

**OPTIMIZACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA TEÓRICA Y MODELADO CINÉTICO DE
LA PRODUCCIÓN DE n-BUTANOL POR FERMENTACIÓN DE LA
GLUCOSA UTILIZANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

JOSÉ ANDRÉS PÉREZ MENDOZA
Ing. Químico

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

**OPTIMIZACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA TEÓRICA Y MODELADO CINÉTICO DE
LA PRODUCCIÓN DE n-BUTANOL POR FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA
UTILIZANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

JOSÉ ANDRÉS PÉREZ MENDOZA
Ing. Químico

**Trabajo para optar por el título de
Magíster en Química**

Director:
PhD. Daniel Ricardo Molina Velasco

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014

DEDICATORIA:

A Dios porque puso la semilla a lo largo de este camino y a la Virgen María por su divina intervención.

A la memoria de mi padre Santiago Pérez Argüelles *“porque los grandes hombres dejan huellas imborrables, tú dejaste una que perdurará hasta la eternidad y yo como ebanista de la ciencia empiezo a tallar la mía”*.

A mi madre Socorro de Fátima Mendoza Durán por su apoyo constante e incondicional.

A mi esposa Martha Milena Madera Montiel cuya luz alumbra todo mi ser.

A mis hijos Julián Dalín y Manuel Antonio.

A mis hermanos María Cristina y Santiago Alberto.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todas las personas que a lo largo de la vida me han dejado una enseñanza.

Un agradecimiento especial para el doctor Daniel Ricardo Molina Velasco por su confianza y excelentes aportes para mi crecimiento profesional y personal.

A mis padres, hermanos y familia por su apoyo y motivación para continuar con firmeza soñando, realizando y alcanzando metas en la vida.

A los verdaderos amigos quienes siempre me respaldaron sobretodo en las dificultades.

Al ministerio de agricultura por el apoyo económico.

A la Universidad Industrial de Santander.

A las escuelas de Ingeniería Química y Química de la Universidad Industrial de Santander.

A los laboratorios de bioquímica y microbiología, biotecnología, bioprocesos y análisis instrumental de la Universidad Industrial de Santander.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO 1. MARCO DE REFERENCIA	18
1.1 GENERALIDADES.....	18
1.2 BIOQUÍMICA Y METABOLISMO DE <i>Clostridium acetobutylicum</i>	20
1.3 MODELADO ESTEQUIOMÉTRICO DEL METABOLISMO	25
1.4 MODELADO CINÉTICO DE LA FERMENTACIÓN	35
1.4.1 Modelado cinético no estructurado	36
1.4.2 Modelado cinético estructurado	39
1.5 CULTIVOS CELULARES	41
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA	48
2.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS MODELOS ESTEQUIOMÉTRICOS.....	49
2.1.1 Caso de estudio I. Construcción del modelo estequiométrico simplificado ..	49
2.1.1.1 Construcción de la ecuación estequiométrica simplificada	49
2.1.1.2 Construcción de la ecuación de biosíntesis de biomasa a partir de glucosa	53
2.1.1.3 Restricciones bioquímicas	54
2.1.1.3.1 Intermediarios del metabolismo	54
2.1.1.4 Balance de masa de carbono elemental.....	55
2.1.1.5 Balance de electrones.	56
2.1.1.6 Restricciones termodinámicas.	56
2.1.1.6.1 Estimación de la energía de Gibbs estándar de formación (ΔG°)..	56
2.1.1.7 Función objetivo.....	57
2.1.1.7.1 Caso de estudio IA. Maximización de n-butanol	57
2.1.1.7.2 Caso de estudio IB. Minimización de ATP.....	57
2.1.1.7.3 Caso de estudio IC. Minimización de ΔG°	57
2.1.2 Caso de estudio II. Construcción del modelo estequiométrico generalizado	58

2.1.2.1	Construcción de la ecuación estequiométrica generalizada	58
2.1.2.2	Restricciones bioquímicas	63
2.1.2.3	Restricciones termodinámicas	64
2.1.2.4	Restricciones Cinéticas.....	64
2.1.2.5	Función objetivo.....	65
2.1.3	Caso de estudio III. Construcción del modelo estequiométrico subespaciado.	65
2.1.3.1	Construcción de la ecuación estequiométrica subespaciada.....	65
2.1.3.1.1	Parte I. Optimización de la acidogénesis	65
2.1.3.1.1.1	Restricciones	65
2.1.3.1.1.2	Restricción termodinámica de eficiencia.....	65
2.1.3.1.1.3	Función objetivo.....	66
2.1.3.1.2	Parte II. Optimización del n-butanol.....	66
2.1.3.1.2.1	Restricciones termodinámicas adicionales	66
2.1.3.1.2.2	Acetato máximo	67
2.1.3.1.2.3	Butírate máximo.....	67
2.1.3.1.2.4	Reasimilación de acetato y butírate	67
2.1.3.1.2.5	Etanol mínimo.....	68
2.1.3.1.2.2	Función objetivo.....	69
2.2	SOLUCIÓN DEL MODELO ESTEQUIOMÉTRICO	69
2.3	SECCIÓN EXPERIMENTAL	70
2.3.1	Recuperación y medios de mantenimiento de la cepa <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824.....	70
2.3.2	Pruebas de fermentación preliminares.....	71
2.3.2.1	Procedimiento general del medio de cultivo de mantenimiento o preinóculo	71
2.3.2.2	Preparación medios de cultivo de fermentación	72
2.3.2.3	Medición de la concentración de biomasa	72
2.3.2.4	Medición de la concentración de glucosa	73
2.3.2.5	Medición de la concentración de productos.....	73

2.3.2.5.1	HPLC	73
2.3.3	Fermentación en un biorreactor de pruebas	73
2.3.3.1	Fermentación sin control de pH	74
2.3.3.2	Fermentación con control de pH	75
2.4	MODELADO CINÉTICO	76
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		77
3.1	ECUACIÓN DE BIOSÍNTESIS DE BIOMASA A PARTIR DE GLUCOSA.....	77
3.2	LÍMITES SUPERIORES DE LOS PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN ABE	78
3.3	CASO DE ESTUDIO I. MODELO ESTEQUIOMÉTRICO SIMPLIFICADO ..	80
3.4	CASO DE ESTUDIO II. MODELO ESTEQUIOMÉTRICO GENERALIZADO...	84
3.5	CASO DE ESTUDIO III. MODELO ESTEQUIOMÉTRICO SUBESPACIADO..	86
3.5.1	Parte I. Optimización de la acidogénesis	86
3.5.1.1	Modelo de la acidogénesis NADH abierto	86
3.5.1.2	Modelo de la acidogénesis NADH cerrado	90
3.5.2	Parte II. Optimización de la n-butanol	93
3.5.3	Validación del modelo subespaciado	103
3.6	RESULTADOS EXPERIMENTALES	107
3.6.1	Cultivo Batch sin control de pH	107
3.6.2	Cultivo Batch a pH 5 constante	109
3.7	MODELADO CINÉTICO	113
4.	CONCLUSIONES.....	117
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....		120
BIBLIOGRAFÍA.....		138
ANEXOS		156

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades de algunos alcoholes y gasolina como combustibles	18
Tabla 2. Cuadro comparativo de las ventajas de la n-butanol sobre el etanol como combustible	19
Tabla 3. Balance masa de la fermentación de <i>C. acetobutylicum</i>	29
Tabla 4. Parámetros cinéticos del modelo de inhibición	38
Tabla 5. Parámetros cinéticos del modelo de la acidogénesis	39
Tabla 6. Expresiones cinéticas para la ruta metabólica	41
Tabla 7. Comparación de rendimientos y productividad para diferentes procesos en la producción de ABE empleando <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	43
Tabla 8. Comparación de rendimientos y productividad para diferentes procesos en la producción de ABE empleando <i>C. acetobutylicum</i> P262 y <i>C. acetobutylicum</i> DMS 792	44
Tabla 9. Comparación de rendimientos y productividad para diferentes procesos en la producción de ABE empleando cepas de <i>C. acetobutylicum</i> y <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	45
Tabla 10. Comparación de rendimientos y productividad para diferentes procesos en la producción de ABE empleando cepas de <i>C. beijerinckii</i>	47
Tabla 11. Restricciones bioquímicas modelo estequiométrico generalizado	64
Tabla 12. Coeficientes de la ecuación bioquímica de biosíntesis de biomasa	77
Tabla 13. Límites superiores de los productos de la fermentación ABE	78
Tabla 14. Energías de Gibbs a condiciones estándar. Caso de estudio IC	81
Tabla 15. Resultados modelo simplificado y los casos de estudio IA, IB y IC	83
Tabla 16. Resultados caso de estudio II. Modelo estequiométrico generalizado ..	85
Tabla 17. Resultados del modelo de la acidogénesis NADH abierto	88
Tabla 18. Resultados del modelo de la acidogénesis NADH cerrado	90
Tabla 19. Resultados del modelo estequiométrico subespaciado	94
Tabla 20. Comparación entre la validación del modelo subespaciado y el modelo subespaciado IV	104

Tabla 21. Comparación de rendimientos de n-butanol para la principales cepas productoras de ABE	112
Tabla 22. Comparación de parámetros del modelo cinético estructurado	114

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ruta metabólica <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	21
Figura 2. Esquema de las diferentes metodologías y aplicaciones del modelado estequiométrico del metabolismo celular	27
Figura 3. Construcción y solución del Modelo a Escala del Genoma	32
Figura 4. Algoritmo metodológico	48
Figura 5. Esquema de la acidogénesis.	59
Figura 6. Esquema de la solventogénesis.	61
Figura 7. Montaje experimental del biorreactor de pruebas	75
Figura 8. Tendencia de los metabolitos de los modelos subespaciados	106
Figura 9. Producción de ABE a partir de glucosa utilizando <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 sin control de pH.....	108
Figura 10. Producción de ABE a partir de glucosa utilizando <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 a pH 5 constante.	110
Figura 11. Perfil experimental y simulado de la producción de ABE a partir de glucosa utilizando <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 a pH 5 constante.....	116

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo A. Reacciones de la ruta metabólica de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	156
Anexo B. Balance de electrones	164
Anexo C. Código de optimización para la solución de los diferentes modelos estequiométricos	168
Anexo D. Curva de calibración de biomasa y de medición de solventes por HPLC..	183
Anexo E. Balance de masa del modelo cinético estructurado y perfil experimental y simulado de la fermentación abe sin control de pH.....	187

RESUMEN

Título: Optimización estequiométrica teórica y modelado cinético de la producción de n-butanol por fermentación de la glucosa utilizando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.*

Autor: José Andrés Pérez Mendoza.**

Palabras claves: *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, n-butanol, modelo estequiométrico teórico, optimización, modelo cinético estructurado.

Resumen: En el presente trabajo de investigación se utilizó la ruta metabólica de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 para la optimización teórica de la producción de n-butanol y se emplearon datos a escala de laboratorio de la fermentación de la glucosa utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824; para calibrar un modelo cinético estructurado de la producción de n-butanol.

Se plantearon y solucionaron tres modelos estequiométricos teóricos denominados: modelo simplificado, generalizado y subespaciado. Los modelos se construyeron con base en el balance de masa de carbono, el balance de electrones, la función objetivo, restricciones bioquímicas, termodinámicas y/o cinéticas de la ruta metabólica y la ecuación de biosíntesis de biomasa de *C. acetobutylicum*.

GAMS y NEOS fueron los software utilizados para la optimización de los modelos estequiométricos. Los modelos simplificado y generalizado convergieron a la solución trivial de n-butanol y no proporcionaron información sobre la dinámica metabólica de los productos extracelulares. El modelo subespaciado inicialmente optimizó la acidogénesis, limitando la solución a cuatro estados termodinámicos (subespacios). La integración de los subespacios a la solventogénesis determinó que no todos fueron factibles para alcanzar un máximo teórico de n-butanol.

Los modelos subespaciados son pioneros y únicos en su especie para la optimización teórica de n-butanol sin ignorar la complejidad del metabolismo de *C. acetobutylicum*. Además poseen la capacidad predecir y explicar observables de las cepas productoras de n-butanol.

Finalmente, se realizaron pruebas en modo de operación Batch. En donde se fermentó la glucosa utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824 bajo dos escenarios: uno sin control de pH y otro a pH 5.0 constante. En el primero se alcanzó un mayor rendimiento de n-butanol y en el segundo una mayor concentración y productividad volumétrica de n-butanol. Estos datos experimentales fueron ajustados a un modelo cinético estructurado, obteniéndose buenos niveles de precisión en la simulación de la concentración de n-butanol.

* Trabajo de Maestría en química.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: PhD. Daniel Ricardo Molina Velasco.

ABSTRACT

Title: Optimization theoretical stoichiometric and kinetic modeling of n-butanol production by fermentation of glucose using *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

Author: José Andrés Pérez Mendoza.**

Keywords: *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, n-butanol, theoretical stoichiometric model, optimization, structured kinetic model.

