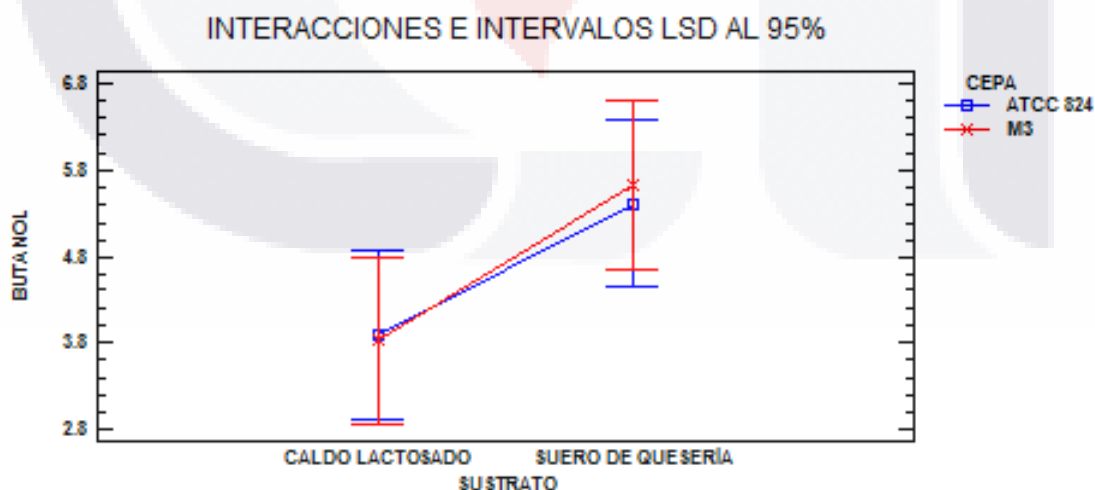


Figura 54. Interacción de los factores e intervalos LSD para producción de butanol empleando dos cepas y dos sustratos diferentes.

7. DISCUSIÓN

7.1 SUERO DE QUESERÍA COMO SUSTRATO PARA LA FERMENTACIÓN ABE

Los sustratos convencionales de la fermentación ABE incluyen principalmente almidón y melaza de maíz, trigo y centeno. Con el fin de reducir el costo del producto final (butanol) una variedad de sustratos más baratos se han probado incluyendo: sacarosa (Tashiro y Sonomoto, 2010; Parekh y Blaschek, 1999), biomasa lignocelulósica (Jang et al., 2012; Ranjan y Moholkar, 2009), residuos domésticos, agrícolas e industriales (Niemistö et al., 2013; Jang et al., 2012), glicerol (exclusivamente en fermentaciones con *C. pasteurianum*) (Sabra et al., 2014; Jang et al., 2012; Tashiro y Sonomoto, 2010; Dabrock et al., 1992), biomasa de algas, (Jang et al., 2012; Ranjan y Moholkar, 2009), paja de trigo, fibra de maíz, almidón de maíz licuado, pulpa de manzana, alcachofas de Jerusalén (Ranjan y Moholkar, 2009), suero de queso (Ranjan y Moholkar, 2009; Ennis y Maddox, 1989; Bahl et al., 1986; Maddox, 1980;), entre otros.

Las especies solventogénicas de *Clostridium* son capaces de fermentar una amplia gama de hidratos de carbono; la biomasa lignocelulósica se ha identificado como un posible sustrato para la producción barata de ABE y otros productos químicos finos, sin embargo, la bioconversión de la biomasa lignocelulósica está plagada de una serie de limitaciones, en particular la generación de compuestos inhibidores microbianos durante el pretratamiento y la hidrólisis de la lignocelulosa a los azúcares mixtos, y la utilización ineficiente de los azúcares mixtos generados por la fermentación de microorganismos debido a la represión catabólica por carbono (Ezeji y Blaschek, 2008); por lo tanto, otros sustratos baratos y fácilmente utilizables, cuyas aplicaciones en la fermentación no requieren tratamiento previo, puede llegar a ser sustratos más rentables y eficientes que la lignocelulosa.

Entre los residuos no lignocelulósicos el suero de quesería es el sustrato más ampliamente investigado para la producción de ABE, sobre todo debido a su abundancia y alta demanda biológica de oxígeno (DBO), que constituye un importante problema de disposición para la industria láctea. Debido a su relativamente bajo contenido de azúcar (4-5% de lactosa) este residuo no es adecuado para muchos procesos de fermentación

sin concentración previa, mientras que lo vuelve satisfactorio para la fermentación ABE, donde la toxicidad del producto limita la cantidad de utilización del azúcar (Maddox, 1980). A pesar de ser considerado bajo el contenido de lactosa ésta no se consume totalmente durante la fermentación, se han reportado porcentajes de utilización que van de un 50 hasta un 80% de los azúcares (Durán-Padilla et al., 2014; Napoli et al., 2009; Bahl et al., 1982), siendo todavía menor el aprovechamiento de la lactosa cuando se emplea suero de quesería en comparación con caldos lactosados (Foda et al., 2010).

A nivel mundial la producción y consumo de queso aumenta rápidamente lo que significa una mayor generación de desechos que crearan problemas de contaminación, todo esto aumenta el interés de utilizar este residuo para la producción de combustibles (Foda et al., 2010).

Estudios publicados previamente (Foda et al., 2010; Bahl et al., 1986; Maddox, 1980) caracterizan al permeado de suero de quesería como un sustrato que puede ser utilizado para la fermentación ABE. Bahl et al. (1986) y Maddox (1980) describen que el metabolismo de la lactosa favorece la producción de butanol sobre la acetona, añadiendo incentivos económicos para la producción de butanol. Otros autores estudiaron el efecto específico de la administración de suplementos nutricionales o limitación de la actividad fermentativa de clostridios, incluyendo: hierro (Vasileva et al., 2012; Peguin y Soucaille, 1995; Dabrock et al., 1992; Bahl et al., 1986), fosfato (Dabrock et al., 1992; Bahl et al., 1986), CO (Dabrock et al., 1992), sustitutos de ferredoxina (Peguín y Soucaille, 1995), flavonoides (Wang et al., 2014), reducción de cofactores (Li et al., 2014), entre otros. Sin embargo, las condiciones de fermentación y los requisitos nutricionales para el óptimo uso de suero de quesería no han sido completamente aclarados y se requería de un trabajo más amplio.

Tratando de reutilizar los desechos de la industria láctea local, este estudio evaluó la adecuación del uso de suero de queso como caldo de fermentación para la producción de ABE haciendo hincapié en cubrir las necesidades nutricionales de *C. acetobutylicum*, especialmente la administración de suplementos de hierro, para el enrutamiento del metabolismo hacia la producción de los solventes deseados.

El suero de quesería que mostró mejorar el desempeño fermentativo de *C. acetobutylicum* ATCC 824 fue el adicionado con extracto de levadura, CaCO_3 y hierro, especialmente FeSO_4 . La adición de extracto de levadura fue basada en reportes previos (Napoli et al., 2010; Pääkkilä et al., 2009; Napoli et al., 2009; Napoli et al., 2008; Ennis, 1987) y porque es sabido que es una excelente fuente de elementos traza requeridos por los microorganismos para ayudar a su crecimiento. El carbonato de calcio fue adicionado ya que se reporta que la regulación del pH del caldo de cultivo por la adición de este compuesto puede incrementar el título de butanol obtenido (Dong et al., 2012; Groot et al., 1989). La adición del hierro y sus efectos sobre el desempeño fermentativo se describen ampliamente a continuación.

Durante el trabajo experimental las fermentaciones empleando suero de quesería suplementados con hierro (FeSO_4 y FeCl_3) mostraron el comportamiento de dos etapas de fermentación, típico de la fermentación ABE. En la primera etapa, que dura aproximadamente 48 h, se da el consumo de la lactosa y los ácidos acético y butírico se producen reduciendo el pH del medio de cultivo hasta que se vuelve sustancialmente constante alrededor de un valor de 5. Entre las 48 y 60 h de fermentación comienza la segunda etapa, caracterizada por la disminución del consumo de lactosa y la promoción de re-asimilación de ácidos en los solventes deseados: acetona, butanol y etanol, hasta alcanzar una concentración máxima de solventes después de 168 h de fermentación.

El producto principal de las fermentaciones fue el butanol, seguido del etanol, a excepción de algunas fermentaciones efectuadas con cepas mutantes (M3) en las que se observa una mayor producción de etanol que de butanol. En todas las fermentaciones se detectaron cantidades casi insignificantes de acetona en el caldo de fermentación, lo que puede deberse a dos cosas: 1) la lactosa como fuente de carbono favorece la producción de butanol sobre la acetona (Bahl et al., 1986; Maddox, 1980) y 2) Las condiciones de cultivo, específicamente la agitación y la temperatura (37 °C), promueve la volatilización de la acetona por lo que es difícil de detectarla en el caldo de cultivo. El tiempo requerido para completar la fermentación (7 días) y para la preparación del inóculo (72h) empleando como sustrato el suero fue superior al reportado por Foda et al. (2010) (75 h) y Napoli et al. (2008) (96 h) debido a la presencia de citrato en el medio de cultivo (≈ 10 g/L). El citrato está presente en el suero de quesería debido a que es utilizado para la producción de

algunos tipo de queso, principalmente el queso asadero; se ha reportado que altas concentraciones (>2.5g/L) inhibe el crecimiento de *C. acetobutylicum*; la presencia de citrato contribuye a que se observe un tiempo prolongado inusual requerido para completar la fermentación de suero de leche (Bahl et al., 1986).

Por otra parte, las fermentaciones efectuadas en suero de quesería que no ha sido correctamente suplementado no muestran el comportamiento de dos fases típico de la fermentación ABE. Tiene lugar el consumo de lactosa pero generan cantidades de ácido acético y butírico notablemente bajas (menos de 4.5 g/L en conjunto), en cambio, se producen cantidades sustanciales de ácido láctico (5.49 ± 0.69 g/L). No tiene lugar la re-asimilación de ácidos, pero se registra producción de etanol. Los resultados obtenidos en fermentaciones empleando suero de quesería no suplementado con hierro difieren de los presentados por Maddox (1980), quien afirma que el uso de suero de quesería complementado solamente con extracto de levadura *C. acetobutylicum* NCIB 2951 puede producir hasta 15 g/L de butanol y que requiere 5 días para alcanzar esta concentración máxima; también menciona que empleando suero de quesería sin ninguna suplementación podría alcanzar una concentración máxima butanol de 13 g/L en un tiempo de fermentación de 7 días. Sin embargo, en estudios posteriores, Ennis y Maddox (1989), utilizando una cepa diferente de *C. acetobutylicum* (P262), emplearon medios semi-sintéticos emulando suero de quesería, suplementados con sulfato ferroso y otros componentes, a pesar de tener extracto de levadura añadido, pero no se dió explicación para estas adiciones.

Vasileva et al. (2012), Peguin y Soucaille (1995) y Bahl et al. (1986) coinciden en la importancia del hierro en el metabolismo fermentativo de *Clostridium acetobutylicum*, afirmando que en un entorno deficiente de hierro el principal producto que se puede obtener de la fermentación es el lactato y no se observa la re-asimilación de los ácidos orgánicos acético y butírico.

Como se muestra en la Figura 13 *C. acetobutylicum* tiene la capacidad de descomponer la lactosa hidrolizándola en glucosa y galactosa que después se metaboliza por la vía Embden Meyerhof (EMP) para generar piruvato, entonces el piruvato tiene que ser oxidado para producir acetil CoA que desempeña un papel central en el metabolismo

de *C. acetobutylicum* ya que sirve como un precursor para la generación de todos los productos deseados. La oxidación de piruvato se produce en una reacción que está acoplada a la reducción de ferredoxina, utilizando hidrógeno como aceptor final de electrones. Se requiere de hierro suficiente para producir suficiente ferredoxina para completar esta oxidación (Lee et al., 2008). En un entorno deficiente de hierro la formación de hidrógeno molecular no tiene lugar y el metabolismo cambia de piruvato a lactato en lugar de producir acetil CoA (Gheshlaghi et al., 2009).

Bahl et al. (1986) indican que limitando la cantidad de hierro en el caldo de cultivo se ayuda a aumentar la proporción de butanol/acetona producida (de 2: 1 a 8:1); los iones ferrosos permitieron que el efecto fuera más drástico. Sin embargo, en condiciones de hierro-limitado el lactato se convierte en el principal producto, en lugar de producir acetato y butirato, afectando negativamente a la concentración final, el rendimiento y la productividad del butanol. Aumentar la proporción butanol/acetona podría facilitar los procesos de recuperación y purificación del producto, pero por la disminución de la cantidad de butanol producido la limitación del hierro resulta contraproducente.

Por otra parte, Peguin y Soucaille (1995) sugieren limitar el hierro disponible en caldos de cultivo a base de glucosa, utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824, ayuda a modular los flujos de carbono y electrones. Para obtener resultados deseables de fermentación un compuesto (viológeno de metilo) que reemplaza las funciones de ferredoxina debe ser proporcionada a los medios de cultivo, debido a la ferredoxina no podía ser sintetizada correctamente debido a la deficiencia de hierro. Al limitar la cantidad de hierro presente la actividad de la deshidrogenasa se afecta limitando la conversión de acetil-CoA en β -hidroxibutirato. Estos autores reportaron que el viológeno de metilo es un mejor sustrato para la ferredoxina-NAD (P) + reductasa que incluso la propia ferredoxina, ya que crea una cadena de transporte de electrones artificial. Ambos efectos: reducción de la actividad deshidrogenasa y aumentan ferredoxina-NAD (P) + reductasa hacen posible obtener mayores rendimientos de butanol que los obtenidos con la fermentación normal ABE, alcanzando una concentración máxima butanol 13 g/L. Sin embargo, la adición de viológeno de metilo causa un alargamiento de la fase lag de crecimiento lo que afecta directamente la productividad de la fermentación. Aumentar la producción de alcoholes mediante la limitación de hierro puede sonar favorable, pero, el tener la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

necesidad de complementar compuestos que pueden servir como aceptores de electrones para evitar la formación de lactato puede ser más costoso para el proceso y más problemático para la recuperación de productos.

En el presente trabajo se demuestra que adicionando cantidades adecuadas de hierro (20 mg/L) se pueden lograr mejoras en la producción de butanol favoreciendo el comportamiento normal deseado de las vías fermentativas de *C. acetobutylicum*. Los resultados muestran que el suero complementado adecuadamente, puede servir como un buen sustrato para la fermentación ABE. El suero de queso es un sustrato de bajo costo disponible y ampliamente producido que requiere poco tratamiento previo para servir como sustrato de fermentación por lo que es más barato que otros sustratos utilizados como los materiales lignocelulósicos, la biomasa de algas o diferentes residuos industriales y domésticos. Además la lactosa presente en el suero de quesería tiende a favorecer la producción de butanol sobre acetona; una mejora de las condiciones de fermentación para utilizar plenamente la lactosa en el suero de leche podría llevar a la fermentación ABE a la competitividad económica.

Adicionalmente a la producción de lactato se registran otras desviaciones en la ruta metabólica generando productos como acetoína, reportada en el presente trabajo y en los trabajos realizados por Liu et al. (2014) y Ennis (1987), quienes señalan que éste podría ser un valor agregado de la fermentación ABE ya que la acetoína es un compuesto químico altamente empleado como aditivo para agregar sabor y olor a los alimentos; para lograr la producción de acetoína se debe desviar la ruta metabólica de la producción de acetona, sacrificando este solvente por otro compuesto de valor agregado mayor que podría contribuir a cooperar con la competitividad económica de la fermentación ABE.

7.2 GENERACIÓN DE CEPAS MUTANTES POR MUTAGÉNESIS NO DIRIGIDA

Una de las principales limitaciones de la fermentación ABE es la inhibición de las bacterias por el producto que generan: butanol. El butanol es presenta numerosos efectos dañinos sobre *C. acetobutylicum* a concentraciones suficientemente elevadas para inhibir el crecimiento; el butanol destruye la habilidad de la célula para mantener su pH interno, disminuye la concentración de ATP e inhibe el consumo de azúcares del sustrato (Bowles

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y Ellefson, 1985). El butanol actúa dañando la membrana celular causando una disrupción en los componentes fosfolipídicos de la misma lo que incrementa la fluidez afectando su permeabilidad y la actividad de la ATPasa unida a la membrana (Dong et al., 2012). Thomas et al. (2014) determinaron que el estrés al que es sometida la bacteria por la acumulación de los productos de fermentación genera perturbaciones en el balance redox lo que provoca represiones de genes que codifican para los sistemas de fosfotransferasas, motilidad celular y proteínas flagelares lo que desemboca en la detención prematura del crecimiento celular.

En las últimas décadas diversos estudios se han realizado con la finalidad de modificar genéticamente cepas de *Clostridium* de distintas especies buscando incrementar el rendimiento de butanol que se obtiene mediante extender el rango de sustratos que pueden ser aprovechados por estos clostridios, incrementar el rendimiento de butanol por fuente de carbono, favorecer la producción selectiva de butanol en lugar de las mezclas de ácidos y solventes normalmente obtenidas y, principalmente, incrementar la tolerancia de las bacterias a la presencia de su inhibidor (butanol) (Niemistö et al., 2013).

Los métodos empleados para efectuar las mutaciones varían desde métodos físicos y químicos tradicionales hasta la implementación de modernos sistemas de mutación. Existen una gran variedad de agentes físicos y químicos que pueden inducir mutaciones. Algunos de los mutágenos empleados en cepas de clostridios han sido sulfonato de etilmetano (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), radiación ultravioleta, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, ácido nalidixico, metronidazol, entre otros (Thomas et al., 2014). Dentro de las estrategias moleculares, llamadas de ingeniería genética, incluyen la mutagénesis dirigida empleando técnicas avanzadas de biología molecular como la inserción de plásmidos y la delección de estos, la expresión policistónica de genes de producción de butanol en organismos heterólogos que no tienen la capacidad natural de esporular, sistemas promotores inducibles, estrategias de supresión, microarreglos de ADN, mutagénesis por transposición, mutagénesis sitio dirigida (empleando la herramienta ClosTron® para el caso específico de los clostridios) y tecnologías de ARN antisentido (Pérez-Mancilla y Montoya-Castaño, 2013).

A pesar de que la mutagénesis dirigida de los microorganismos ha demostrado ampliamente proporcionar mejores resultados que la mutación efectuada utilizando agentes químicos y físicos, para el género *Clostridium* se ha demostrado que es sumamente difícil generar mutantes por ingeniería genética con diseño e inserción de plásmidos, ya que a pesar de insertar los fragmentos a su el genoma *Clostridium* no los expresa. La única manera de lograr una correcta mutación dirigida en clostridios es empleando el sistema patentado ClosTron. Por ello este estudio busca proporcionar alternativas de mutación haciendo uso de las técnicas tradicionales de mutación por exposición a radiación UV-C ($\lambda = 254\text{nm}$).

La longitud de onda efectiva de la radiación ultravioleta para la mutagénesis está comprendida entre los 200 y 300 nm, región conocida como de onda corta, UV lejano o UV-C (Gayán et al., 2013). A 260 nm de longitud de onda de la radiación se da la máxima absorción por parte del DNA, la longitud de onda con mayor efecto germicida y mutágeno es la de 254 nm (Eisenstark, 1998). Los productos más importantes de la acción de la luz UV son dímeros (timina-timina; timina-citosina; citosina-citosina) que se forman entre pirimidinas (T, C) adyacentes, lo que incrementa enormemente la probabilidad de que durante la replicación del DNA, la DNA polimerasa inserte un nucleótido incorrecto en tal posición (Gayán et al., 2013), generando así cambios en los genes y su expresión.

Los experimentos de mutagénesis realizados con las cepas bacterianas CDBB-B-797 y ATCC 824 demostraron que la exposición de estas cepas a la luz ultravioleta puede generar cambios que les permiten adaptarse y soportar concentraciones de solventes, en específico de butanol, superiores a las que pueden soportar las cepas silvestres de donde fueron obtenidas.