Abstract: In the present study the metabolic pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 was used for theoretical optimization of the production of n-butanol. Data were also used in laboratory scale fermentation of glucose using *C. acetobutylicum* ATCC 824; calibrating a kinetic model structured production of n-butanol.

Were proposed three theoretical stoichiometric models called: simplified model, generalized and sub-spacing. All models were constructed based on the mass balance of carbon, electron balance, the objective function, biochemical, thermodynamic and/or kinetic constraints of the metabolic pathway and biosynthesis of biomass equation of *C. acetobutylicum* ATCC 824.

GAMS and NEOS software were used for optimization of stoichiometric models. The simplified and generalized models converged to the trivial solution of n-butanol and did not provide information on metabolic dynamics of the extracellular products. The sub-spacing models initially were optimized for the acidogenic stage, limiting the solution to four thermodynamically states (subspaces). The integration of the subspaces to solventogenic stage determined that not all were feasible to achieve a theoretical maximum of n-butanol.

The sub-spacing models are pioneers and one of a kind for the theoretical optimization of n-butanol without ignoring the complexity metabolism of *C. acetobutylicum*. They also have the ability to predict and explain observables producing strains of n-butanol.

Finally, tests were performed in batch mode. Where glucose was fermented by *C. acetobutylicum* ATCC 824 under two scenarios: one without pH control, and other with at pH 5.0. With the first were obtained higher yield of n-butanol was reached and the second a higher concentration and productivity of n-butanol. Experimental data were fitted to a structured kinetic model and achieved good levels of accuracy in simulating the concentration of n-butanol.

* Master's degree in Chemistry. .

** Faculty of Sciences, School of Chemistry. Director: PhD. Daniel Ricardo Molina Velasco.

INTRODUCCIÓN

Este trabajo de investigación de maestría, hace parte del proyecto financiado por el Ministerio de Agricultura titulado: **Aumento de la productividad del cultivo de la yuca en Santander, su utilización como materia prima para la obtención de bioetanol y biobutanol y estudio del proceso de transformación catalítica de bioetanol a butanol**. La propuesta contempla la identificación y evaluación de otras alternativas de aprovechamiento de productos y subproductos en la producción de bioetanol; y basándose en las múltiples ventajas del uso de butanol sobre etanol como combustible,¹ se consideran dos proyectos: estudiar la bioproducción de butanol por procesos de fermentación utilizando como materia prima la yuca y evaluar la síntesis catalítica de biobutanol a partir de bioetanol utilizando hidroxiapatitas.

En la actualidad hay un creciente interés en la investigación sobre la obtención de combustibles a partir de materia prima renovable (maíz, melaza, paja de trigo, papa, yuca, etc), principalmente por dos razones: la variabilidad de los precios y los efectos negativos sobre el ambiente de los combustibles fósiles. Por lo tanto, se han promovido y utilizado el etanol y el n-butanol como aditivos en combustibles fósiles con la finalidad de reducir las emisiones de contaminantes a la atmósfera.^{1,2,3}

Durante la primera mitad del siglo pasado el n-butanol era producido industrialmente por fermentación, pero este proceso no pudo competir económicamente y fue reemplazado por la síntesis petroquímica.^{1,2} En las últimas dos décadas se ha enfocado la investigación en procesos biológicos viables para la obtención de n-butanol, debido a su capacidad de ser utilizado directamente en

1 LEE, Sang Yup et al. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 101, No. 2. (October 1, 2008): p 209-228.

2 EZEJI, T. C.; QURESHI, N and BLASCHEK, H. P. *J Ind Microbiol Biotechnol*. Vol. 34. (2007): p 771-777.

3 QURESHI, Nasib et al. *Biosource Technology*. Vol. 99. (2008): p 5915-5922.

la gasolina como aditivo.^{1,2,4,5}

La producción de n-butanol por la vía fermentativa generalmente presenta problemas como: alto costo energético en el sistema de purificación, bajos rendimientos y bajas concentraciones de n-butanol.² Con el fin de establecer el límite máximo teórico del rendimiento de n-butanol, el presente trabajo de investigación estudió teóricamente su producción a partir de la glucosa incluyendo la complejidad del metabolismo de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Los resultados teóricos fueron validados con datos de la literatura. Posteriormente se realizaron pruebas experimentales donde se evaluó el comportamiento de la producción de n-butanol a través de un modelo cinético estructurado.

1 LEE, Sang Yup et al. Op. Cit., p. 16.

2 EZEJI, T. C; QURESHI, N and BLASCHEK, H. P. Op. Cit., p. 16.

4 LÜTKE-EVERLOH, Tina and BAHL, Hubert. Current opinion in Biotechnology. (2011): 22. p. 634-647.

5 EZEJI, T. C; QURESHI, N and BLASCHEK, H. P. Journal of Biotechnology. Vol. 115. (2005): p 179-187.

CAPÍTULO 1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 GENERALIDADES

Con el propósito de menguar los problemas causados por los combustibles fósiles como su agotamiento, la variabilidad de su precio y el impacto ambiental que han generado sobre el planeta (calentamiento global), se ha incrementado tanto la investigación como la producción de biocombustibles como el etanol y el butanol a partir de materias primas renovables.^{1,2,3}

En la tabla 1 se comparan las propiedades de algunos alcoholes con los de la gasolina. Se destaca que la n-butanol ofrece características superiores al etanol como combustible. Lee, Park, Jang, Nielsen, Kim y Jung (2008) afirman: “*El butanol tiene características similares a la gasolina y puede ser usado directamente en los motores de combustión sin necesidad de modificación alguna*”.¹ Además el n-butanol es empleado como solvente en la fabricación de vitaminas, antibióticos y hormonas.^{1,2}

Tabla 1. Propiedades de algunos alcoholes y gasolina como combustibles

Propiedades de combustibles	n-Butanol	Gasolina	Etanol	Metanol
Densidad energética (MJ/L)	29.2	32	19.6	16
Relación aire-combustible	11.2	14.6	9.0	6.5
Calor de vaporización (MJ/Kg)	0.43	0.36	0.92	1.2
Números de octanos de investigación	96	91-99	129	136
Números de octanos de motor	78	81-89	102	104

Tomado de: LEE, Sang Yup; PARK, Jin Hwan; JANG, Seh Hee; NIELSEN, Lars K; KIM; Jaehyun and JUNG, Kwang S. Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 101, No. 2. (2008): p. 209-228.

1 LEE, Sang Yup et al. Op. Cit., p.16.

2 EZEJI, T. C.; QURESHI, N and BLASCHEK, H. P. Op. Cit., p.16.

3 QURESHI, Nasib et al. Op. Cit., p. 16.

Adicionalmente, cuando el n-butanol es utilizado como biocombustible, ya sea puro o como aditivo, en la gasolina o el diésel posee otras ventajas significativas (tabla 2), entre ellas se puede resaltar que el n-butanol puede mezclarse con gasolina grado estándar o gasolina que contiene etanol debido a su baja presión de vapor.

Tabla 2. Cuadro comparativo de las ventajas de la n-butanol sobre el etanol como combustible

Propiedades	Butanol	Etanol
Solubilidad en agua	Baja	Higroscópico
Presión de Vapor	Baja	Alta (se evapora fácilmente)
Trasporte	En tuberías mezclado directamente con la gasolina.	No se puede enviar directamente por tuberías petroleras.
Reducción de Emisiones	HC 95%, CO 0.01% y NOx 37%	HC 24%, CO 37% y NOx 20%
Corrosión	Menos corrosivo	Más corrosivo

Tomado de: Green Biologics Ltda. [En línea, visitado el 10 de octubre 2011]

<http://www.greenbiologics.com/biobutanol-fuel.php> ⁶

En la producción biotecnológica de n-butanol a partir de materias primas renovables se han empleado microorganismos del género *Clostridium*, de las especies: *acetobutylicum*, *beijerinckii*, *saccharaperbutylaceticum* y *saccharobutylicum*. Estas bacterias generalmente son: gram positivas, estrictamente anaerobias, su crecimiento se favorece a pH ligeramente ácidos y a una temperatura de 37°C. Pueden metabolizar una gran variedad de sustratos como monosacáridos (principalmente glucosa) y polisacáridos que son convertidos en acetona, n-butanol y etanol.^{1,4}

⁶ Green Biologics Ltda. [En línea, visitado el 10 de octubre 2011] <http://www.greenbiologics.com/biobutanol-fuel.php>

¹ LEE, Sang Yup et al. Op. Cit., p. 16.

⁴ LÜTKE-EVERSLOH, Tina and BAHL, Hubert. Op. Cit., p. 17.

1.2 BIOQUÍMICA Y METABOLISMO DE *Clostridium acetobutylicum*

De las bacterias productoras de n-butanol, *Clostridium acetobutylicum* ha sido la más estudiada hasta la actualidad.⁷ La ruta metabólica elucidada para la producción de acetona, n-butanol y etanol (ABE) a partir de glucosa está representada en la figura ^{1, 8,9}.

La formación de ABE por fermentación de la glucosa en cultivos *batch* o discontinuos utilizando bacterias del género *Clostridium* se caracteriza por ser bifásica. Esta consiste en una fase llamada acidogénesis (color rojo figura 1) y otra solventogénesis (color azul figura 1).^{1,7,9,10}

Acidogénesis: en esta fase las células crecen exponencialmente, la glucosa o fuente de carbono se metaboliza para formar hidrógeno, dióxido de carbono y, ácidos acético, butírico y láctico. Como consecuencia de la producción de los ácidos se libera ATP y disminuye el pH del cultivo celular.^{1,7,9}

Solventogénesis: inicia al término del crecimiento exponencial y continúa hasta la fase de crecimiento estacionario. El ácido acético y butírico son reasimilados en paralelo al consumo de glucosa para finalmente formar los solventes ABE. En este punto la producción neta de ácidos cesa y como resultado de la reasimilación de los ácidos se presenta un leve incremento en el pH del cultivo celular.^{1,7,9}

En general, el cambio de la acidogénesis a la solventogénesis es un mecanismo de regulación y control metabólico, que se entiende como un proceso de desintoxicación celular debido a las altas concentraciones de acetato y butirato.^{11,12} A su vez estos ácidos son empleados como cosustratos para la

7 DÜRRE, Peter. Annals of the New York Academy of Sciences. 1125. (2008): p. 353-362.

8 PAPOUTSAKIS, Efetherios Terry. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXVI. (1984): p. 174-187.

9 JONES, David T and WOODS David R. Microbiological Reviews. Vol 50. No 4. (1986): p 484-524.

1 LEE, Sang Yup et al. Op. Cit., p. 16.

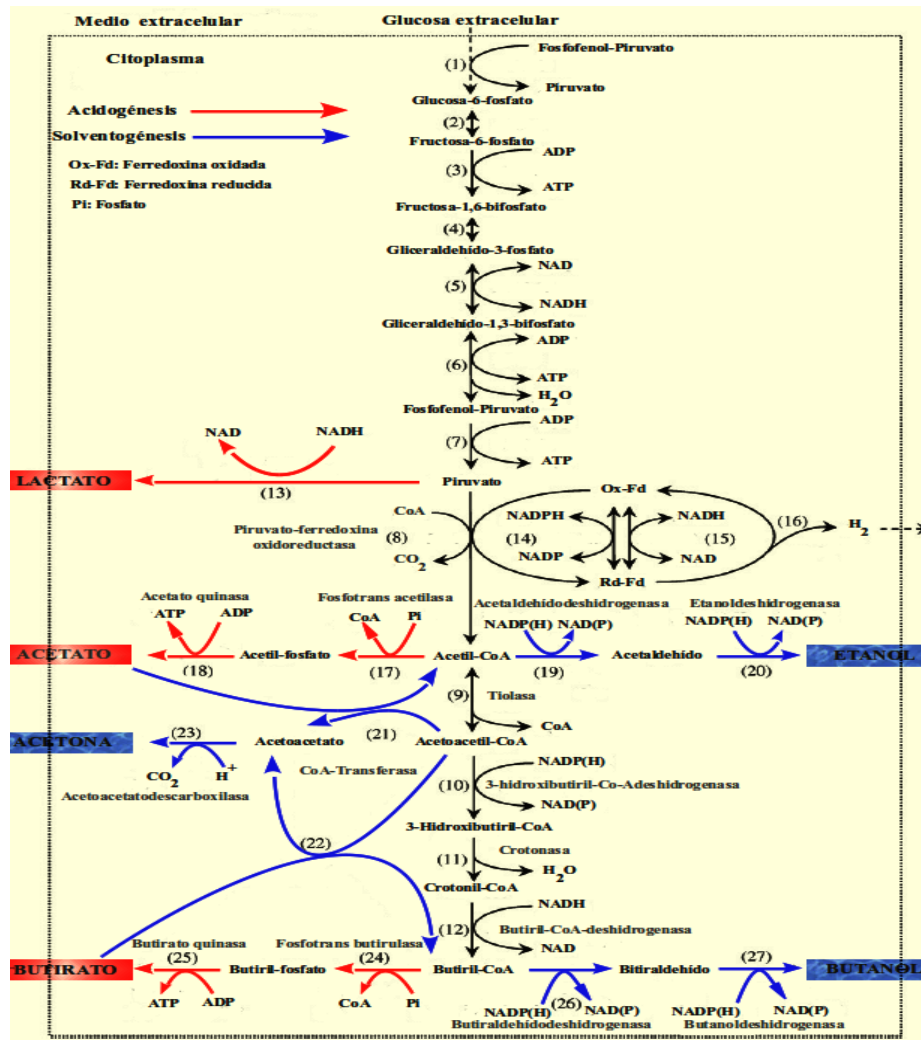
7 DÜRRE, Peter. Op. Cit., p. 19.