A pesar de que la cepa silvestre CDBB-B-797 no es capaz de producir butanol se logaron generar dos mutantes derivadas de ella que sí pueden producirlo. La cepa mutante denominada M1 logró producir 1.12 ± 0.5 g/L de solventes totales, de los cuales 0.96 ± 0.22 g/L corresponden a butanol, mientras que la cepa denominada M2 logró producir 0.65 ± 0.04 g/L de solventes totales, siendo casi el 100% de su producción butanol. Lamentablemente las cantidades de butanol producido fueron inferiores por lo menos en un orden de magnitud a las reportadas en la literatura para cepas silvestres de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

C. acetobutylicum y de hasta dos órdenes de magnitud cuando se comparan con otras cepas mutantes. La mutante generada de mayor interés, a partir de CDBB-B-797 fue M2, ya que a pesar de producir una menor cantidad de butanol mostró capacidad para producir casi únicamente butanol, teniendo producciones de etanol y acetona en el orden de los miligramos por litro. Lamentablemente la mutagénesis efectuada en las cepas de *Clostridium acetobutylicum* CDBB-B-797 empleando como mutágeno la luz ultravioleta fueron inestables y ambas mutantes volvieron a su condición original de no tener la capacidad de efectuar la fermentación ABE.

Por otra parte, de la cepa ATCC 824 logró generarse una mutante que demostró producir una concentración total de solventes significativamente mayor a la obtenida con la cepa original, lamentablemente el incremento en la concentración total de solvente es debido a un incremento en la producción de etanol y no una mejora en la producción de butanol como era deseado. Por lo anterior esta cepa mutante generada no resulto favorable para su uso en la producción de butanol a nivel laboratorio o nivel industrial.

CONCLUSIÓN

El suero de quesería es un sustrato viable para la fermentación ABE, siempre y cuando sea adecuadamente preparado y suplementado. La adición de una fuente de hierro es estrictamente necesaria para el suero de quesería sea un sustrato viable ya que la falta de éste impide la síntesis de ferredoxina y restringe la actividad de la ferredoxina-piruvato oxidorreductasa, lo que conduce a la producción de ácido láctico en lugar de los deseados solventes ABE.

La adición de una fuente de hierro acompañada con azufre (FeSO_4) mejora la producción de butanol en un 65 % en comparación con lo obtenido al emplear una fuente de hierro con distinto estado de oxidación y sin azufre (FeCl_3) bajo las mismas condiciones de fermentación. FeSO_4 es una fuente de hierro ideal para mejorar la producción de butanol cuando se emplea el suero de leche como sustrato.

El empleo de suero de quesería debidamente suplementado mostró generar un mejor desempeño fermentativo que el caldo lactosado igualmente suplementado, empleando para la fermentación tanto la cepa ATCC 824 como su mutante M3. Emplear suero de quesería favoreció el incremento en la producción de butanol lo que se refleja en un incremento en la productividad.

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 tiene la capacidad de asimilar los azúcares presentes en el suero de quesería y metabolizarlos para generar los solventes de interés: acetona, etanol y butanol, a concentraciones de hasta 12.24 ± 3.18 g/L de solventes totales, de los cuales 7.13 ± 1.53 g/L corresponden al butanol. La cepa mutante M3 generada a partir de ATCC 824 mejoró la producción de solventes totales, incrementando la producción de etanol.

Clostridium acetobutylicum CDBB-B-797 procedente de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV-IPN, tiene la capacidad de aprovechar los azúcares presentes en el suero de leche para generar biomasa y producir ácidos pero no tiene la capacidad de efectuar la fermentación ABE para la producción de butanol.

GLOSARIO

ATCC 824: clave asignada a la cepa silvestre de *C. acetobutylicum* por la American Type Culture Collection.

CDBB-B-797: clave asignada a la cepa silvestre de *C. acetobutylicum* por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV-IPN.

Factor de dilución (D): en cultivo continuo se refiere a la cantidad de flujo alimentado y cosechado a un reactor por volumen de trabajo ($D=f/v$).

Fermentación ABE: Fermentación acetobutílica en la cual los azúcares son asimilados para producir acetona, etanol y butanol.

g_{bs} : gramos de biomasa seca, se refiere el peso registrado por un grupo de células secado y llevado a peso constante.

g_s : gramos de sustrato, se refiere a una cantidad de sustrato (azúcares) específica.

g_p : gramos de producto, se refiere a la cantidad total de productos generados.

Intervalos LSD: intervalos Least Significant Difference (Diferencia Mínima Significativa). Herramienta estadística para comparación por parejas de medias de grupos.

M1: cepa bacteriana derivada de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 resistente a una concentración de 2.5% v/v de butanol tras exposición a radiación ultravioleta ($\lambda= 254$ nm) por 60 minutos.

M2: cepa bacteriana derivada de *C. acetobutylicum* CDBB-B-797 resistente a una concentración de 3.0% v/v de butanol tras exposición a radiación ultravioleta ($\lambda= 254$ nm) por 60 minutos.

M3: cepa bacteriana derivada de *C. acetobutylicum* ATCC 824 resistente a una concentración de 3.0% v/v de butanol tras exposición a radiación ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) por 45 minutos.

Velocidad específica de crecimiento (μ): velocidad de crecimiento de un microorganismo en un sustrato dado, en función del sustrato limitante.

Velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}): velocidad específica de crecimiento máxima que puede alcanzar un microorganismo en un sustrato dado.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleksic, S. (2009). *Butanol Production from Biomass*. (Master of Science in Engineering), Youngstown State University, OhioLink Electronic Theses y Dissertations Center. Retrieved from [https://etd.ohiolink.edu/ap:10:0::NO:10:P10_ETD_SUBID:86589\(ysu1242762960\)](https://etd.ohiolink.edu/ap:10:0::NO:10:P10_ETD_SUBID:86589(ysu1242762960))
- Antoni, D., Zverlov, V., y Schwarz, W. (2007). Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 23-35. doi: 10.1007/s00253-007-1163-x
- Atlas, R. M. (2004). *Handbook of Microbiological Media* (L. Parks Ed. Third ed. Vol. 1). USA: CRC Press.
- Atsumi, S., Cann, A. F., Connor, M. R., Shen, C. R., Smith, K. M., Brynildsen, M. P., . . . Liao, J. C. (2008). Metabolic engineering of Escherichia coli for 1-butanol production. *Metabolic Engineering*, 10(6), 305-311. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2007.08.003>
- Bahl, H., Andersch, W., y Gottschalk, G. (1982). Continuous production of acetone and butanol by Clostridium acetobutylicum in a two-stage phosphate limited chemostat. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 15(4), 201-205. doi: 10.1007/BF00499955
- Bahl, H., Gottwald, M., Kuhn, A., Rale, V., Andersch, W., y Gottschalk, G. (1986). Nutritional Factors Affecting the Ratio of Solvents Produced by Clostridium acetobutylicum. *Appl Environ Microbiol*, 52(1), 169-172.
- Banat, F. A., y Al-Shannag, M. (2000). Recovery of dilute acetone–butanol–ethanol (ABE) solvents from aqueous solutions via membrane distillation. *Bioprocess Engineering*, 23(6), 643-649. doi: 10.1007/s004490000214
- Barroso-Castillo, J. (2012). ¿Qué es octanaje? Retrieved from <http://www.ref.pemex.com/octanaje/que.htm>
- Birnboim, H. C., y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6), 1513-1523.
- Bowles, L. K., y Ellefson, W. L. (1985). Effects of butanol on Clostridium acetobutylicum. *Appl Environ Microbiol*, 50(5), 1165-1170.
- Cooksley, C. M., Zhang, Y., Wang, H., Redl, S., Winzer, K., y Minton, N. P. (2012). Targeted mutagenesis of the Clostridium acetobutylicum acetone–butanol–ethanol

- fermentation pathway. *Metabolic Engineering*, 14(6), 630-641. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2012.09.001>
- Crueger, W., y Crueger, A. (1989). *Biotechnology: a Textbook of Industrial Microbiology* (T. D. Brock Ed. 2nd ed.). Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- Dabrock, B., Bahl, H., y Gottschalk, G. (1992). Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl Environ Microbiol*, 58(4), 1233-1239.
- Demain, A. (2009). Biosolutions to the energy problem. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, 36(3), 319-332. doi: 10.1007/s10295-008-0521-8
- Dong, H., Tao, W., Dai, Z., Yang, L., Gong, F., Zhang, Y., y Li, Y. (2012). Biobutanol. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 128, 85-100. doi: 10.1007/10_2011_128
- Durán-Padilla, V. R., Davila-Vazquez, G., Chávez-Vela, N. A., Tinoco-Valencia, J. R., y Jáuregui-Rincón, J. (2014). Iron effect on the fermentative metabolism of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using cheese whey as substrate. *Biofuel Research Journal*, 1(4), 129-133.
- Dürre, y Hollergschwandner. (2004). Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Anaerobe*, 10(2), 69-74. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2003.11.001>
- Dürre, P. (1998). New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(6), 639-648. doi: 10.1007/s002530051226
- Dürre, P. (2011). Fermentative production of butanol - the academic perspective. *Current Opinión in Biotechnology*, 22(3), 331-336. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.010>
- EIA, U. S. (2010). *International Energy Outlook 2010* (U. S. E. I. Administration Ed. 1° ed.). Washington DC, USA: U.S. Energy Information Administration.
- Eisenstark, A. (1998). Bacterial gene products in response to near-ultraviolet radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 422(1), 85-95. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00178-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00178-X)
- Ennis, B. M. (1987). *Intensification of the acetone, butanol, ethanol fermentation using whey permeate and Clostridium acetobutylicum: a preliminary study*. (Doctor of Philosophy in Biotechnology), Massey University, Massey University Library Virtualized Documents. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10179/2805>

- Ennis, B. M., y Maddox, I. S. (1989). Production of solvents (ABE fermentation) from whey permeate by continuous fermentation in a membrane bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 4(1), 27-34. doi: 10.1007/BF00612667
- Evans, P. J., y Wang, H. Y. (1988). Enhancement of Butanol Formation by *Clostridium acetobutylicum* in the Presence of Decanol-Oleyl Alcohol Mixed Extractants. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7), 1662-1667.
- Ezeji, T., y Blaschek, H. P. (2008). Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. *Bioresour Technol*, 99(12), 5232-5242. doi: 10.1016/j.biortech.2007.09.032
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., y Blaschek, H. P. (2004). Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by arrastre con gas. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(6), 653-658. doi: 10.1007/s00253-003-1400-x
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., y Blaschek, H. P. (2007). Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 220-227. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.002>
- Foda, M. I., Joun, H., y Li, Y. (2010). Study the Suitability of Cheese Whey for Bio-Butanol Production by Clostridia. *Journal of American Science*, 6(8), 39-46.
- Formanek, J., Mackie, R., y Blaschek, H. P. (1997). Enhanced Butanol Production by *Clostridium beijerinckii* BA101 Grown in Semidefined P2 Medium Containing 6 Percent Maltodextrin or Glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2306-2310.
- Gayán, E., Álvarez, I., y Condón, S. (2013). Inactivation of bacterial spores by UV-C light. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 19(0), 140-145. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.007>
- Gheshlaghi, R., Scharer, J. M., Moo-Young, M., y Chou, C. P. (2009). Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*, 27(6), 764-781. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.002>
- Gil-Zamora, M. (2007). Industrialización de Proteínas del Lactosuero. *ReCiTeIA: Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*, 7, 3-25.
- Groot, W. J., Lans, R. G. J. M., y Luyben, K. C. A. M. (1989). Batch and continuous butanol fermentations with free cells: integration with product recovery by gas-stripping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 305-308. doi: 10.1007/BF00184979

- Ha, S. H., Mai, N. L., y Koo, Y.-M. (2010). Butanol recovery from aqueous solution into ionic liquids by liquid–liquid extraction. *Process Biochemistry*, 45(12), 1899-1903. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.030>
- Himmel, M. E., Ding, S.-Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., y Foust, T. D. (2007). Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*, 315(5813), 804-807. doi: 10.1126/science.1137016
- Hutkins, R. W., y Kashket, E. R. (1986). Phosphotransferase Activity in *Clostridium acetobutylicum* from Acidogenic and Solventogenic Phases of Growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1121-1123.
- Jang, Y.-S., Malaviya, A., Cho, C., Lee, J., y Lee, S. Y. (2012). Butanol production from renewable biomass by clostridia. *Bioresource Technology*, 123(0), 653-663. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.104>
- Jones, D. T. (2011). Biobutanol. *Encyclopedia of Life Support Systems*, VI(17), 37.
- Kraemer, K., Harwardt, A., Bronneberg, R., y Marquardt, W. (2011). Separation of butanol from acetone–butanol–ethanol fermentation by a hybrid extraction–distillation process. *Computers y Chemical Engineering*, 35(5), 949-963. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compchemeng.2011.01.028>
- Kumar, M., y Gayen, K. (2012). Biobutanol: The Future Fuel. In C. Baskar, S. Baskar, y R. S. Dhillon (Eds.), *Biomass Conversion* (pp. 221-236): Springer Berlin Heidelberg.
- Köpke, M., Noack, S., y Dürre, P. (2011). The Past, Present, and Future of Biofuels – Biobutanol as Promising Alternative. *Biofuel Production - Recent Developments and Prospects*(18), 451-453. doi: 10.5772/20113
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., y Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by clostridia *Biotechnology and Bioengineering* Volume 101, Issue 2. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209-228. Retrieved from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.22003/abstract>
- Li, T., Yan, Y., y He, J. (2014). Reducing cofactors contribute to the increase of butanol production by a wild-type *Clostridium* sp. strain BOH3. *Bioresource Technology*, 155(0), 220-228. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.089>
- Lin, Y.-L., y Blaschek, H. P. (1983). Butanol Production by a Butanol-Tolerant Strain of *Clostridium acetobutylicum* in Extruded Corn Broth. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(3), 966-973.

- Liu, D., Chen, Y., Ding, F.-Y., Zhao, T., Wu, J.-L., Guo, T., . . . Ying, H.-J. (2014). Biobutanol production in a *Clostridium acetobutylicum* biofilm reactor integrated with simultaneous product recovery by adsorption. *Biotechnology for Biofuels* 7(1), 1-13. doi: 10.1186/1754-6834-7-5
- Liyanage, H., Young, M., y Kashket, E. R. (2000). Butanol Tolerance of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 Associated with Down-Regulation of *gldA* by Antisense RNA. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(1), 87-93.
- Machado, C. (2010). *Características y estado actual de la producción de butanol como biocombustible*. Paper presented at the V Seminario Latinoamericano y del Caribe de Biocombustibles, Santiago, Chile. http://www.olade.org/biocombustibles/Documents/Ponencias%20Chile/Sesion%205_C%20Machado_Enbrapa_Brasil.pdf
- Maddox, I. S. (1980). Production of n-butanol from whey filtrate using *clostridium acetobutylicum* N.C.I.B. 2951. *Biotechnology Letters*, 2(11), 493-498. doi: 10.1007/BF00129545
- Mao, S., Luo, Y., Bao, G., Zhang, Y., Li, Y., y Ma, Y. (2011). Comparative analysis on the membrane proteome of *Clostridium acetobutylicum* wild type strain and its butanol-tolerant mutant. *Molecular BioSystems*, 7(5), 1660-1677. doi: 10.1039/C0MB00330A
- Menéndez-Pérez, E. (2001). *Energías renovables, sustentabilidad y creación de empleo*. (L. Catarata Ed. 1° ed.). Madrid, España.
- Nair, R. V., y Papoutsakis, E. T. (1994). Expression of plasmid-encoded *aad* in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production. *Journal of Bacteriology*, 176(18), 5843-5846.
- Napoli, F., Olivieri, G., Marzocchella, A., y Salatino, P. (2008). *Assessment of Kinetics for Butanol Production by Clostridium acetobutylicum*. Paper presented at the Industrial Biotechnology International Conference, Italy.
- Napoli, F., Olivieri, G., Marzocchella, A., y Salatino, P. (2009). Bioenergy II: An Assessment of the Kinetics of Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum*. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 7(1), 1542-1549. doi: 10.2202/1542-6580.1911,
- Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M., Marzocchella, A., y Salatino, P. (2010). Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a continuous packed bed reactor. *Journal*

- of *Industrial Microbiology y Biotechnology*, 37(6), 603-608. doi: 10.1007/s10295-010-0707-8
- Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M. E., y Marzocchella, A. (2009). *Production of Biobutanol by Clostridium acetobutylicum*. Paper presented at the Combustion Colloquia, 32nd meeting on Combustion, Napoli, Italy.
- Ni, Y., y Sun, Z. (2009). Recent progress on industrial fermentative production of acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(3), 415-423. doi: 10.1007/s00253-009-2003-y
- Niemistö, J., Saavalainen, P., Isomäki, R., Kolli, T., Huuhtanen, M., y Keiski, R. L. (2013). Biobutanol Production from Biomass. In V. K. Gupta y M. G. Tuohy (Eds.), *Biofuel Technologies* (pp. 443-470): Springer Berlin Heidelberg.
- Nigam, P. S., y Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52-68. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V., Makarova, K. S., Zeng, Q., Gibson, R., . . . Smith, D. R. (2001). Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, 183(16), 4823-4838. doi: 10.1128/JB.183.16.4823-4838.2001
- Oudshoorn, A., van der Wielen, L. A. M., y Straathof, A. J. J. (2009). Assessment of Options for Selective 1-Butanol Recovery from Aqueous Solution. *Industrial y Engineering Chemistry Research*, 48(15), 7325-7336. doi: 10.1021/ie900537w
- Parekh, M., y Blaschek, H. (1999). Butanol production by hypersolvent-producing mutant *Clostridium beijerinckii* BA101 in corn steep water medium containing maltodextrin. *Biotechnology Letters*, 21(1), 45-48. doi: 10.1023/A:1005406120874
- Patakova, P., Maxa, D., Rychtera, M., Linhova, M., Fribert, P., Muzikova, Z., . . . Melzoch, K. (2011). Perspectives of Biobutanol Production and Use. *Biofuel's Engineering Process Technology*(11), 243-261. doi: 10.5772/16464
- Peguín, S., y Soucaille, P. (1995). Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition. *Appl Environ Microbiol*, 61(1), 403-405.
- Picazo-Espinosa, R., González-López, J., y Manzanera, M. (2011). Bioresources for Third-Generation Biofuels. *Biofuel's Engineering Process Technology*(6), 115-133. doi: 10.5772/961

- Päkkilä, J. M., Hillukkala, T., Myllykoski, L., y Keiski, R. L. (2009). *An anaerobic bioreactor system for biobutanol production*. Paper presented at the Energy research at the University of Oulu. Proceedings of the EnePro conference, University of Oulu, Finland.
- Pérez-Mancilla, X., y Montoya-Castaño, D. (2013). Formación de endoesporas en *Clostridium* y su interacción con el proceso de solventogénesis. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 180-188.
- Qureshi, N., y Blaschek, H. P. (2000). Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA101 hyper-butanol producing mutant strain and recovery by pervaporation. *Appl Biochem Biotechnol*, 84-86, 225-235.
- Qureshi, N., y Blaschek, H. P. (2001). Recovery of butanol from fermentation broth by arrastre con gas. *Renewable Energy*, 22(4), 557-564. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-1481\(00\)00108-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-1481(00)00108-7)
- Qureshi, N., Hughes, S., Maddox, I. S., y Cotta, M. A. (2005). Energy-efficient recovery of butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27(4), 215-222. doi: 10.1007/s00449-005-0402-8
- Qureshi, N., y Maddox, I. S. (1990). Integration of continuous production and recovery of solvents from whey permeate: use of immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* in a fluidized bed reactor coupled with arrastre con gas. *Bioprocess Engineering*, 6(1-2), 63-69. doi: 10.1007/BF00369279
- Qureshi, N., y Maddox, I. S. (2005). Reduction in Butanol Inhibition by Perstraction: Utilization of Concentrated Lactose/Whey Permeate by *Clostridium acetobutylicum* to Enhance Butanol Fermentation Economics. *Food and Bioproducts Processing*, 83(1), 43-52. doi: <http://dx.doi.org/10.1205/fbp.04163>
- Rajchenberg-Ceceña, E., Rodríguez-Ruiz, J. A., Juárez López, K., Martínez Jiménez, A., y Morales Arrieta, S. (2009). Producción Microbiológica de Butanol. *BioTecnología*, 13, 26-37.
- Ranjan, A., y Moholkar, V. S. (2009). *Biobutanol: a Viable Gasoline Substitute through ABE Fermentation*. Paper presented at the International Conference on Energy and Environment, Chandigarh, India.
- Ravagnani, A., Jennert, K. C. B., Steiner, E., Grünberg, R., Jefferies, J. R., Wilkinson, S. R., . . . Young, M. (2000). Spo0A directly controls the switch from acid to solvent production in solvent-forming clostridia *Molecular Microbiology* Volume 37, Issue 5.