10 GHESLAGHI, R et al. Biotechnology Advances. Vol. 27 (2009): p. 764–781.

11 COSTA, JM. Proc Ann Biochem Eng Symp 11. (1981): p. 83-90. Citado por HARTMANIS, Maris G N; KLASON, Tomas y GATENBECK. Appl Microbiol Biotechnol. Vol 20. (1984): p. 66-71.

producción de los solventes ABE,^{13,14} que son menos tóxicos y por lo tanto estas condiciones son más favorables para la célula.

Figura 1. Ruta metabólica *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824



Adaptado de: GHESLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*. Vol. 27. (2009): p. 764-781.¹⁰

12 HERRERO, A. et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 22. (1985): p. 53-62. Citado por WIESENBORN, Dennis P; RUDOLPH, Frederick B and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. *Applied and environmental microbiology.* (1989): p. 323-329.
 13 KELL, DB. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol. 99 (1973): p. 81-8. Citado por: GHESLAGHI, R et al. *Biotechnology Advances*. Vol. 27 (2009): p. 764-781
 14 FOND, O et al. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 22 (1985): p. 195-200. Citado por: GHESLAGHI, R et al. *Biotechnology Advances*. Vol. 27 (2009): p. 764-781.
 10 GHESLAGHI, R et al. *Biotechnology Advances*. Vol. 27 (2009): p. 764-781.

La transición de la acidogénesis a la solventogénesis está inducida por varios factores fisiológicos interrelacionados de los cuales se pueden destacar: la fuente de carbono (glucosa), la concentración de ácido acético y butírico, la disminución del pH, la regulación de la producción de hidrógeno, etc.^{15,16,17} La célula inicialmente procede a la producción de los ácidos debido a la generación máxima de ATP,¹⁷ con el fin de suministrar la energía necesaria para el crecimiento y las funciones celulares.

Para entender la fenomenología de la producción de ABE se requiere una descripción detallada de la ruta metabólica de *C. acetobutylicum* (figura 1). Después de la glucólisis, el piruvato puede ser convertido a acetil-CoA o lactato por acción de las enzimas piruvato-ferredoxina oxidorreductasa y lactato deshidrogenasa respectivamente. Bajo condiciones normales de fermentación, el lactato no se produce o su cantidad es insignificante. Algunos autores han reportado que cuando la hidrogenasa de la producción de hidrógeno molecular es inhibida por CO; o el medio está limitado por hierro¹⁸ o sulfato¹⁹ se provoca la formación de lactato.⁹

Acetil-CoA, acetoacetil-CoA y butiril-CoA son intermediarios claves en la producción de los ácidos y solventes (figura 1). Durante la fase acidogénica el acetato se forma a partir del acetil-CoA y el butírate a partir del butiril-CoA. Las enzimas fosfotrans-acetilasa y acetato quinasa actúan en la formación del acetato, de manera análoga fosfotrans-butirilasa y butírate quinasa proceden en la síntesis de butírate. Una característica importante y común a ambas trayectorias es la

15 GRUPE, Helga and GOTTSCHALK, Gehard. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms (GIM 90), vol. II. Societ Francaise de Microbiologie, Strasbourg, France. (1990): p. 715-729.

16 GRUPE, Helga and GOTTSCHALK, Gehard. Applied and environmental microbiology. Vol. 58. No 12. (1992): p. 3896-3902.

17 TERRACCIANO, Joseph. and KASHKET, Eva. Applied and environmental microbiology. Vol. 52. No 1. (1986): p. 86-91.

18 BAHL, H. aand GOTTSCHALK G. Biotechnol Bioeng Symp. Vol 14 (1984): p. 215-23. Citado por: GHESLAGHI, R et al. Biotechnology Advances. Vol. 27 (2009): p. 764-781.

19 BAHL, H et al. Appl Environ Microbiol. Vol. 52 (1986): p. 169-72. Citado por: GHESLAGHI, R et al. Biotechnology Advances. Vol. 27 (2009): p. 764-781.

9 JONES, David T and WOODS David R. Op. Cit., p. 20.

generación de ATP.^{9,20}

La formación de solventes inicia con la reasimilación del acetato/butírate mediadas por las enzimas acetoacetil-CoA acetato/butírate CoA-transferasa y va acompañada implícitamente de la formación de acetona. Además, las actividades de la fosfotrans acetilasa, la acetato quinasa y la fosfotrans butirulasa disminuyen. Es decir que la producción neta de ácidos cesa.²¹ No todo el butírate reasimilado ocurre vía acetoacetil-CoA butírate CoA-transferasa sino también vía fosfotrans-butirulasa y butírate quinasa sin la concomitante producción de acetona.^{20,22}

La CoA-transferasa juega un papel indispensable en la síntesis de acetona y n-butanol, porque impulsa la regeneración del acetil-CoA y butiril-CoA. También produce acetoacetato; reciclando de esta manera el acetato, el butírate y el acetoacetil-CoA disponibles. La fuerza motriz de la CoA-transferasa es el trabajo realizado por la acetoacetato descarboxilasa en la síntesis irreversible de acetona, debido a que esta enzima induce la formación de acetoacetato.^{7,9,21}

Evidentemente, las acetil-CoA y butiril-CoA resultantes de la acción de la CoA-transferasa son intermediarios decisivos en la formación de etanol y n-butanol. La enzima acetaldehído deshidrogenasa actúa en la transformación del acetil-CoA a acetaldehído, igualmente butiraldehído deshidrogenasa de butiril-CoA a butiraldehído. La reducción de acetaldehído a etanol, asimismo que de butiraldehído a n-butanol, son catalizadas por la etanol deshidrogenasa y butanol deshidrogenasa respectivamente.^{7,9,20,21}

Las hidrogenasas mencionadas en el párrafo anterior más la 3-hidroxi-butiril-CoA-deshidrogenasa y la butiril-CoA-deshidrogenasa son NADH y/o NADP(H)

9 JONES, David T and WOODS David R. Op. Cit., p. 20.

20 DESAI, Ruchir P. et al. *Metabolic Engineering* 1. (1999): p. 206-213.

21 HARTMANIS, Maris G N; KLASON, Tomas y GATENBECK, Sten. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol 20. (1984): p. 66-71.

22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. *Journal of Biotechnology*. Vol. 71. (1999): p. 191-205.

7 DÜRRE, Peter. Op. Cit., p. 19.

dependientes, es decir que la producción de etanol y n-butanol requieren de poder reductor. El NADH formado en la glucólisis no es suficiente para satisfacer dicha demanda. El poder reductor adicional es proporcionado por el acople de las reacciones de oxidación reducción de la ferredoxina, las cuales están activadas por la NADH y NADP(H)-ferredoxina oxidorreductasa.^{9,23} En vista de la importancia de la ferredoxina en el metabolismo a continuación se mencionan los aspectos más relevantes en cada una de las reacciones en las que interviene.

La enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductasa cataliza la transformación de la Coenzima A (CoASH) y el piruvato proveniente de la glucólisis a acetil-CoA y CO₂. En esta reacción la ferredoxina pasa de la forma oxidada (OxFd) a la forma reducida (RdFd).⁹

La reducción de la ferredoxina por NADH/NAD(P)H está ligada a la NADH/NAD(P)H-ferredoxina oxidorreductasa cuya actividad solo fue significativa en la acidogénesis.²⁴ Esto puede atribuirse a la obligación de regenerar el NAD⁺ empleado en la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato^{9,25} y también para prevenir la acumulación de NADH, el cual tiene un ciclo catalítico corto en la glucólisis.

En la solventogénesis predomina la ferredoxina NAD/NAD(P) reductasa dada la alta demanda de NADH/NAD(P)H en la síntesis de etanol y n-butanol.²⁴ El ciclo de la ferredoxina finaliza con la producción de hidrógeno molecular por acción de la ferredoxina/hidrogenasa.⁹ Por lo tanto, la ferredoxina juega un papel indispensable en el transporte y distribución de los electrones en el metabolismo celular.

El entendimiento de la bioquímica y el metabolismo para la producción de n-butanol son requisitos primordiales en el éxito de la fermentación. Para alcanzar el

9 JONES, David T and WOODS David R. Op. Cit., p. 20.

23 TASHIRO, Yukihiro. et al. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 98. No. 4. (2004): p 263-268.

24 VASCONCELOS, Isabel. GIRBAL, Laurence and SOUCAILLE, Philippe. Journal of Bacteriology. Vol. 176. No. 3 (1994): p. 1443-1450.

25 JUNGERMANN, K. et al. Biochim Biophys Acta (1973): p. 268–80.

óptimo del n-butanol es necesario un profundo conocimiento teórico de las enzimas claves en la ruta metabólica, su actividad, control y regulación.¹⁰ En este sentido se han desarrollado y utilizado diversas herramientas con el propósito de optimizar el rendimiento y la productividad del n-butanol. La optimización de la producción de n-butanol puede clasificarse en dos grandes enfoques denominados: modelado estequiométrico y modelado cinético.

1.3 MODELADO ESTEQUIOMÉTRICO DEL METABOLISMO

La representación matemática del metabolismo celular se denomina modelado estequiométrico. Está basado en la estequiometría entre el sustrato (fuente de carbono), la biomasa, los intermediarios intracelulares y los productos extracelulares del sistema en estudio. Las relaciones estequiométricas normalmente se calculan a partir de las rutas metabólicas, los datos experimentales y los respectivos balances de masa.²⁶

La deducción del modelo estequiométrico se fundamenta en dos aspectos: el conocimiento de la ruta metabólica del microorganismo y la suposición de estado pseudoestacionario para los metabolitos intermediarios. En el primero, es importante definir la estequiometría de las reacciones y toda aquella información relevante sobre estas. En el segundo se ignora el flujo de los metabolitos intermediarios, basándose en que la dinámica intracelular es mucho más rápida que la extracelular. Lo anterior se ha justificado en que se ahorra el desarrollo de modelos cinéticos y además proporciona una herramienta útil para el análisis estructural del metabolismo.^{26,27}

La descripción matemática del metabolismo a partir del balance de masa de los

10 GHESLAGHI, R et al. Op. Cit., p. 20.

26 LLANERAS, Francisco y PICÓ, Jesús. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 105. (2008): p. 1-11.

27 STEPHANOPOULOS, Gregory N; ARISTIDOU, Aristos A. and NIELSEN, Jens. Metabolic Engineering: Principles and Metadologies. Academic Press. (1998): p. 25.

metabolitos intracelulares está representada por la ecuación 1.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = A * r - \mu * c \quad \text{Ec. 1}$$

donde $c=(c1,c2,...,cm)$ es la concentración de metabolitos intracelulares, $r=(r1,r2,...,rrn)$ es el flujo de metabolitos intracelulares, μ es la velocidad específica de crecimiento y A es una matriz de coeficientes estequiométricos de la ruta metabólica de dimensiones $m \times n$ (m , metabolitos y n , reacciones). Para cultivos celulares continuos el término $\mu * c$ generalmente es mucho menor que el flujo r ; o en cultivos discontinuos bajo la condición de estado pseudoestacionario la ecuación 1 se simplifica hasta la ecuación 2.

$$A * r = 0 \quad \text{Ec. 2}$$

La ecuación 2 materializa la capacidad de modelado de la ruta metabólica y define el espacio factible de solución. Diversas metodologías pueden emplearse para la solución del modelo estequiométrico, las cuales tienen un propósito diferente y específico.²⁶ En la figura 2 se presenta un resumen de las estrategias empleadas en la solución y algunas de las aplicaciones del modelado estequiométrico.