- Molecular Microbiology*, 37(5), 1172-1185. Retrieved from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.2000.02071.x/abstract>
- Ren, C., Gu, Y., Hu, S., Wu, Y., Wang, P., Yang, Y., . . . Jiang, W. (2010). Identification and inactivation of pleiotropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*. *Metabolic Engineering*, 12(5), 446-454. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2010.05.002>
- Sabra, W., Groeger, C., Sharma, P. N., y Zeng, A.-P. (2014). Improved n-butanol production by a non-acetone producing *Clostridium pasteurianum* DSMZ 525 in mixed substrate fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-10. doi: 10.1007/s00253-014-5588-8
- SAGARPA. (2011). Qué son los biocombustibles. Retrieved Marzo 26, 2014, from www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/introduccion/que-son-los-biocombustibles.html
- Sancho García, J., Miró Herrero, R., y Gallardo Bermell, S. (2006). *Gestión de la energía* (E. d. I. U. P. d. Valencia Ed. 1° ed.). Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Schmeisser, F., Brannigan, J. A., Lewis, R. J., Wilkinson, A. J., Youngman, P., y Barák, I. (2000). A new mutation in spo0A with intragenic suppressors in the effector domain FEMS Microbiology Letters Volume 185, Issue 2. *FEMS Microbiology Letters*, 185(2), 123-128. Retrieved from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09049.x/abstract>
- Seader, J. D., Henley, E. J., y Roper, K. (2010). *Separation Process Principles: Chemical and Biochemical Operations* (J. W. a. Sons Ed. 3rd ed.). New York, USA: Jhon Wiley y Sons.
- Shao, L., Hu, S., Yang, Y., Gu, Y., Chen, J., Yang, Y., . . . Yang, S. (2007). Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*. *Cell Res*, 17(11), 963-965. doi: <http://www.nature.com/cr/journal/v17/n11/supinfo/cr200791s1.html>
- Shapovalov, O. I., y Ashkinazi, L. A. (2008). Biobutanol: Biofuel of second generation. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 81(12), 2232-2236. doi: 10.1134/S1070427208120379
- Silva, E., Montoya, D., Buitrago, G., Daza, G., Torres, J. C., y Romero, H. (1995). Fermentación Acetobutilica (ABE) con Células Inmovilizadas de *Clostridium acetobutylicum*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 23, 64-69.

- Smith, J. E. (2009). *Biotechnology* (C. U. Press Ed. 5th ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Stark, D., y von Stockar, U. (2003). In situ product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 80, 149-175.
- Steen, E., Chan, R., Prasad, N., Myers, S., Petzold, C., Redding, A., . . . Keasling, J. (2008). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol %U <http://www.microbialcellfactories.com/content/7/1/36>. *Microbial Cell Factories*, 7 %@ 1475-2859(1 %M doi:10.1186/1475-2859-7-36), 36.
- Steiner, E., Dago, A. E., Young, D. I., Heap, J. T., Minton, N. P., Hoch, J. A., y Young, M. (2011). Multiple orphan histidine kinases interact directly with Spo0A to control the initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* Molecular Microbiology Volume 80, Issue 3. *Molecular Microbiology*, 80(3), 641-654. Retrieved from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2011.07608.x/abstract>
- Sumner, J. B. (1921). Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *Journal of Biological Chemistry*, 47, 5-9.
- Tashiro, Y., y Sonomoto, K. (2010). Advances in butanol production by clostridia. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Technology*, 2, 1383-1394.
- Thomas, L., Joseph, A., y Gottumukkala, L. D. (2014). Xylanase and cellulase systems of *Clostridium* sp.: An insight on molecular approaches for strain improvement. *Bioresource Technology*(158), 343-350. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.140>
- Valencia-Denicia, E., y Ramírez-Castillo, M. L. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Revista Elementos*, 16, 27-30.
- Vasileva, D., Janssen, H., Hönicke, D., Ehrenreich, A., y Bahl, H. (2012). Effect of iron limitation and fur gene inactivation on the transcriptional profile of the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology*, 158(Pt 7), 1918-1929. doi: 10.1099/mic.0.056978-0
- Wadrop, K. (2010). Biobutanol - a future fuel? *tce*, 36-39.
- Wang, L., Xia, M., Zhang, L., y Chen, H. (2014). Promotion of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 growth and acetone-butanol-ethanol fermentation by flavonoids. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(7), 1969-1976. doi: 10.1007/s11274-014-1619-y

- Wang, S., Zhang, Y., Dong, H., Mao, S., Zhu, Y., Wang, R., . . . Li, Y. (2011). Formic Acid Triggers the “Acid Crash” of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1674-1680. doi: 10.1128/AEM.01835-10
- Ward, O. P. (1991). *Biotecnología de la fermentación* (Acribia Ed. 1° ed.). Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Weizmann, C., y Rosenfeld, B. (1937). The activation of butanol-acetone fermentation of carbohydrates by *Clostridium acetobutylicum*. *Biochem J.*, 31(4), 619-639.
- Weizmann, C., y Rosenfeld, B. (1939). The specific nutritive requirements of *Clostridium acetobutylicum* (Wizmann). II. *Biochem J.*, 33(9), 1376-1389.
- Woodley, J. M., Bisschops, M., Straathof, A. J. J., y Ottens, M. (2008). Future directions for in-situ product removal (ISPR) Journal of Chemical Technology and Biotechnology Volume 83, Issue 2. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(2), 121-123. Retrieved from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.1790/abstract>
- Xue, C., Zhao, J., Lu, C., Yang, S.-T., Bai, F., y Tang, I. C. (2012). High-titer n-butanol production by *clostridium acetobutylicum* JB200 in fed-batch fermentation with intermittent arrastre con gas. *Biotechnology and Bioengineering* Volume 109, Issue 11. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(11), 2746-2756. Retrieved from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.24563/abstract>
- Xue, C., Zhao, J.-B., Chen, L.-J., Bai, F.-W., Yang, S.-T., y Sun, J.-X. (2014). Integrated butanol recovery for an advanced biofuel: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-12. doi: 10.1007/s00253-014-5561-6
- Zhang, Y., Chen, J., Yang, Y., y Jiao, R. (1996). Breeding of High-Ratio Butanol Strains of *Clostridium acetobutylicum* and Application to Industrial Production. *Industrial Microbiology*, 26(4), 1-6.
- Zheng, Y.-N., Li, L.-Z., Xian, M., Ma, Y.-J., Yang, J.-M., Xu, X., y He, D.-Z. (2009). Problems with the microbial production of butanol. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, 36(9), 1127-1138. doi: 10.1007/s10295-009-0609-9
- Zhu, L., Dong, H., Zhang, Y., y Li, Y. (2011). Engineering the robustness of *Clostridium acetobutylicum* by introducing glutathione biosynthetic capability. *Metabolic Engineering*, 13(4), 426-434. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2011.01.009>

ANEXOS

Anexo A: Artículo derivado del trabajo de tesis. “Iron effect on the fermentative metabolism of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using cheese whey as substrate”.



ANEXO A

Biofuel Research Journal 4 (2014) 129-133



Original Research Paper

Iron effect on the fermentative metabolism of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using cheese whey as substrate

Victoria Rosalía Durán-Padilla¹, Gustavo Davila-Vazquez², Norma Angélica Chávez-Vela¹, José Raquel Tinoco-Valencia³, Juan Jáuregui-Rincón^{1*}

¹ Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Av. Universidad 940 Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Aguascalientes, México.

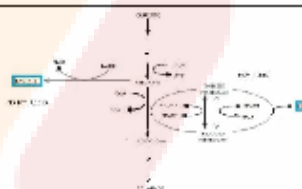
² Tecnología Ambiental, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.(CIATEJ), Normalitas 800, Colinas de La Normal, Guadalajara, Jalisco, México.

³ Escalamiento y Planta piloto, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 2001, Chamulpa, Cuernavaca, Morelos, México.

HIGHLIGHTS

- > Addition of iron was found essential to make cheese whey suitable for ABE fermentation.
- > Lack of ferredoxin led to lactic acid production instead of the desired substrate.
- > Addition of FeSO₄ improved butanol production by 65% compared to FeCl₃.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
 Received 10 October 2014
 Received in revised form 11 November 2014
 Accepted 11 November 2014
 Available online 1 December 2014

Keywords:
 Biobutanol
 Cheese whey
 ABE fermentation
 Ferredoxin
 Ferrous sulfate

ABSTRACT

Butanol is considered a superior liquid fuel that can replace gasoline in internal combustion engines. It is produced by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using various species of solventogenic clostridia. Performance of ABE fermentation process is severely limited mostly by high cost of substrate, substrate inhibition and low solvent tolerance; leading to low product concentrations, low productivity, low yield, and difficulty in controlling culture metabolism. In order to decrease the cost per substrate and exploit a waste generated by dairy industry, this study proposes using cheese whey as substrate for ABE fermentation. It was observed that the addition of an iron source was strictly necessary for the cheese whey to be a viable substrate because this metal is needed to produce ferredoxin, a key protein in the fermentative metabolism of *Clostridium acetobutylicum* serving as a temporary electron acceptor. Lack of iron in the cheese whey impedes ferredoxin synthesis and therefore, restricts pyruvate-ferredoxin oxidoreductase activity leading to the production of lactic acid instead of acetone, butanol and ethanol. Moreover, the addition of FeSO₄ notably improved ABE production performance by increasing butanol content (7.13 ± 1.53 g/L) by 65% compared to that of FeCl₃ (4.32 ± 0.94 g/L) under the same fermentation conditions.

© 2014 BRTeam. All rights reserved.

* Corresponding author at: Tel: +52 (449) 9107400
 E-mail address: jarego@correo.uaa.mx

Please cite this article as: Durán-Padilla V.R., Davila-Vazquez G., Chávez-Vela N.A., Tinoco-Valencia J.R., Jáuregui-Rincón J. Iron effect on the fermentative metabolism of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using cheese whey as substrate. Biofuel Research Journal 4 (2014) 129-133.