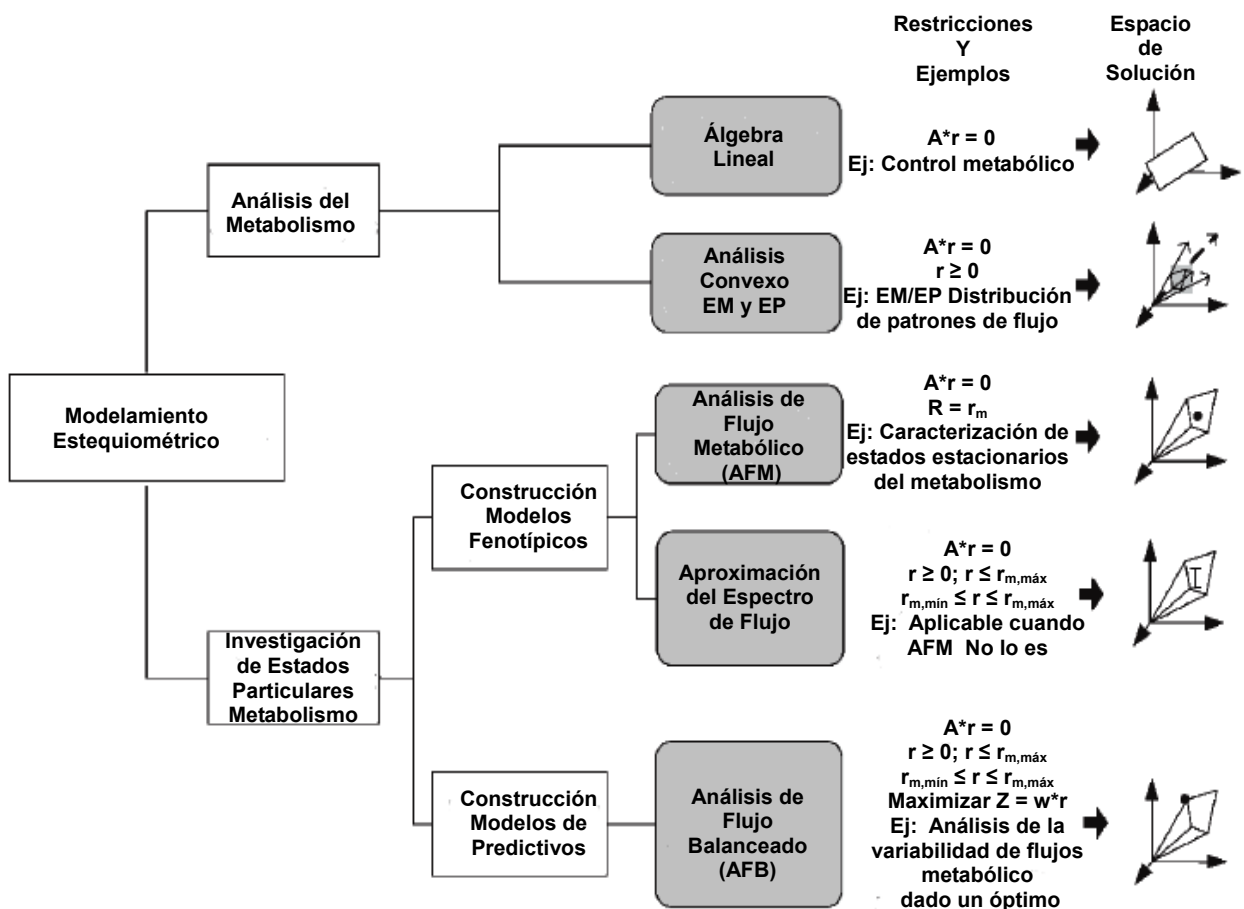
A pesar de que los modelos estequiométricos ignoran la dinámica intracelular, la dinámica extracelular como: el consumo de sustrato y la formación de productos extracelulares pueden considerarse sobre la misma base conceptual de la ecuación 2. De tal manera que bajo ciertas condiciones experimentales bien establecidas, la solución del modelo puede orientarse a la optimización o estimación de las cantidades máximas alcanzables por los productos (figura 2).²⁶

Probablemente la evaluación de la cantidad máxima teórica u óptimo del producto (n-butanol) es calculable. Sin embargo, para las cepas productoras de n-butanol es casi imposible determinar un valor teórico máximo absoluto, debido a la

²⁶ LLANERAS, Francisco y PICÓ, Jesus. Op. Cit., p. 25.

complejidad del metabolismo y a la variabilidad del medio de cultivo.⁹ Pero, fijadas ciertas condiciones puede obtenerse un óptimo teórico. Con relación al modelado estequiométrico de la producción fermentativa de n-butanol utilizando *C. acetobutylicum* se han desarrollado diferentes modelos los cuales se mencionan a continuación.

Figura 2. Esquema de las diferentes metodologías y aplicaciones del modelado estequiométrico del metabolismo celular



Adaptado de: LLANERAS, Francisco y PICÓ, Jesús. Stoichiometric Modeling of Cell Metabolism. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 105. (2008): p. 1-11.²⁶

⁹ JONES, David T and WOODS David R. Op. Cit., p. 20.

El balance de masa de las dos fases (acidogénesis y solventogénesis) en la fermentación de la glucosa utilizando *C. acetobutylicum* puede describirse de la siguiente manera: la relación teórica de acetato/butírate por mol de glucosa consumida en la acidogénesis fue de 0.667 (0.5 moles de acetato y 0.75 moles de butírate) con una generación de 3.25 moles de ATP. Teniendo en cuenta únicamente la solventogénesis se produjeron 0.65 moles de n-butanol.²⁸ La estimación teórica de n-butanol incluyendo ambas fases fue de 0.56 moles. En la tabla 3 se presentan detalladamente los balances de masa teóricos de *C. acetobutylicum*.⁹

Por otro lado una producción de 0.6 moles de acetato, 0.7 moles de butírate y 3.30 moles de ATP por mol de glucosa consumida fueron calculados teóricamente en la acidogénesis para *C. acetobutylicum*⁴ y *C. pasteurianum*.²⁹ En cambio para la solventogénesis exclusivamente se formaron 0.6 moles de n-butanol, 0.3 moles de acetona y 0.1 moles de etanol.⁴

Una propuesta teórica para *C. acetobutylicum* basada en relaciones estequiométricas fijas entre solventes obtuvieron rendimientos “máximos” de solventes (Y_{SG}) de 0.386 y 0.399 g/g; los cuales en términos de n-butanol corresponden a Y_{BG} de 0.60 y 0.58 mol/mol respectivamente.³⁰ Otros cálculos predijeron rendimientos de solventes entre 0.32 y 0.37 g/g para *Clostridium beijerinckii* en cultivos continuos de células inmovilizadas.³¹

Sí en *C. acetobutylicum* solo se produjera n-butanol y CO₂ el rendimiento máximo teórico o “trivial” sería de 1 mol de n-butanol por mol de glucosa consumida. Esta estimación omite por completo toda actividad metabólica natural del microorganismo. Es por ello que el modelado estequiométrico se ha enfocado más

28 ROGERS, Palmer. Appl. Microbiol. Vol. 31 (1984): p. 1-60.

9 JONES, David T and WOODS David R. Op. Cit., p. 20.

4 LÜTKE-EVERSLÖH, Tina and BAHL, Hubert. Op. Cit., p. 17.

29 THAUER, Rudolf K; JUNGERMANN, Kurt and KARL, Decker. Bacteriological Review. Vol. 41 N° 1. (1977): p.100-180.

30 LALEH, Yerushalmi. et al. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 18 (1983): p. 279-286.

31 HÄGGSTRÖM, Lena. Biotech Advs. Vol.3. (1985): p. 13-28.

al entendimiento del metabolismo celular.

Tabla 3. Balance masa de la fermentación de *C. acetobutylicum*

Productos	mol de producto/mol de glucosa fermentada		
	Acidogénesis únicamente ^a	Solventogénesis únicamente ^a	Fermentación final ^b
H ₂	2.50	1.40	1.35
CO ₂	2.00	2.30	2.21
Acetato	0.50	-	0.14
butirato	0.75	-	0.04
Acetona	-	0.30	0.22
n-butanol [Y _{BG}]	-	0.65	0.56
Etanol	-	0.10	0.07
ATP/glucosa	3.25	2.00	-
Rendimiento másico de solventes [Y _{SG} g/g]	-	0.390	0.320
Rendimiento másico de butanol [Y _{BG} g/g]	-	0.268	0.231

Y_{BG}: Rendimiento teórico de n-butanol formado por glucosa consumida.

Y_{SG}: Rendimiento teórico de solventes (ABE) formados por glucosa consumida.

^aRogers, P. Genetics and biochemistry of Clostridium relevant to development of fermentation processes. Appl. Microbiol. Vol. 31. (1984): p. 1-60.

^bJONES, David. T. and WOODS David. R. Acetone-Butanol Fermentation Revisted. Microbiological Reviews. Vol 50. No 4. (1986): p 484-524.

Utilizando por primera vez el concepto de análisis de flujos metabólicos (AFM) Papoutsakis en 1984 planteó una ecuación estequiométrica para bacterias ácido butírico productoras. Este modelo está basado en: la ruta metabólica y, las restricciones bioquímicas y termodinámicas. Fue propuesto a partir del balance de masa elemental de C, H, O y N de la glucosa, biomasa, y los productos extracelulares; además de la adición adecuada de NH₃ y H₂O.⁸

De la validación del modelo Papoutsakis (1984) afirmó lo siguiente: a) el modelo al parecer es válido para una amplia variedad de fermentaciones de bacterias ácido butíricas, b) las restricciones y suposiciones impuestas a la bioquímica de la

⁸ PAPOUTSAKIS, Efetherios Terry. Op. Cit., p. 20.

fermentación fueron las adecuadas, c) el modelo posee la capacidad de determinar las posibles fuentes de errores presentes en datos experimentales, d) la ecuación estequiométrica puede emplearse para la estimación de productos imposibles de medir directamente, por ejemplo la biomasa, e) el exceso de ATP es utilizado en un algún proceso celular desconocido o simplemente se hidroliza sin estar involucrado en funciones celulares y f) el rendimiento teórico máximo de n-butanol fue de 0.939 moles por mol de glucosa consumida.⁸ Con respecto a la última aseveración cabe aclarar que el modelo ignoró por completo la actividad enzimática de los demás metabolitos producidos.

Los principales inconvenientes de la ecuación estequiométrica derivada por Papoutsakis (1984) fueron la presencia de singularidades en las reacciones de formación de acetato, butírate y sus reasimilaciones. De manera que no existe un único conjunto de flujos para la descripción de la actividad metabólica. Lograron superar dichas dificultades incluyendo una restricción no lineal y reestructurando el cálculo a un problema de optimización global no lineal.²²

Esencialmente la restricción no lineal es una relación entre los flujos de las reacciones de reasimilación de butírate y acetato en la que introdujeron el parámetro de selectividad entre ellas.²² La selectividad fue obtenida a partir de datos cinéticos experimentales *in vitro*, los cuales contrastan con los resultados obtenidos *in vivo*.³² Además el modelo prescinde de los balances de CO₂ y H₂ por falta de información experimental de estas sustancias.²²

La exitosa validación indirecta del modelo de restricción no lineal utilizando datos de cultivos sin control de pH permitió resolver el problema de las singularidades. En cultivos *bacth* a pH controlado se confirmó que la formación de ácidos continúa

8 PAPOUTSAKIS, Efetherios Terry. Op. Cit., p. 20.

22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.

32 WIESENBORN, Dennis P; RUDOLPH, Frederick B and PAPOUTSAKISI, Eleftherios T. Applied and environmental microbiology. Feb. (1989): p. 323-329.

durante la solventogénesis y juega un papel importante en esta.²² Además reveló que la formación de acetona ocurre vía acetoacetil-CoA acetato/butírate CoA-transferasa, con la particularidad que más acetona se produce a partir del acetato que del butírate. El butírate también se reasimiló vía butírate quinasa fosfotransbutirilasa sin la formación de acetona.^{20,22}

Debido a que es imposible medir directamente los flujos de reutilización de los ácidos y de formación de acetona, los únicos valores de estos son los estimados por el modelo mejorado de Desai, R; Nielsen, L and Papoutsakis, E. (1999).²² De esta forma se sacó ventaja de la capacidad del AFM para el entendimiento del metabolismo celular.^{20,26} Además, se empleó el modelado estequiométrico (AFM) para investigar las reacciones claves de la acidogénesis y la solventogénesis.²⁰

La aplicación de AFM a la complejidad del metabolismo primario de *C. acetobutylicum* proporcionó información relevante sobre el papel de la acidogénesis en la formación de solventes: a) la formación de acetona se origina al final de la fase temprana de crecimiento exponencial sin los observables de reasimilación de acetato y butírate, b) la reacción reversible de butírate juega un papel importante en su producción y reutilización sin la concomitante formación de acetona, c) la formación de acetato tiene la función sustancial de generar ATP, durante el crecimiento y el no crecimiento celular y d) el AFM sugiere que el butirilfosfato sea un inductor de la solventogénesis.²⁰

Los últimos modelos estequiométricos desarrollados para *C. acetobutylicum* son aquellos relacionados con el análisis de flujos balanceados (AFB) y una aplicación especial denominada modelo a escala del genoma. El primero de estos modelos desarrollado para bacterias de la clase *clostridia* consiste en 422 metabolitos involucrados en 522 reacciones, incluyendo 80 reacciones de transporte a través

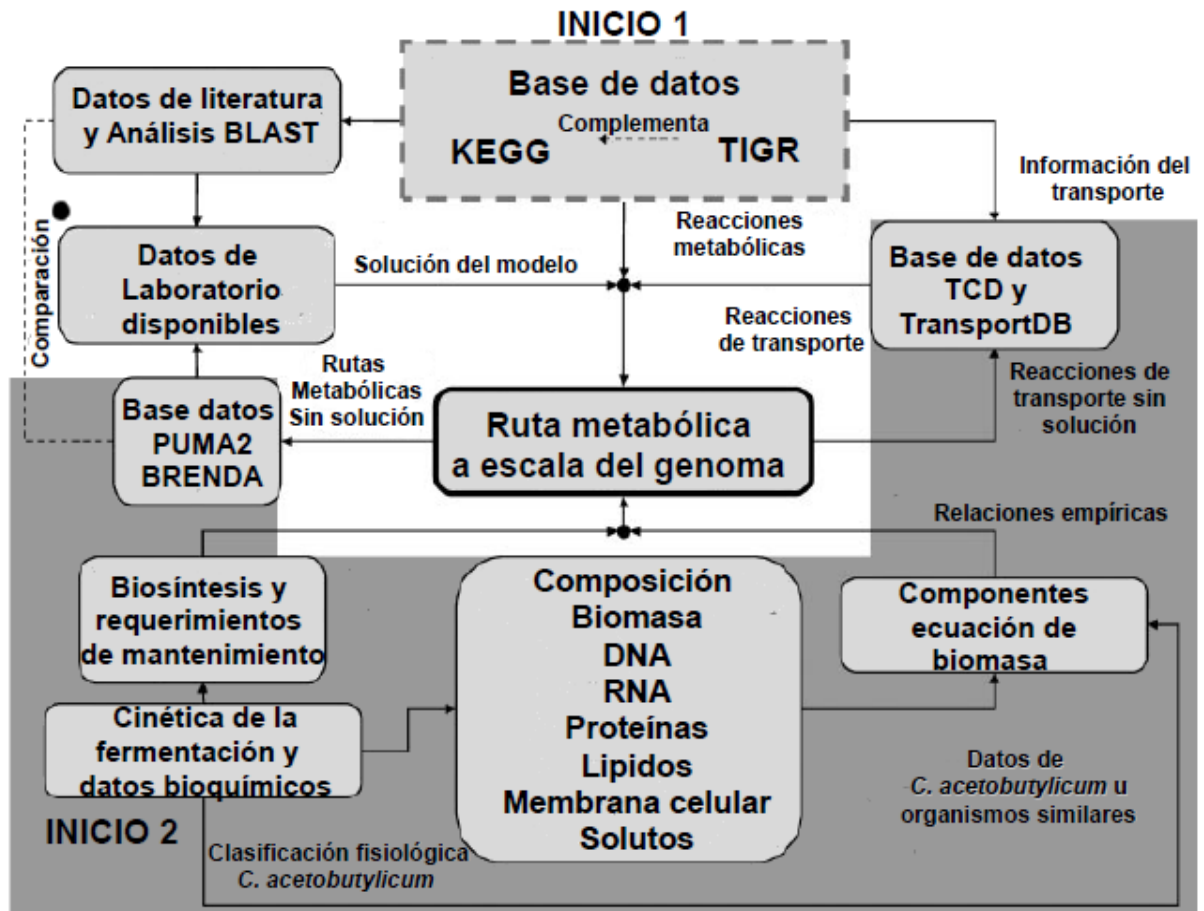
22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.

20 DESAI, Ruchir P. et al. Op. Cit., p. 23.

26 LLANERAS, Francisco y PICÓ, Jesús. Op. Cit., p. 25.

de la membrana celular. Su construcción consistió en un método iterativo que se presenta en la figura 3 y un algoritmo de retro-ingeniería para la reconstrucción de las rutas metabólicas.³³

Figura 3. Construcción y solución del Modelo a Escala del Genoma



Tomado de: SENGER, Ryan S; y PAPOUTSAKIS, Eleftheruis T. Genome-Scale for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic Network Resolution and Analysis. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 101. No. 5. (2008): p. 1036-1052.³³

El modelo a escala del genoma para *C. acetobutylicum* tuvo la capacidad de

³³ SENGER, Ryan S and PAPOUTSAKIS, Eleftheruis T. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 101. No. 5. (2008): p. 1036-1052.

simular o predecir la composición de la biomasa (figura 3) bajo tres escenarios diferentes: 1) medio de cultivo mínimo,³⁴ 2) medio sintético con glicerol²⁴ y 3) medio complejo.³³ A pesar de la exitosa predicción de los procesos dirigidos a la síntesis de la biomasa, el modelo no logró describir los mecanismos metabólicos de la acidogénesis, la reutilización de los ácidos y la solventogénesis como una cascada de eventos caracterizados por la activación de factores sigma. Debido a que carece de los procesos de regulación metabólica.³³

Con el objeto de incluir los procesos de regulación metabólica el modelo a escala del genoma se modificó imponiendo una restricción adicional,³⁵ la cual unificó el metabolismo primario con las rutas metabólicas de síntesis de macromoléculas y de biomasa; integrándolo a su vez a las concentraciones de protones y al transporte a través de la membrana celular (“flujo específico de protones”) de los resultados del medio mínimo.³⁴ Todo lo anterior fue acoplado a los datos del pH extracelular para la solución del modelo.³⁵

La optimización del modelo a escala del genoma basado en el Análisis de Flujos Balanceados (AFB) presentó múltiples singularidades. Los autores discretizaron la función continua y desarrollaron el concepto de *flujo específico de protones*, definiendo un conjunto de subespacios de solución. Esto demostró numéricamente como subsistemas pueden identificar características fenotípicas dentro de la matriz singular. En la solución y validación del modelo se emplearon dos funciones objetivos. La maximización de la biomasa o la maximización de la ferredoxina reducida, obteniéndose mejores resultados en la segunda.³⁵

Casi paralelamente otro modelo a escala del genoma se planteó para *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 fue creado en 3 pasos: 1) reconstrucción automática de

34 MONOT, Frederic. et al. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 44. No 6. (1982): p. 1318-1324.

24 VASCONCELOS, Isabel. GIRBAL, Laurence and SOUCAILLE. Op. Cit., p. 24.

33 SENGER, Ryan S and PAPOUTSAKIS, Eleftheruis T. Op. Cit., p. 32.

35 SENGER, Ryan S and PAPOUTSAKIS, Eleftheruis T. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 101. No. (2008): p. 1053-1071.

las rutas metabólicas, 2) aproximación manual del modelo y 3) calibración del modelo.³⁶ La simulación y validación separó la acidogénesis de la solventogénesis. En la primera, la función objetivo fue la maximización de la biomasa como una aplicación clásica de AFB (programación lineal); para la solventogénesis utilizaron como función objetivo la fluctuación mínima entre los metabolitos acoplada a la restricción no lineal de Papoutsakis (1999).²² En este caso AFB fue solucionado aplicando los métodos de programación no lineal y en ambas fases los flujos metabólicos fueron calculados exitosamente.³⁶

Las similitudes entre los modelos a escala del genoma son: a) La aplicación de AFB, b) la maximización de la producción de biomasa y c) tamaños comparables. El modelo de Senger y Papoutsakis (2008) cuenta con 422 metabolitos involucrados en 522 reacciones,^{33,35} en cambio LEE, et al., (2008) incorporó 479 metabolitos en 502 reacciones.³⁶

Dada la complejidad del metabolismo de *C. acetobutylicum* el espacio óptimo predicho por AFB, proporciona un intervalo muy amplio de soluciones igualmente válidas. Sin embargo, mediante un Análisis de Flujos Variables (AFV) a la misma función objetivo y sus restricciones se facilita la maximización o minimización de cada flujo y se obtienen intervalos de flujos más estrechos y específicos.³⁷

Un modelo a escala del genoma más robusto compuesto por 711 reacciones en las que intervienen 679 metabolitos fue solucionado por la técnica de AFV. Para la reconstrucción automática de las rutas metabólicas automática se utilizaron las herramientas bioinformáticas (The MetaFluxNet, MetaCyc, System Biology Markup Language model, Acd/LogD So, Matlab) y las bases de datos (Tigr-Cmr, Kegg y Bigg) e incluyó datos termodinámicos y el análisis del metaboloma, cuyo efecto fue

36 LEE, Joungmin. et al. Appl Microbiol Biotechnol (2008): p. 849–862.

22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.

33 SENGER, Ryan S and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 32.

35 SENGER, Ryan S and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 33.

37 MAHADEVAN, R. and SCHILLING, C.H. Metabolic Engineering, (2003): p. 264–276. Citado por: SALIMI, Fahimeh. et al. Proceedings of the 11th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology (CAB 2010).

la limitación del espacio de solución.³⁸

A partir del AFV se obtuvo una región amplia para los flujos máximos y mínimos de los metabolitos. Los valores predichos están dentro del espacio de los datos experimentales alcanzados en cultivos continuos, es decir que la solución está limitada a una zona real. De acuerdo con el AFV los flujos estimados en la solventogénesis están ligados a los calculados en la acidogénesis y por ende exhibe varias alternativas de soluciones óptimas.³⁸

El modelado estequiométrico ha sido de gran utilidad en el análisis de la estructura del metabolismo. Por ejemplo, dos deducciones de la aplicación de AFB y AFV son las siguientes: el empleo de AFB indica que el n-butanol aumentó en la medida que la producción de hidrógeno disminuyó o la actividad de la hidrogenasa se redujo,³⁶ esto coincidió con los datos experimentales obtenidos por otros autores.³⁹ La simulación por AFV sugirió la importancia que tiene la síntesis de acetato e hidrógeno en la máxima producción de n-butanol,³⁸ concordando con los resultados obtenidos por Peguin, S and Soucaille, P. (1995).⁴⁰

En síntesis el modelado estequiométrico es una herramienta valiosa para el cálculo del estado actual de los metabolitos en la fermentación, el cálculo predictivo de los posibles estados alcanzables e información estructural y funcional del metabolismo sin la necesidad de datos cinéticos.

1.4 MODELADO CINÉTICO DE LA FERMENTACIÓN

El modelado cinético consiste en obtener una o varias expresiones de velocidad

38 SALIMI, Fahimeh. et al. Proceedings of the 11th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology (2010), Leuven, Belgium, July 7-9, 2010.

36 LEE, Joungmin. et al. Op. Cit., p. 36.

39 KIM, Byung Hong. et al. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 48. No 4. (1984): p. 764-770.

40 PEGUIN, Sophie and SOUCAILLE, Philippe. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 61. No 1. (1995): p. 403-405.

que describan el comportamiento del proceso fermentativo. Pueden clasificarse en modelos estructurados y no estructurados o de caja negra. Los primeros se desarrollan a partir del conocimiento de la ruta metabólica y aquellos fenómenos característicos de la cinética enzimática. En contraste los no estructurados excluyen la estructura interna del metabolismo.^{41,42}

1.4.1 Modelado cinético no estructurado Es la más simple representación del crecimiento celular, también denominado modelado de caja negra. Debido a que ignora casi por completo toda actividad metabólica microbiana, dicha descripción matemática es una ecuación o conjunto de ecuaciones caracterizadas tan solo por variables extracelulares como la concentración de biomasa X , sustrato S , producto P y en algunos casos el pH. La velocidad de formación de biomasa r_x , generalmente tiene la forma descrita por la ecuación 3 y las otras variables extracelulares por la ecuación 4.^{41,42}

$$r_x = \mu X = \frac{\partial X}{\partial t} \quad \text{Ec. 3}$$

$$r_j = q_j X = \frac{\partial c_j}{\partial t} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde r_j es la velocidad de consumo o de formación de cualquier especie j
 q_j es la velocidad específica de consumo o de formación de cualquier especie j

El modelo clásico o convencional de la cinética microbiana es el de Monod (ecuación 5), el cual representa la velocidad específica de crecimiento μ como una función del sustrato limitante S .^{41,42,43}

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad \text{Ec. 5}$$

41 MCNEIL, Brian; HARVEY, Linda M. Practical fermentation technology. 1 ed. London: John Wiley and Sons, Ltd, (2008): p. 167-230.

42 RATLEDGE, Colin; KRISTIANSEN, Bjorn. Basic Biotechnology. 3 ed. United Kingdom. (2006): p. 57, 491-493.

43 YANG, Xiaoping and TSAO, George G Biotechnol. prog. Vol. 10. (1994): p 532-538.

μ_m : velocidad específica máxima de crecimiento

K_s : constante de saturación o de Monod

Un modelo no estructurado (ecuación 6) para *C. acetobutylicum* ATCC 824 propuesto por Yang y Tsao (1994) en la producción batch de acetona y n-butanol consistió en una cinética de Monod modificada. Debido a los factores de inhibición por sustrato, productos y subproductos característica de las bacterias del género *Clostridium*. Los resultados confirmaron que la inhibición se debe a múltiples factores tales como: el pH, concentración de acetato, butírate y n-butanol. En la tabla 4 se presentan los parámetros cinéticos estimados de este modelo.⁴³

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} F_x(I)$$
$$F_x(I) = 1 - \left(\frac{C_{aa}}{C_{maa}}\right)^{maa} - \left(\frac{C_{ba}}{C_{mba}}\right)^{mba} - \left(\frac{C_b}{C_{mb}}\right)^{mb} m_1 \left(\frac{C_{aa}}{C_{maa}}\right)^{maa} \left(\frac{C_b}{C_{mb}}\right)^{mb} - m_2 \left(\frac{C_{ba}}{C_{mba}}\right)^{mba} \left(\frac{C_b}{C_{mb}}\right)^{mb} - m_3 \left(\frac{5.6 - pH}{1.6}\right)$$

Ec 6

Dónde: C_{aa} , C_{ba} , y C_b concentraciones de acetato, butírate y n-butanol respectivamente.