1. Introduction

Butanol is an important industrial chemical considered as a superior liquid fuel with a potential to replace gasoline (Jang et al., 2012). It can be produced from petroleum, mineral fuel and biomass; the latter is conveniently denoted as biobutanol although it has the same characteristics as butanol from petroleum (Shapovalov and Ashkinazi, 2008). Compared to ethanol, the traditional biofuel, butanol has the following advantages: a) higher energy content (29.2 MJ/L, very similar to that of gasoline: 32 MJ/L), b) vapor pressure 11 times lower than that of ethanol, and is therefore safer to use (Rajchenberg-Creola et al., 2009), c) non hygroscopic, d) less corrosive, e) can be applied in pure form or blended in any proportions with gasoline or diesel, f) can be used in any automobile engine without modifications, g) easy to preserve and distribute, h) can be used with the existing infrastructure (Rajchenberg-Creola et al., 2009; Tashiro and Sonomoto, 2010), i) heat of vaporization (0.43 MJ/Kg) slightly higher than that of gasoline (0.36 MJ/Kg) avoiding cold start problems (Ranjan and Moholkar, 2009), and j) at combustion, does not produce sulfur and nitrogen oxides, advantageous from the environmental viewpoint (Shapovalov and Ashkinazi, 2008). Furthermore, it can be converted to valuable chemical compounds: acrylate, methacrylate esters, glycol ethers, butyl acetate, and etc. (Tashiro and Sonomoto, 2010).

Butanol has traditionally been produced by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation of sugar substrates using various species of solventogenic clostridia. The fermentation occurs in two stages, the first is a growth stage in which acetic and butyric acids are produced and the second stage is characterized by acid re-assimilation into ABE solvents. During this stage, growth slows down, the cells accumulate granules and form endospores (Green, 2011). The regular ratio of ABE solvents produced by *C. acetobutylicum* is 3:6:1 with 20 g/L being the maximum concentration achieved so far (Ranjan and Moholkar, 2009). Performance of butanol fermentation process using solventogenic clostridia is severely limited by: a) high substrate costs, b) substrate inhibition, c) low solvent tolerance (max 20 g/L of solvent), d) sluggish growth, and e) low cell density achievable during solventogenic fermentation (Jang et al., 2012). These limitations result in low final butanol concentration caused by butanol inhibition, low butanol productivity due to low cell density, low yield due to hetero-fermentation and high downstream processing cost for butanol recovery (Tashiro and Sonomoto, 2010). Unless these limitations are addressed, biological production of butanol cannot compete economically with petrochemical synthesis of these solvents (Ghesblagh et al., 2009; Tashiro and Sonomoto, 2010; Coakley et al., 2012; Sâbra et al., 2014). Researchers have tried to solve these problems through various studies including: a) microbial strain development for improved butanol titer and tolerance, b) development of efficient *in situ* product recovery technologies to overcome the butanol toxicity to fermenting microorganisms, c) application of fermentation strategies to increase cell density, butanol titer, yield and productivity, and d) exploration of more economic alternative substrates (Jang et al., 2012).

The conventional ABE fermentation substrates include starch and molasses from maize, wheat, and rye. In order to reduce the cost of the product, a variety of more economic substrates have been tested including: sucrose (Parekh and Blaschek, 1999; Tashiro and Sonomoto, 2010), lignocellulosic biomass (Ranjan and Moholkar, 2009; Jang et al., 2012), domestic, agricultural and industrial waste (Jang et al., 2012; Niemistö et al., 2013), glycerol (exclusively in fermentations with *C. pasteurianum*) (Dabrock et al., 1992; Tashiro and Sonomoto, 2010; Jang et al., 2012; Sâbra et al., 2014), algal biomass (Ranjan and Moholkar, 2009; Jang et al., 2012), wheat straw, corn fiber, liquefied corn starch, apple pomace, Jerusalem artichokes (Ranjan and Moholkar, 2009), cheese whey (Maddox, 1980; Bahl et al., 1986; Ennis and Maddox, 1989; Ranjan and Moholkar, 2009), among others.

Solventogenic *Clostridium* species are capable of fermenting a wide range of carbohydrates; lignocellulosic biomass has been identified as a potential substrate for inexpensive production of ABE and other fine chemicals, however, bioconversion of lignocellulosic biomass is currently plagued by a number of limitations, notably generation of microbial inhibitory compounds during pretreatment and hydrolysis of lignocellulose to mixed sugars, and inefficient utilization of the generated mixed sugars by fermenting microorganisms due to carbon catabolite repression (Ezeji and Blaschek, 2008), therefore, other economic and readily utilizable substrates, whose

applications in fermentation do not require pretreatment, may prove to be a more cost-effective and efficient substrates than lignocelluloses.

Among the non-lignocellulosic substrates, cheese whey is the most widely researched for ABE production, mostly due to its abundance and high biological oxygen demand (BOD), which constitutes a major disposal problem to the dairy industry. Because of its relatively low sugar content (4-5% lactose) this waste is unsuitable for many fermentation processes without prior concentration, while considered satisfactory for the butanol fermentation where product toxicity limits the amount of sugar utilization (Maddox, 1980). All over the world cheese production and consumption has increased rapidly generating more wastes and consequently pollution problems, and this has increased the interest to use it for the production of fuels (Foda et al., 2010).

Previously published studies (Maddox, 1980; Bahl et al., 1986; Foda et al., 2010) characterize whey permeate as a substrate which can be used for ABE fermentation. In fact, Maddox (1980) and Bahl et al. (1986) described that lactose metabolism favors butanol production over acetone, adding economic incentives for butanol production. Other authors studied the specific effect of nutrient supplementation or limitation on the fermentative activity of *Clostridia*, including: iron (Bahl et al., 1986; Dabrock et al., 1992; Peguin and Soucaille, 1995; Vasileva et al., 2012), phosphate (Bahl et al., 1986; Dabrock et al., 1992), CO (Dabrock et al., 1992), ferredoxin substitutes (Peguin and Soucaille, 1995), flavonoids (Wang et al., 2014), reducing cofactors (Li et al., 2014), inter alia. However, fermentative conditions and nutritional requirements for optimal use of cheese whey have not been fully elucidated and further work is required.

Trying to recycle wastes of the local dairy industry, this study investigated the suitability of using cheese whey as fermentation broth for ABE production emphasizing on covering the nutritional requirements of *C. acetobutylicum*, especially iron supplementation (no iron, FeSO₄ and FeCl₃), for routing metabolism toward the production of the desired solvents.

2. Material and method

2.1. Strains and culture maintenance

C. acetobutylicum ATCC 824 was grown anaerobically at 37 °C for 48 h in the *C. acetobutylicum* medium as described by Atlas (2004) with modifications. The medium contained 40 g potato flakes, 6 g glucose, 2 g CaCO₃, 0.5 g L-cysteine, 1 mg resazurin and 15 g bacteriological agar, diluted to 1 L of distilled water, pH 7.0. Cultures were kept at 4 °C and reseeded into fresh media every 14 d.

2.2. Fermentation

Cheese whey was used as fermentation medium (lactose being the main carbon source with an initial concentration of approximately 55 g/L of reducing sugars). More specifically, it was first deproteinized followed by adjusting pH value to 5.2 with 1M HCl and autoclaving (14 psi-115 °C/15 min). The cold whey was then filtered through cheesecloth and filter paper (10 µm mesh) under sterile conditions. Yeast extract (5 g/L) and CaCO₃ (18 g/L) were added to the filtrate, and the pH value was readjusted to 7.0 using 1 M NaOH. Three sets of fermentation experiments were performed: Group 0: without added iron; Group FeSO₄: added with 20 mg/L Fe²⁺, supplemented as FeSO₄·7H₂O, and Group FeCl₃: added with 20 mg/L Fe³⁺, supplemented as FeCl₃·6H₂O. Prepared media was stored at 4°C. Anaerobiosis was achieved by sparging nitrogen to remove dissolved oxygen. Inocula were generated by seeding the bacteria in 80 mL of fermentation medium contained in 125 mL flasks covered with rubber septa and incubated under anaerobic conditions in an orbital shaker (125 rpm) at 37 °C for 72 h. After 72 h, the content of each flask was emptied into a fermentation bottle. One inoculum was required for each batch fermentation, which was carried out under anaerobic conditions using capped glass bottles of 500 mL, containing 320 mL of fresh media for a total fermentation volume of 400 mL. Fermentations were incubated at 37 °C in orbital shaking at 125 rpm for 7 d. A total of 3 fermentations were carried out per each tested condition. Samples were taken periodically every 12 or 24 h; a 2 mL sample of the broth was taken from each experiment using sterile syringes. The broth samples were

centrifuged at 11,920 ×g for 10 min in a micro17TR microcentrifuge (Hamil Science Industries, South Korea), the supernatant was then filtered through a 45 µm acetoclic (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Filtered samples were cooled and stored at 4 °C in sealed vials until analysis.

2.3. Analytical methods

2.3.1. Lactose concentration

Total sugar concentration was determined using dinitro salicylic acid (DNS) reagent (Summer, 1921) with lactose as standard.

2.3.2. pH

Direct measurement on the sample of culture broth at each sampling time was performed using a potentiometer pH/mV meter UBI-10 ultrabasic (Denver Instruments, Colorado, US).

2.3.3. Solvents and acids quantification

An HP 6890 series gas chromatograph (Hewlett Packard, California, US) equipped with a flame ionization detector (FID) and a HP-Innowax capillary column (30 m long, 0.53 mm Ø, 1.00 µm film) (Agilent J&W GC Columns, California, US) was used for solvents and acids quantification. For the assays, 1 µL of each sample was injected into the gas chromatograph, then heated from 60 to 150°C (10 °C/min) and maintained at 150 °C/5min. Injector and detector temperatures were maintained at 250°C. Gas injection was constant at 4 mL/min, and gas pressures were: He 60 psi, H₂ 40 psi, dry air 60 psi. Concentration of each product was calculated by integrating the area under the curve of the peak generated using the software Peak Simple 3.21® (SRI Instruments, California, US).

2.4. Statistical analyses

One-way ANOVA was performed to compare butanol and total ABE production using different iron sources. P<0.05 was considered as significant. LSD Multiple Range Tests (at 95.0 % confidence level) were performed to detect significant differences between the productive capacities. All analyses were performed using STATGRAPHICS Centurion XVII® (Statpoint Technologies, Virginia, US).