Napoli y colaboradores (2011) investigaron en cultivos continuos bajo condiciones controladas de pH el comportamiento de *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 durante la acidogénesis. Los resultados demostraron que: los ácidos son más tóxicos que los solventes, los efectos inhibitorios de la acetona y el etanol son insignificantes con respecto al n-butanol y μ presenta una dependencia no lineal de la concentración de n-butanol. Por lo tanto propusieron un modelo no estructurado (ecuación 7), donde μ es función de la concentración de sustrato (lactosa), acetato, butírate, solventes ABE y pH.⁴⁴

43 YANG, Xiaoping and TSAO, George G. Op. Cit., p. 36.

44 NAPOLI, Fabio. et al. Bioresource Technology 102 (2011): p. 1608–1614.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{L}{L + K_L} \left(1 - \frac{AA}{AA_{m\acute{a}x}}\right)^{n_{AA}} \left(1 - \frac{BA}{BA_{m\acute{a}x}}\right)^{n_{BA}} \left(1 - \frac{AC}{AC_{m\acute{a}x}}\right)^{n_{AC}} \left(1 - \frac{Et}{Et_{m\acute{a}x}}\right)^{n_{Et}} \left(1 - \frac{B}{B_{m\acute{a}x}}\right)^{n_B} \quad \text{Ec. 7}$$

Donde L , AA , AB , AC , Et y B concentraciones de lactosa, acetato, butírate, acetona, etanol y n-butanol respectivamente.

Tabla 4. Parámetros cinéticos del modelo de inhibición

Parámetros	Valores
C_{maa} (g de acetato/L)	12,0
C_{mba} (g de butírate/L)	11,0
C_{mb} (g de n-butanol/L)	17,0
maa	1,5
mba	2,5
mb	2,0
m_1	2,0
m_2	2,0
m_3 (cuando $pH > 5,6$)	0,00
m_3 (cuando $pH < 5,6$)	0,79

Tomado de: YANG, Xiaoping and TSAO, George G. Mathematical of inhibition kinetics in acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnol. prog. Vol. 10. (1994): p 532-538.⁴³

Generalmente el modelado del pH ha sido descrito por la ecuación 8 propuesta por Tang, et al., (1989).⁴³ Napoli modificó la ecuación del pH (ecuación 9) y le permitió afirmar lo siguiente: el pH afecta la velocidad específica de crecimiento μ , las concentraciones críticas de los ácidos (acetato y butírate) no cambian con el pH y el pH óptimo fue 4.9. En la tabla 5 se resumen los parámetros cinéticos del modelo de Napoli, et al., 2011.⁴⁴

$$\mu_{max} = \frac{\mu'_{max}}{\left(1 + \frac{H^{+1}}{K_H} + \frac{K_{OH}}{H^{+1}}\right)} \quad \text{Ec. 8}$$

$$\mu_{max} = \frac{\mu'_{max}}{1 + \frac{H^{+1}}{K_H} + \frac{K_{OH}}{H^{+1}}} \left(1 - \frac{10^{(pH_{opt} - pH)}}{10^{\Delta pH}}\right) \quad \text{Ec. 9}$$

43 YANG, Xiaoping and TSAO, George G. Op. Cit., p. 36.

44 NAPOLI, Fabio. et al. Op. Cit., p. 37.

Comparando los resultados de Napoli, Fabio. et al., 2011;⁴⁴ con los de Yang y Tsao 1994;⁴³ concordaron en que: la mayor selectividad en el consumo de butirato que de acetato; y en las concentraciones tóxicas o máximas calculadas para el n-butanol fueron 16,5⁴⁴ y 17g/L⁴³ respectivamente.

Tabla 5. Parámetros cinéticos del modelo de la acidogénesis

Parámetros	Valores	Parámetros	Valores
μ_{max}	1.06h ⁻¹	K_L	1.34g/L
AA_{max}	1.56g/L	n^{AA}	0.98
BA_{max}	3.00g/L	n^{BA}	0.96
B_{max}	16.5g/L	n^B	0.47
Ac_{max}	64.5g/L	n^{Ac}	1.00
Et_{max}	35.0g/L	n^{Et}	1.00
K_H	3.33x10 ⁻⁴ M	K_{OH}	5.04x10 ⁻⁷ M
pH_{opt}	4.90	ΔpH	1.50

Tomado de: NAPOLI, Fabio; OLIVIERI, Giuseppe; RUSSO, Maria Elena; MARZOCHELLA, Antonio and SALATINO, Piero. Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* Assessment of acidogenesis kinetics. Bioresource Technology 102 (2011): p. 1608–1614.⁴⁴

En resumen, la ventaja o versatilidad de los modelos no estructurados está en la “facilidad del diseño, operación, optimización, cambio de escala, control y automatización de los reactores biológicos” por medio de relaciones simples y variables extracelulares, así se evita el análisis detallado y conocimiento de la complejidad del metabolismo celular.

1.4.2 Modelado cinético estructurado Estos modelos son desarrollados a partir de toda la información relevante y disponible del metabolismo celular. Entonces, para una apropiada representación matemática y buena predicción de los metabolitos de interés, es indispensable el conocimiento y el entendimiento de las rutas metabólicas; así como los eventos relacionados con la regulación, control y cinética enzimática del microorganismo en estudio.⁴⁵

44 NAPOLI, Fabio. et al. Op. Cit., p. 37.

43 YANG, Xiaoping and TSAO, George G. Op. Cit., p. 36.

45 SHULER, Michael L. and KARGI, Fikret. Bioprocess Engineering. Basic Concepts. 2Ed. Prentice Hall. (2002): p. 184-185.

Un modelo estructurado para *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 consistió en un conjunto de ecuaciones diferenciales o expresiones de velocidad (tabla 6) de las reacciones de la ruta metabólica, cuya simulación dinámica (*batch*) de la fermentación de la glucosa describió el comportamiento de la producción de acetona, n-butanol y etanol. Este modelo incluyó factores como: la inhibición por sustrato, la inhibición por n-butanol, la activación por butírate y la cesación de actividad celular por agotamiento del sustrato (glucosa).⁴⁶

La solución de las ecuaciones diferenciales permitieron estimar los parámetros cinéticos del modelo; además de las concentraciones de: glucosa, biomasa, acetato, butírate, acetona, etanol y n-butanol con un factor de correlación (r^2) de 0.91. A su vez, el modelo indicó la alta sensibilidad a la enzima CoA-transferasa en la reacción de reasimilación del butírate, siendo este uno de los factores claves en el inicio de la solventogénesis.⁴⁶

Otro modelo estructurado de Shinto, H. et al., (2008) utilizó xilosa como sustrato y aplicó un análisis cinético semejante al modelo con glucosa. Éste logró predecir la elevada conversión de xilosa en n-butanol. Es decir, que pequeñas cantidades de xilosa fueron convertidas en altas cantidades de n-butanol, siendo consistente con los datos experimentales. Por lo tanto sugiere una exitosa simulación de la fermentación ABE a partir de las ecuaciones diferenciales propuestas.⁴⁷

Hasta aquí se ha abordado la bioproducción de n-butanol desde las generalidades, bioquímica, metabolismo, modelado, simulación, optimización y destacando la importancia del entendimiento del metabolismo mediante modelos cinéticos y estequiométricos. Estos últimos analizados desde su capacidad predictiva de los solventes formados y sobretodo como una herramienta valiosa para la comprensión de las reacciones metabólicas. Otros estudios experimentales

46 SHINTO, Hideaki. et al. *Journal of Biotechnology* 131 (2007): p. 45–56.

47 SHINTO, Hideaki. *Process Biochemistry* 43 (2008): p. 1452–1461.

(cultivos celulares) se han realizado con el objeto de mejorar la competitividad en la producción industrial fermentativa de n-butanol.

Tabla 6. Expresiones cinéticas para la ruta metabólica

$r_1 = \frac{V_{max1} [Glucosa] [Biomasa]}{K_{m1} (1 + [Glucosa]/K_{i1}) + [Glucosa] (1 + [Butanol]/K_{i1})} \times F$	
$r_2 = V_{max2} \left(\frac{1}{1 + (K_{m2A}/[Acetato])} \right) \times \left(\frac{1}{1 + (K_{m2B}/[A CoA])} \right) [Biomasa]$	
$r_2 = \frac{V_{max2} [F6P] [Biomasa]}{K_{m2} + [F6P]} \times F$	$r_{10} = \frac{V_{max10} [A CoA] [Biomasa]}{K_{m10} + [A CoA]} \times F$
$r_3 = \frac{V_{max3} [G3P] [Biomasa]}{K_{m3} + [G3P]}$	$r_{11} = \frac{V_{max11} [A CoA] [Biomasa]}{K_{m11} + [A CoA]} \times F$
$r_4 = \frac{V_{max4} [Lactato] [Biomasa]}{K_{m4} + [Lactato]} \times F$	$r_{12} = K_{12} [Biomasa]$
$r_5 = \frac{V_{max5} [Piruvato] [Biomasa]}{K_{m5} + [Piruvato]} \times F$	$r_{14} = \frac{V_{max14} [A A CoA] [Biomasa]}{K_{m14} + [A A CoA]} \times F$
$r_6 = \frac{V_{max6} [Piruvato] [Biomasa]}{K_{m6} + [Piruvato]} \times F$	$r_{16} = \frac{V_{max16} [Acetoacetato] [Biomasa]}{K_{m16} + [Acetoacetato]} \times F$
$r_7 = \frac{V_{max7} [Acetato] [Biomasa]}{K_{m7} + [Acetato]} \times F$	$r_{17} = \frac{V_{max17} [Butirato] [Biomasa]}{K_{m17} (1 + K_{i17}/[Biomasa]) + [Butirato]} \times F$
$r_8 = \frac{V_{max8} [A CoA] [Biomasa]}{K_{m8} + [A CoA]} \times F$	$r_{18} = \frac{V_{max18} [S CoA] [Biomasa]}{K_{m18} + [S CoA]} \times F$
$r_{12} = \frac{V_{max12} [A CoA] [Biomasa]}{K_{m12} \left(1 + \frac{[Butanol]}{K_{i12}} + [A CoA] (1 + [Butanol]/K_{i12}) \right)}$	
$r_{13} = V_{max13} \left(\frac{1}{1 + (K_{m13A}/[Butirato])} \right) \times \left(\frac{1}{1 + (K_{m13B}/[A A CoA])} \right) [Biomasa]$	
$r_{18} = \frac{V_{max18} [S CoA] [Biomasa]}{K_{m18} (1 + K_{i18}/[Biomasa]) + [S CoA] (1 + K_{i18}/[Biomasa])} \times F$	

Tomado de: SHINTO, Hideaki; YAMASHITA, Mayu; KOBAYASHI, Genta; SEKIGUCHI, Tatsuya; HANAI, Taizo; KURIYA, Yuki; OKAMOTO, Masahiro and SONOMOTO, Kenji. Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone–butanol–ethanol production. *Journal of Biotechnology* 131 (2007): p. 45–56.⁴⁶

1.5 CULTIVOS CELULARES

En la producción biotecnológica de n-butanol se han investigado todos los modos

de operación (Batch o lotes, semicontinuo y continuo) y sus respectivas variaciones tecnológicas debido a que económicamente no es rentable.^{2,7,48,49}

El costo del sustrato es esencialmente el factor más determinante en la viabilidad económica de la producción de n-butanol por fermentación.^{2,7,49} Del mismo modo otros factores influyentes son: 1) bajas concentraciones de n-butanol alcanzadas, porque aumenta los costos de purificación. 2) bajos rendimientos, porque además del n-butanol el sustrato se convierte a CO₂ y H₂ y 3) baja productividad.^{7,48}

En las tablas 7, 8, 9, y 10 se presentan los estudios más relevantes desarrollados para superar las dificultades de la factibilidad económica de la vía fermentativa en la producción de n-butanol.

En la tabla 7 se resumen los principales resultados para *C. acetobutylicum* ATCC824. Por ejemplo, el rendimiento de n-butanol (Y_{BS}) más bajo fue de 0,074g/g;⁵⁰ el más alto de 0,288g/g.⁵¹ Por otro lado, La utilización de un proceso continuo alcanzó un Y_{BS} de 0.138g/g⁵² y su homólogo con recirculación celular lo mejoró hasta 0.233g/g. Además, el proceso con recirculación celular proporcionó la más alta productividad volumétrica de n-butanol ($Q_B=2.83g/L \cdot h$).⁵³ Finalmente, los hidrolizados de almidón de yuca y los de almidón de maíz (datos no mostrados) lograron rendimientos muy similares y a la vez superiores a los obtenidos empleando glucosa.⁵⁴

2 QURESHI, Nasib et al. Op. Cit., p. 16.

7 DÜRRE, Peter. Op. Cit., p. 19.

48 QURESHI, N and MADDOX, I. S. Food and Bioproducts Processing. 83. (2005): p 43-52.

49 QURESHI, Nasib. et al. Biomass and Bioenergy. Vol. 32 (2008): p 168-175.

50 WALTER, K; MERMELSTEIN, L. and PAPOUTSAKIS, T. Annals new york academy of sciences (1994): p. 69-72.

51 ZHANG, Y; HAN, B. and EZEJI, T. New Biotechnology. Vol. 29. N° 3. February (2012): p. 345-351.

52 MEYER, C. and PAPOUTSAKIS, E. Bioprocess Engineering. 4. (1989): p. 1-10.

53 MEYER, C. and PAPOUTSAKIS, E. Bioprocess Engineering. 4. (1989): p. 49-55.

54 LI, Xin. Et al. Bioresource Technology 125 (2012): p. 43–51.

Tabla 7. Comparación de rendimientos y productividad para diferentes procesos en la producción de ABE empleando *C. acetobutylicum* ATCC 824

Microorganismo	Sustrato utilizado [g/L]	Proceso biotecnológico	B [g/L]	Q _B [g/L* h]	Y _{BS} [g/g]	Referencia
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Glucosa (40)	Lotes	9.19	---	0,219	34
	Glucosa (65 y 75) ^a ⁵⁵	Lotes	14.5 15.6 ^a	0.274 0.354 ^a	0.223 0.208 ^a	55
	Glucosa	Continuo	2.48	0.578	0.138	52
	Glucosa	Continuo recirculación	4.20	2.83	0.233	53
	Glucosa (70 ^b y 75 ^c)	Lotes	5.19 ^b 9.64 ^c	---	0.074 ^b 0.128 ^c	50
	Glucosa (42.37) ⁵⁶	Lotes	11.8 9	0.165	0.187	56
	Glucosa (444.72)	Semicontinuo y pervaporación	105. 4	0.123	0.234	
	Glucosa (61.46)	Lotes	11.0 6	0.154	0.276	51
	Glucosa (59.29)+F (2)	Lotes	10.7 1	0.149	0.288	
	Glucosa (58.96)+HMF(2)	Lotes	10.9 3	0.152	0.275	
	Hidrolizado almidón de yuca (43.9)	Lotes	13.6 1	0.270	0.310	54
	Hidrolizado almidón de yuca (98.2)	Lotes extracción L-L	34.3 7	0.340	0.350	

^a mutante de ATCC 824; ^b pH de 4.5 y ^c pH de 5.5.

F: furfural y HMF: Hidroximetil furfural

Los rendimientos experimentales de n-butanol (Y_{BS}) para *C. acetobutylicum* P262 utilizando diferentes sustratos (tabla 8) no mostraron grandes diferencias y promediaron un valor de 0.21g/g. Con respecto a *C. acetobutylicum* DMS 792 se alcanzó un Y_{BS} de 0.26g/g⁵⁷ y una Q_B de 4.43g/L*h,⁵⁸ la cual fue significativamente superior a lo típicamente alcanzado en esta clase de fermentaciones.

En la tabla 9 se observa que el empleo de fuentes de carbono provenientes de la yuca, maíz o sorgo presentaron rendimientos y productividades más elevadas a

55 MATTA-EL-AMMOURI, Ghassan et al. Biomass. Vol. 10, N° 2. (1986): p. 109–119.

56 QURESHI, N. et al. Journal of Membrane Science 187 (2001) 93–102.

57 RAGANATI, F. et al. Bioresource Technology. 138. (2013): p. 259–265.

58 NAPOLI, Fabio. Et al. J Ind Microbiol Biotechnol. 37. (2010): p. 603–608.

las obtenidas con glucosa. Generalmente estos parámetros aumentan al emplear sistemas semicontinuos, lotes acoplados a una etapa de purificación o continuos. De la tabla 9 sobresale la alta productividad (11.0g/L*h) lograda por *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 en el sistema continuo con recirculación celular⁵⁹ y, el alto rendimiento (0.55g/g) obtenido en el proceso por lotes alimentado acoplado a un control de pH con ácido butírico.⁶⁰

Tabla 8. Comparación de rendimientos y productividad para diferentes procesos en la producción de ABE empleando *C. acetobutylicum* P262 y *C. acetobutylicum* DMS 792

Microorganismo	Sustrato utilizado [g/L]	Proceso biotecnológico	B [g/L]	Q _B [g/L*h]	Y _{BS} [g/g]	Referencia
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Suero permeado Lactosa (68.6) ⁶¹	Lotes extracción L-L	15.63	0.092	0,228	61
	Suero permeado Lactosa (123.4)	Semicontinuo pervaporación	26.8	0.086	0.217	
	Suero permeado Lactosa (157.5)	Continuo perstracción	37.4	0.130	0.237	
	Suero permeado ⁶² Lactosa (199)	Continuo arrastre de gas	43.4	0.197	0.218	62
	Suero permeado ^a Lactosa (28.6)	Lotes	5.56	0.060	0.194	48
	Suero permeado Lactosa (199)	Lotes perstracción	98.97	0.102	0.212	63
	Pulpa de papa Maltosa ^b (20.24) ⁶³	Lotes	4.21	0.086	0.208	
	Pulpa de papa Maltosa ^b (37.6)	Continuo células inmovilizadas	5.52	0.712	0.147	
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 792	Lactosa (9.53 ^c y 18.5 ^d)	Continuo lecho empacado	1.20 _c 4.59 _d	0.65 ^c 4.43 ^d	0.126 _c 0.248 _d	56
	Lactosa (18.96)	Continuo lecho empacado ^e	4.93	2.66	0.260	55

^a Control; ^b Equivalentes de maltosa; ^c pH 4.34 (tasa de dilución de 0.54);

^d pH 5.08 (tasa de dilución de 0.97); ^e pH 4.7 y tasa de dilución de 0.54.

59 TASHIRO, Yukihiko. et al. Journal of Biotechnology. Vol. 120. (2005): p. 197–206.

60 TASHIRO, Yukihiko. et al. Journal of Bioscience and Bioengineering . Vol. 98, No. 4. (2004): 263–268.

61 QURESHI, Nasibuddin; MADDOX, Ian S. and FRIEDL, Anton .Biotechnol. Prog. 8. (1992): p. 382-390.

62 MADDOX, I. S; QURESHI, N. and IS. THOMSON, Roberts . Process Biochemistry . Vol.30. No. 3. (1995): p. 209-215.

63 BADR, H; TOLEDO, R and HAMDY, M.Biomass and Bioenergy. 20. (2001): p. 119–132.

Tabla 9. Comparación de rendimientos y productividad para diferentes procesos en la producción de ABE empleando cepas de *C. acetobutylicum* y *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4.

Microorganismo	Sustrato utilizado [g/L]	Proceso biotecnológico	B [g/L]	Q _B [g/L* h]	Y _{BS} [g/g]	Referencia
<i>C. acetobutylicum</i> EA2018	Hidrolizado de maíz (60 ^a) ⁶⁴	Lotes	14.1	0.294	<0.235 _a	64
	Hidrolizado de yuca (60 ^b)	Lotes	9.90	0.165	<0.165 _b	
<i>C. acetobutylicum</i> CICC 8012	Glucosa (60) ⁶⁵	CCCF ^c pervaporación	61.3	0.205 _d	0.183 ^d	65
<i>C. acetobutylicum</i> JB 200	Glucosa (80) ⁶⁶	Lotes	16.2	0.30	0.20	66
		Lotes arrastre de gas	19.8	0.410	0.250	
	Glucosa (88.4) ⁶⁷	Lotes	20.3 ₉	0.380	0.230	67
	Bagazo de yuca hidrolizado (44.8)	Lotes	9.71	0.240	0.220	
	Bagazo de yuca hidrolizado (244.6)	Lotes alimentado arrastre de gas	59.8 ₁	0.350	0.250	
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	Glucosa (29 ^e) ⁶⁰	Lotes alimentado	16	---	0.550	60
	Glucosa ⁵⁹	Continuo recirculación	12.9 [†]	11.0 [†]	--	59
	Glucosa (63.5)	Lotes	16.2	0.450	0.260	68
	Almidon de yuca Hidrolizado (40) ⁶⁸	Lotes	13.8	0.288	0.370	
	Almidon de yuca Hidrolizado (60)	Lotes	16.9	0.352	0.330	
	Almidon de maíz Hidrolizado (60)	Lotes	16.2	0.245	0.370	
	Almidon de sorgo Hidrolizado (60)	Lotes	15.5	0.215	0.340	

^a y ^b indica que 60g/L de almidón, los rendimientos fueron estimados con respecto a 60g/L

^c CCCF Ciclo: continuo de fermentación integrado a pervaporación, primer ciclo lotes alimentado con pervaporación y segundo ciclo proceso continuo con

64 GU, Yang. et al. J. Ind Microbiol Biotechnol. 36 (2009): p. 1225–1232 .

65 CHEN, Chunyan. et al. Bioresource Technology. 128. (2013): p. 246–251.

66 XUE, Chuang. et al. Bioresource Technology. 135. (2013): p. 396–402 .

67 LU, Congcong. et al. Bioresource Technology. 104. (2012): P. 380–387.

60 TASHIRO, Yukihiro. et al. Op. Cit., p. 44.

59 TASHIRO, Yukihiro. et al. Op. Cit., p. 44.

68 THANG, Vu Hong; KANDA, Kohzo and KOBAYASHI, Genta. Appl Biochem Biotechnol. 161. (2010): p. 157–170.

pervaporación.^d Valores promedio.

^e Calculado a partir del rendimiento.

^f Concentración de solventes ABE y productividad de solventes ABE.

Clostridium beijerinckii presentó la misma tendencia de las cepas productoras de n-butanol referenciadas previamente. En otras palabras, aquellas configuraciones diferentes a los procesos discontinuos (lotes), que a su vez utilizaron sustratos derivados del maíz o trigo reportaron mayores productividades y rendimientos a los observados con glucosa (tabla 10). Conviene subrayar el elevado rendimiento (0.44g/g) alcanzado en el proceso continuo con células inmovilizadas.⁶⁹

En términos de la competitividad económica cabe mencionar que *C. beijerinckii* BA101 es una cepa híper productora de n-butanol⁷⁰ esto sumado al empleo de sustratos “económicos tales como: maíz y paja de trigo” hacen de esta fermentación como una de las más prometedoras.

En síntesis todos aquellos cultivos celulares que utilizaron procesos biotecnológicos diferentes al *batch* o tradicional; además de sustratos de origen vegetal (maíz, yuca, sago, trigo, etc) y microorganismos mejorados genéticamente presentaron rendimientos y productividades elevadas. A raíz de estas alternativas el restablecimiento de la fermentación ABE como un proceso viable económicamente puede ser posible. Dentro de este contexto algunas de las empresas que en la actualidad ofrecen biobutanol son: Butamax, green biologics, Cobalt Technologies, Cathay Industrial Biotech y Butalco GmbH.⁷¹

69 LEE, Sun-Mi et al. *Energy & Fuels*, Vol. 22, No. 5, (2008): p. 3459–3464.

70 EZEJI, T. QURESHI, N. AND BLASCHEK, H. *Appl Microbiol Biotechnol*. 63. (2004): p. 653–658.

71 Biobased Butanol Info. [En línea, visitado el 28 de abril de 2013]. Disponible en internet: <<http://www.biobutanol.com/Biobutanol-Producers-Gevo,-Butamax,-Cobalt,.html>>

Tabla 10. Comparación de rendimientos y productividad para diferentes procesos en la producción de ABE empleando cepas de *C. beijerinckii*.