3. Results and discussion

Cheese whey fermentations supplemented with iron (Group FeSO₄ and Group FeCl₃) showed the typical behavior of a two-stage ABE fermentation (Fig. 1 and 2, respectively). On the first stage, lasting approximately 48 h, lactose uptake occurred and acetic and butyric acids were produced lowering the pH value until it was substantially constant around a value of 5.5. Between 48 and 60 h of fermentation the second stage started, diminishing lactose uptake and promoting re-assimilation of acids into the desired solvents: acetone, butanol and ethanol, reaching maximum solvents concentration after 168 h of fermentation.

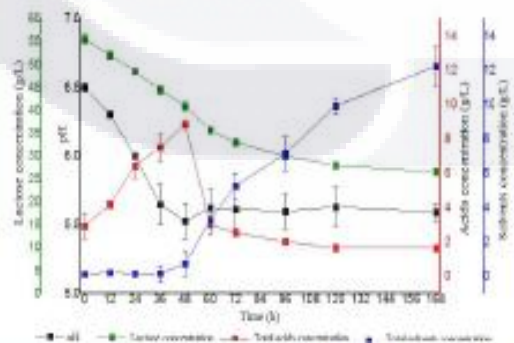


Fig.1. Time course profile of average pH value, lactose concentration, total acids (acetic and butyric) and total solvents (acetone, butanol and ethanol) production from Group FeSO₄ fermentations. Bars show standard deviation (n=3).

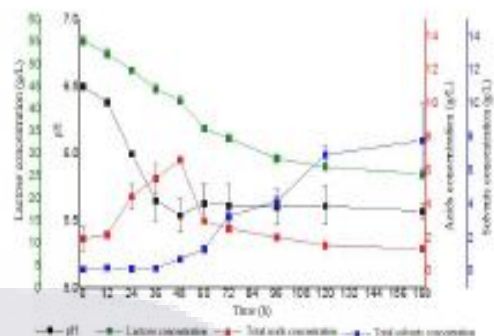


Fig.2. Time course profile of average pH value, lactose concentration, total acids (acetic and butyric) and total solvents (ABE) production from Group FeCl₃ fermentations. Bars show standard deviation (n=3).

The main product of the fermentation was butanol, followed by ethanol, and almost negligible amounts of acetone were detected in the fermentation broths. This could be ascribed to two facts: 1) it has been proved that the use of lactose as the carbon source favors butanol production over acetone (Maddox, 1980; Bald et al., 1986), and 2) culture conditions, specifically agitation and temperature (37 °C), promoted acetone volatilization making it difficult to detect in the culture broth.

Time required to complete the fermentation (7 d) and for inoculum preparation (72 h) was longer than that reported by Foda et al. (2010) (75 h) and Napoli et al. (2008) (96 h) due to the presence of citrate in the culture medium (~10 g/L). Citrate at high concentrations (> 2.5 g/L) inhibits *C. acetobutylicum* growth, the presence of citrate contributes to unusual prolonged time required to complete whey fermentation (Bald et al., 1986).

Group 0 fermentations did not show the typical two-stage behavior (Fig. 3). Lactose uptake occurred but acetic and butyric acid productions were remarkably low (less than 4.5 g/L combined), instead, substantial amounts of lactic acid were produced (5.49 ± 0.69 g/L) (Table 1). No re-assimilation of acids was observed but ethanol production occurred.

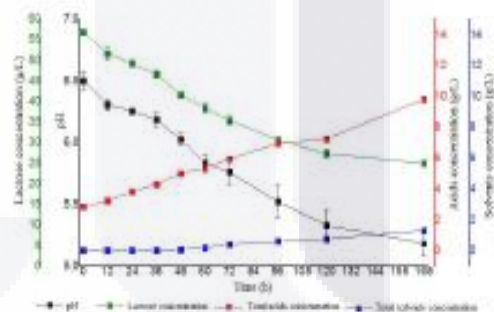


Fig.3. Time course profile of average pH value, lactose concentration, total acids (lactic, acetic and butyric) and total solvents (ABE) production from Group 0 fermentations. Bars show standard deviation (n=3).

These results differ from those presented by Maddox (1980), who claimed that using cheese whey supplemented only with yeast extract, *C. acetobutylicum* N.C.I.B. 2951 could produce up to 15 g/L of butanol while requiring 5 d to reach this maximum concentration. Also cheese whey without any supplementation could achieve a maximum butanol concentration of 13 g/L within 7 d. However, in later studies, Ennis and Maddox (1986), using a different strain of *C. acetobutylicum* (P262), prepared semi-synthetic media simulating cheese whey, supplemented

Please cite this article as: Durán-Padilla V.R., Davila-Vazquez G., Chávez-Vela N.A., Tinoco-Valencia J.R., Jáuregui-Rincón J. Iron effect on the fermentative metabolism of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using cheese whey as substrate. Biofuel Research Journal 4 (2014) 129-133.

with ferrous sulfate and other components, despite having yeast extract added, but no explanation for these additions were given.

Table 1.
Performance of ARE Fermentations (36 h).

Product	Group 0	Group Fe ²⁺	Group Fe ³⁺
Acetate (g/L)	2.61 ± 0.34	0.972 ± 0.08	1.44 ± 0.28
Butyrate (g/L)	1.70 ± 0.53	0.650 ± 0.12	1.27 ± 0.35
Lactate (g/L)	5.49 ± 0.69	Not detected	Not detected
Acetone (g/L)	0.04 ± 0.01	0.30 ± 0.06	0.31 ± 0.06
Butanol (g/L)	0.06 ± 0.10	1.13 ± 1.53	4.32 ± 0.84
Ethanol (g/L)	1.20 ± 0.10	5.11 ± 1.65	3.46 ± 1.37
Total solvents (g/L)	1.30 ± 0.21	12.24 ± 3.18	7.78 ± 2.30
Lactose utilization (%)	56.24 ± 0.65	52.28 ± 0.62	53.40 ± 0.60
ARE yield (g ARE/g lactose consumed)	0.04 ± 0.01	0.42 ± 0.10	0.25 ± 0.07
A.R.S. Ratio	0.31 0.46 9.23	0.5 5.97 4.13	0.5 5.61 4.39

Moreover, Bahl et al. (1986), Peguin and Soucaille (1995), and Vasileva et al. (2012) agree on the importance of iron in the fermentative metabolism of *C. acetobutylicum*, asserting that in an iron-deficient environment lactate was the main product obtained from the fermentation, observing no re-consumption of acetic and butyric acids.

As shown in Figure 4, *C. acetobutylicum* has the ability to break down lactose by hydrolyzing it into glucose and galactose which are then metabolized by the Embden Meyerhof Pathway (EMP) to generate pyruvate. Then pyruvate has to be oxidized to produce acetyl CoA which plays a central role in the metabolism of *C. acetobutylicum* as it serves as a precursor for the generation of all desired products. Oxidation of pyruvate occurs in a reaction that is coupled to the reduction of ferredoxin, using hydrogen as the ultimate electron acceptor. Sufficient iron is required to produce enough ferredoxin to complete this oxidation (Lee et al., 2008). In an iron deficient environment formation of molecular hydrogen does not take place and metabolism changes from pyruvate to lactate instead of producing acetyl CoA (Ghehligghi et al., 2009).

Bahl et al. (1986) indicated that limiting the amount of iron in the culture broth helped increase the proportion of butanol/acetone (from 2:1 to 8:1). They argued that ferrous ions had the most drastic effect on that ratio; however, at iron-limited conditions lactate became the main product, instead of producing acetate and butyrate, adversely affecting the amount, yield and productivity of butanol. Increasing the butanol/acetone proportion could facilitate the recovery and purification processes of the product, but iron-limitation backfires by decreasing the amount of butanol produced.

Moreover, Peguin and Soucaille (1995) suggest that limiting the available iron in glucose culture broths, using *C. acetobutylicum* ATCC824, helps modulate carbon and electron flows. For desirable fermentation results, a compound (methyl viologen) that replaces the functions of ferredoxin must be provided to the culture media, because ferredoxin could not be properly synthesized due to iron deficiency. By limiting the amount of iron present in the medium, dehydrogenase activity involved in the conversion of acetyl-CoA into β-hydroxybutyrate is limited. Methyl viologen function as a better substrate for ferredoxin-NAD(P)⁺ reductase than ferredoxin itself, creating an artificial electron transport chain. Both effects: reduction of the dehydrogenase activity and increase of ferredoxin-NAD(P)⁺ reductase activity made possible to obtain higher yields of butanol that those obtained with regular ARE fermentation, reaching a maximum 13 g/L butanol concentration. Nevertheless adding methyl viologen causes long lag growth phase affecting the fermentation productivity. Increasing the production of alcohols by limiting iron may sound favorable, but to be obligated to supplement compounds who can serve as electron acceptors to prevent the formation of lactate may be more costly for the process and more problematic for the recovery of products. In this paper, it has been shown that by adding adequate amounts of iron (20 mg/L) butanol production improvement could be achieved, favoring the desired normal behavior of the metabolic pathway.

Metabolic development of Group 0 fermentations demonstrate the effect of iron deficiency when cheese whey is used as substrate, effect that was not observed by Napoli et al. (2008) while they also worked with synthetic

lactose medium simulating cheese whey enriched with yeast extract and CaCO₃ and without any additional iron source, reporting the typical two-stage ARE fermentation behavior with a 3 g/L butanol production and no lactate detected, results that were reproduced in our laboratory too (data not shown).

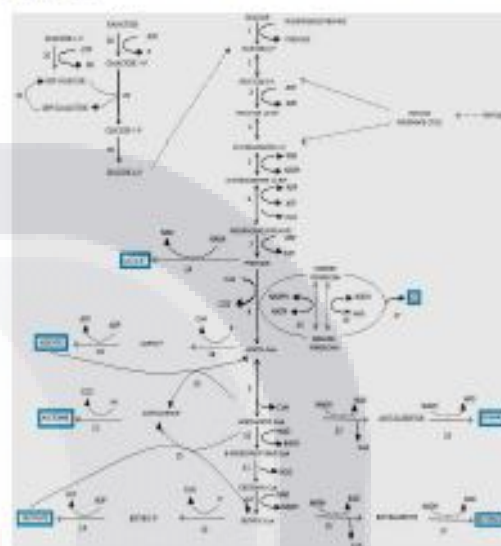


Fig. 4. Metabolic pathways of glucose and galactose in *C. acetobutylicum*. Extracellular products are highlighted in blue boxes. Numbers indicate the enzymes involved: 1: phosphoenolpyruvate carboxylase; 2: glucose-6-phosphate isomerase; 3: phosphofructokinase; 4: aldolase; 5: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; 6: phosphoglycerate kinase; 7: pyruvate kinase; 8: pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; 9: thiolase; 10: β-hydroxybutyryl CoA dehydrogenase; 11: acetoinase; 12: butyryl-CoA dehydrogenase; 13: phosphotransbutyrylase; 14: butyrate kinase; 15: acetoacetyl-CoA Butyrate-CoA transferase; 16: butyryldehyde dehydrogenase; 17: butanol dehydrogenase; 18: phosphotransacetylase; 19: acetate kinase; 20: acetoacetyl-CoA acetate-CoA transferase; 21: acetoacetyl deacetylase; 22: acetaldehyde dehydrogenase; 23: ethanol dehydrogenase; 24: lactate dehydrogenase; 25: ferredoxin-NADP reductase NADPH-ferredoxin oxidoreductase; 26: ferredoxin-NAD reductase NADH-ferredoxin oxidoreductase; 27: ferredoxin hydrogenase; 28: galactokinase; 29: UDP-glucose glucose-1-P acetyl transferase; 30: phosphoglucomutase; 31: UDP-galactose epimerase; 32: UDP-glucose phosphorylase.

In fact, yeast extract contains iron in amounts up to 20 mg/100 g that may be sufficient to produce enough ferredoxin for sorting of metabolism to the production of acetyl CoA and later generation of acetone, ethanol and butanol when it is added to a synthetic fermentation media; but, when cheese whey is used an extra amount of iron is necessary because of the presence of lactoferrin (20- 200 µg/ml) (Law and Reiter, 1977), an iron-binding protein that binds to iron reversibly with a high affinity. This blocks iron and impedes ferredoxin formation and, therefore, restricts solvents production.

The fermentation performance of each group is summarized in Table 1. Analyses of variance were conducted to assess whether the factor studied (iron source) had an effect on ARE production. LSD Multiple Range Test was conducted to assess which fermentation condition tested was better than the others in order to obtain a higher butanol concentration and higher total solvents production, being butanol as the main product. One way ANOVA indicated statistically significant differences in the production of total solvents between fermentations with added iron and un-supplemented ($p < 0.005$). Multiple range tests showed that the total production of solvents presents statistically significant difference between cheese whey without iron supplementation and the same substrate with an extra iron source, however, no statistically significant difference existed when comparing the two different iron sources i.e. FeSO₄ and FeCl₃.

Please cite this article as: Durán-Padilla V.R., Devila-Vazquez G., Chávez-Vela N.A., Tirsoco-Valencia J.R., Juárez-Rincón J. Iron effect on the fermentative metabolism of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using cheese whey as substrate. *Biofuel Research Journal 4 (2014) 129-133*.

Evaluating only butanol production, one way ANOVA indicated that there is a statistically significant difference between the total amount of butanol produced by each fermentation condition tested, ($p < 0.001$). LSD Multiple Range Test indicated that, for butanol production, there is statistically significant difference between the three groups. Both iron sources tested showed practically nil production of acetone; while butanol proportion was higher using $FeSO_4$ (0.0:5.87: 4.13) than $FeCl_3$ (0.0: 5.61: 4.39). Of particular interest is the fact that the use of $FeSO_4$ as iron source increased butanol production by 65% compared to what achieved by employing $FeCl_3$. This could be explained by the presence of iron and sulfur, both essential components of ferredoxin.

Additionally Group $FeSO_4$ showed higher ABE yield (0.42 ± 0.10) than Group $FeCl_3$ (0.25 ± 0.07), despite almost equal sugar consumptions. These results showed that sugar conversion to acids and acids recombination developed best when the iron source also included sulfur, under conditions tested.

These results showed that whey supplemented appropriately, can serve as a good substrate for ABE fermentation. Cheese whey is a readily available and widely-produced inexpensive substrate which requires low pretreatment to serve as fermentation substrate. These make it more economic than other substrates used such as lignocellulosic materials, algal biomass or different industrial and domestic wastes. Cheese whey tends to favor the production of butanol over acetone and therefore by improving fermentative conditions to fully utilize lactose in whey could lead ABE fermentation to economic competitiveness.

4. Conclusion

Cheese whey is a suitable substrate for ABE fermentation as long as it is properly prepared and supplemented. Addition of an iron source is strictly necessary for cheese whey to be a viable substrate and the lack of iron in cheese whey impedes ferredoxin synthesis and restricts pyruvate-ferredoxin oxidoreductase activity leading to the production of lactic acid instead of ABE. Furthermore, the addition of $FeSO_4$ improved butanol production by 65% reaching a concentration of 7.13 ± 1.53 g/L, compared to what obtained with $FeCl_3$ under the same fermentation conditions. This indicates that $FeSO_4$ is an ideal iron source for improving butanol production under conditions tested.

References

Atlas, R.M., 2004. *Handbook of Microbiological Media*, third ed. CRC Press, USA.

Bahl, H., Gottwald, M., Kubr, A., Rahe, V., Andersch, W., Gottschalk, G., 1986. Nutritional Factors Affecting the Ratio of Solvents Produced by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(1), 169-172.

Cockley, C.M., Zhang, Y., Wang, H., Roff, S., Wirtzer, K., Minton, N.P., 2012. Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway. *Metab. Eng.* 14(6), 630-641.

Dalrock B., Bahl, H., Gottschalk, G., 1992. Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (4), 1233-1239.

Ennis, B.M., Maddox, I.S., 1989. Production of solvents (ABE fermentation) from whey permeate by continuous fermentation in a membrane bioreactor. *Bioprocess. Eng.* 4, 27-34.

Eoqi, T.C., Blaschek, H., 2008. Fermentation of dried distillers soluble (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic Clostridia. *Bioresour. Technol.* 99(12), 5212-5242.

Foda, M.I., Jota, H., Li, Y., 2010. Study the Suitability of Cheese Whey for Bio-Butanol Production by Clostridia. *J. Arn. Sci.* 6(8), 8.

Ghoshlaghi, R., Schaer, J.M., Moo-Young, M., Chou, C.P., 2009. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnol. Adv.* 27(6), 764-781.

Green, E.M., 2011. Fermentative production of butanol: the industrial perspective. *Cur. Opin. Biotechnol.* 22(2), 337-343.

Jang, Y.S., Malviya, A., Cho, C., Lee, J., Lee, S.Y., 2012. Butanol production from renewable biomass by clostridia. *Bioresour. Technol.* 123, 653-663.

Law B.A., Reiter B., 1977. The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey. *J. Dairy Res.* 44 (3), 595-599.

Lee, S.Y., Park, J.H., Jung, S.H., Nielsen, I.K., Kim, J., Jung, K.S., 2008. Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnol. Bioeng.* 101(2), 209-228.

Li, T., Yan, Y., He, J., 2014. Reducing cofactors contribute to the increase of butanol production by wild-type *Clostridium* sp. Strain BOH3. *Bioresour. Technol.* 155, 220-228.

Maddox, I.S., 1980. Production of n-butanol from whey filtrate using *Clostridium acetobutylicum* N.C.I.B. 2951. *Biotechnol. Lett.* 2 (11), 493-498.

Napoli, F., Olivieri, G., Marzocchella, A., Salatino, P., 2008. Assessment of Kinetics for Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum*, in: Briens, C., Berruti, F., Al-Dahhan M. (Eds.), *Bioenergy-II: Fuels and Chemicals from Renewable Sources*. ECI Symposium Series, New York, pp. 10-17.

Niemistö, J., Saavalainen, P., Isorätki, R., Kalli, T., Huuhtanen, M., Keski, R.L., 2013. *Biobutanol Production from Biomass*, *Biofuel Technologies*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 443-470.

Parikh, M., Blaschek, H., 1999. Butanol production by hypersolvent-producing mutant *Clostridium beijerinckii* BA101 in corn steep water medium containing malto-dextrin. *Biotechnol. Lett.* 21(1), 45-48.

Paguin, S., Soucaille, P., 1995. Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(1), 403-405.

Rajchamborg-Caceres, E., Rodriguez-Rate, J.A., Azares, K., Martinez, A., Morales, S., 2009. *Producción Microbiológica de Butanol*. *Biotecnología*, 13, 26-37.

Ranjana, A., Moholkar, V.S., 2009. Biobutanol: a Viable Gasoline Substitute through ABE Fermentation. *Proc. World Acad. Sci. Eng. Technol.* 51, 497-503.

Sabra, W., Grogger, C., Sharma, P.N., Zeng, A.P., 2014. Improved n-butanol production by a non-acetone producing *Clostridium pasteurianum* DSMZ 525 in mixed substrate fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (9), 4267-4276.

Shapovalov, O.I., Ashkinazi, L.A., 2008. Biobutanol: Biofuel of Second Generation. *Russ. J. Appl. Chem.* 81 (12), 2232-2236.

Samner, J.B., 1921. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *J. Biol. Chem.* 47, 5-9.

Tashiro, Y., Sonomoto, K., 2010. Advances in butanol production by clostridia, in: Mendez-Villas, A. (Ed.), *Current Research, Technology Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Technology*. Formate Research Center, Spain, pp.1383-1394.

Vasileva, D., Jansen, H., Hönicke, D., Elbertsch, A., Bahl, H., 2012. Effect of iron limitation and *far* gene inactivation on the transcriptional profile of the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology*, 158, 1918-1929.

Wang, L., Xia, m., Zhang, L., Chen, H., 2014. Promotion of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 growth and acetone-butanol-ethanol fermentation by flavonoids. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30(7), 1969-1976.

Please cite this article as: Durán-Padilla V.R., Devila-Varquez G., Chávez-Vela N.A., Tinoco-Valencia J.R., Juárez-Rincón J. Iron effect on the fermentative metabolism of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using cheese whey as substrate. *Biofuel Research Journal* 4 (2014) 129-133.