Microorganismo	Sustrato utilizado [g/L]	Proceso biotecnológico	B [g/L]	Q _B [g/L* h]	Y _{BS} [g/g]	Referencia
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Glucosa (57.3) ⁷²	Lotes	18.6	--	0.32	72
	Maltodextrinas (52.7)	Lotes	18.6	--	0.35	
	Glucosa-control (45.4)	Lotes	11.9	0.198	0.262	70
	Glucosa (500.1)	Lotes alimentado arrastre de gas	151.7	0.755	0.303	
	Almidón de maíz (37.2)	Lotes	14.3	0.199 _a	0.384 _a	5
	Glucosa-control (25)	Lotes	6.50	0.108	0.244	2
	Xilosa-control (25)	Lotes	6.10	0.102	0.244	
	Hidrolizado fibra de maíz ^b (24.6)	Lotes	6.10	0.090	0.264	
	Hidrolizado fibra de maíz ^c (23.6)	Lotes	6.40	0.070	0.271	
	Glucosa-control (46.4)	Lotes	13.7	0.201	0.295	3
	Glucosa-control (60.5)	Lotes arrastre de gas	16.8	0.40	0.278	
	Almidón de maíz licuado (44.9)	Lotes	13.4	0.112	0.298	
	Almidón de maíz licuado (55.1)	Lotes arrastre de gas	15.1	0.194	0.274	
	Almidón de maíz LS (45.7)	Lotes	13.4	0.172	0.293	
	Almidón de maíz LS (64.3)	Lotes arrastre de gas	17.6	0.262	0.274	
	Almidón de maíz licuado y sacarificado (255.8)	Lotes alimentado arrastre de gas	56.2	0.410	0.249	
<i>C. beijerinckii</i> P260	Paja de trigo (86) Carbohidratos ^e (28.4)	Lotes SSF ^f	7.40	0.167	0.261	49
<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052	Glucosa (29.6)	Continuo	7.10	0.220	0.240	69
	Glucosa (30.5)	Continuo células inmovilizadas	13.4	0.40	0.45	

^a estimado a partir del almidón de maíz

^b Hidrólisis enzimática y ^c hidrólisis con ácido sulfúrico y posterior tratamiento con resina XAD-4

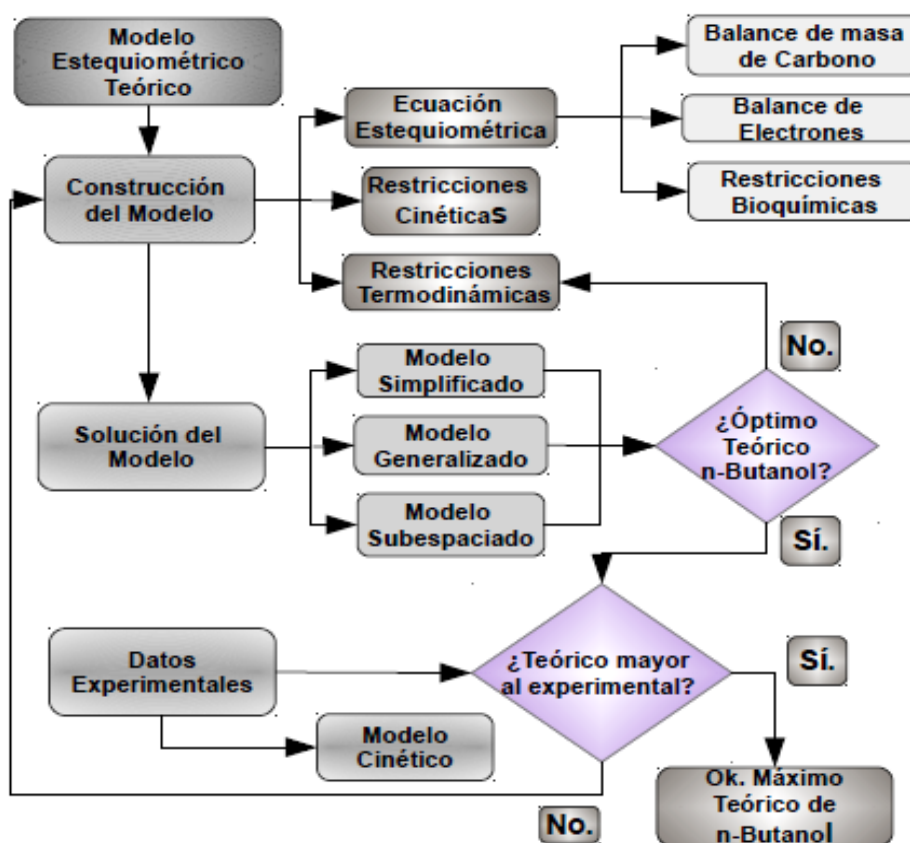
^d LS licuado y sacarificado, ^e Azúcares fermentables y ^f SSF sacarificación y fermentación simultánea.

72 Blaschek et al. Patente N° US 6,358,717 B1 (2002).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

En esta investigación se plantearon, construyeron y solucionaron tres modelos estequiométricos teóricos de la fermentación ABE utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824. También se realizaron pruebas experimentales para la producción de ABE y se simuló o predijo adecuadamente la producción de n-butanol por medio de un modelo cinético estructurado. En la figura 4 está resumido el algoritmo metodológico empleado en el desarrollo de este trabajo.

Figura 4. Algoritmo metodológico



Fuente: Autor.

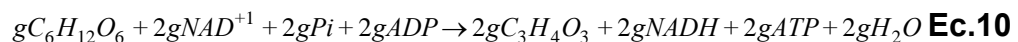
2.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS MODELOS ESTEQUIOMÉTRICOS

La construcción de los modelos estequiométricos estuvo basada en las reacciones de la ruta metabólica de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (figura 1 o anexo A); la ecuación de síntesis de biomasa; restricciones (bioquímicas, termodinámicas y cinéticas) impuestas al sistema y la función objetivo a optimizar.^{8,22} Los tres casos de estudio teóricos planteados se describen detalladamente a continuación.

2.1.1 Caso de estudio I. Construcción del modelo estequiométrico simplificado. Se definió un modelo estequiométrico sencillo con la finalidad de modelar y simular teóricamente la fermentación ABE como un proceso global, es decir el metabolismo celular visto como un todo.

2.1.1.1 Construcción de la ecuación estequiométrica simplificada. La ecuación estequiométrica está compuesta por 28 reacciones, 27 de la ruta metabólica de la fermentación ABE (figura 1 o anexo A) más la ecuación de síntesis de biomasa. Estas reacciones fueron simplificadas de la siguiente manera: la glucólisis como una ecuación neta y tanto la acidogénesis como la solventogénesis como un único proceso.

Glucólisis: el catabolismo de la glucosa suministra las piezas indispensables del metabolismo: energía (ATP), poder reductor (NADH) y piruvato. La ecuación 10 representa la transformación neta de la glucólisis a partir de g moles de glucosa.



Glucosa

Piruvato

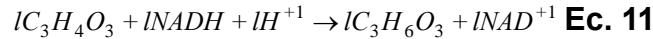
Acidogénesis y solventogénesis: ambas fases se interpretaron como un todo.

8 PAPOUTSAKIS, Efetherios Terry. Op. Cit., p. 20.

22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.

De tal modo que no existe distinción alguna entre el inicio, finalización y transición de cada una de ellas. Las reacciones implicadas pueden escribirse como sigue:

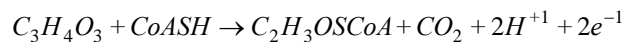
Conversión de piruvato a lactato



Piruvato

Lactato

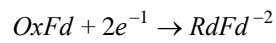
Conversión de piruvato a acetil-CoA: la ferredoxina en *Clostridium* posee la capacidad de transferir dos moles de electrones por mol de acetil-CoA⁷³ acoplados de la siguiente manera:



Piruvato

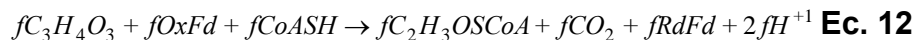
Acetil-CoA

+



Ferredoxina oxidada

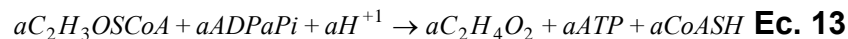
Ferredoxina reducida



Piruvato

Acetil-CoA

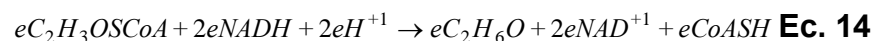
Formación de acetato a partir de acetil-CoA



Acetil-CoA

Acetato

Formación de etanol a partir de acetil-CoA

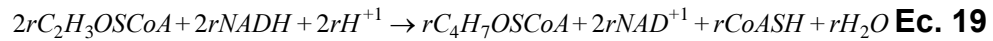


Acetil-CoA

Etanol

73 UYEDA, Kosaku and RABIKOWITZ, Jesse C. Journal de Biology Chemistry. Vol. 246. N°10. (1971): p. 3120-3125.

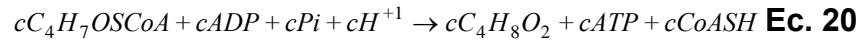
Conversión de acetil-CoA a butiril-CoA



Acetil-CoA

Butiril-CoA

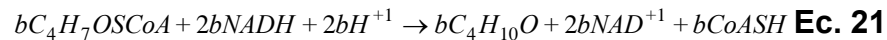
Formación de butírate a partir de butiril-CoA



Butiril-CoA

Butírate

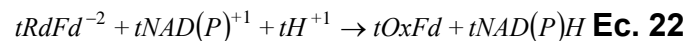
Formación de n-butanol a partir de butiril-CoA



Butiril-CoA

n-Butanol

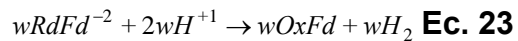
Acoplamiento Ferredoxina NAD(P) reductasa



Ferredoxina reducida

Ferredoxina oxidada

Síntesis de hidrógeno molecular

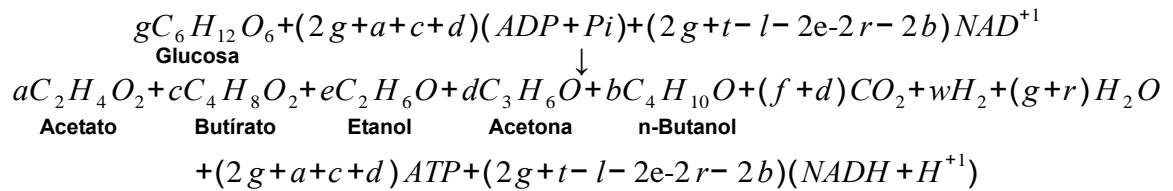


Ferredoxina reducida

Ferredoxina oxidada

Sumando las ecuaciones 10 a 23 resultó la ecuación 24, la cual representa el metabolismo primario de *C. acetobutylicum* sin tener en cuenta la síntesis de la biomasa.

Ecuación estequiométrica neta del metabolismo primario de *C. acetobutylicum*



Ec. 24

2.1.1.2 Construcción de la ecuación de biosíntesis de biomasa a partir de glucosa. No toda la fuente de carbono (glucosa) es utilizada en el metabolismo primario sino que una fracción se consume en el crecimiento celular. Éste proceso va acompañado del gasto de energía (ATP), poder reductor (NADH), nitrógeno (expresado generalmente como NH₃) y micronutrientes. La fórmula empírica promedio para *C. acetobutylicum* se aproximó a **CH₂O_{0.5}N_{0.25}**.⁷⁴ Con base en lo anterior se construyó la ecuación de biosíntesis de biomasa a partir de la glucosa (ecuación 25).

El rendimiento energético (Y_{ATP}) se utilizó para determinar el consumo de ATP en la síntesis de biomasa. Por ejemplo, en el análisis estequiométrico de *Klebsiella pneumoniae*⁷⁵ se empleó un Y_{ATP} de 10.1g de biomasa por mol de ATP y para *Clostridium butyricum*⁷⁶ el Y_{ATP} fue de 8.6g/mol. En el caso de *Clostridium acetobutylicum* dos rendimientos máximos de ATP (Y_{ATP}^{máx}) han sido estimados: uno de 23g/mol⁵³ y otro de 23.8g/mol.⁷⁷ Aunque los rendimientos experimentales de Y_{ATP} oscilaron entre 3.0 y 11.9g/mol,⁵²

En este trabajo por simplicidad adoptó un Y_{ATP} de 10.5g/mol, debido a que es el valor reportado para la mayoría de las bacterias. Una vez definido el Y_{ATP} fue

74 VAN DIJKEN, J. P and HARDER, W. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 17. (1975): p. 15-30.

75 Zeng, AP. et al. *Enzyme and Microbial Technology*. 15. (1993): p. 770-779.

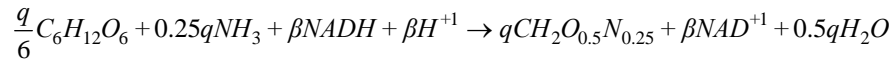
76 CHEN, Xi. et al. *International Journal of Hydrogen Energy*. 31. (2006): p. 539-549.

53 MEYER, C. and PAPOUTSAKIS, E. *Op. Cit.*, p. 42.

77 BAHL, Hubert; ANDERSCH, Wolfram and GOTTSCHALK, Gerhard. *Appl Microbiol Biotechnol*. 15. (1982): p. 201-205.

52 MEYER, C. and PAPOUTSAKIS, E. *Op. Cit.*, p. 42.

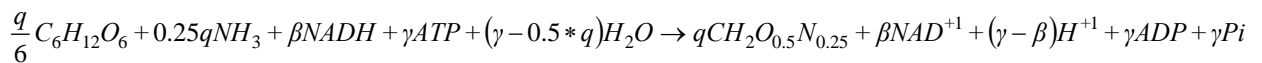
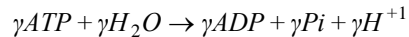
posible estimar la relación entre γ y q ; mientras que la relación entre β y q se calculó mediante un balance de electrones (ecuación 26).⁸



Glucosa

Biomasa

+



Glucosa

Biomasa

Ec. 25

Balance de electrones de la ecuación de biosíntesis de biomasa

$$\frac{q}{6}\Psi_{glucosa} + \beta\Psi_{NADH} - q\Psi_{biomasa} = 0 \quad \text{Ec. 26}$$

Dónde ψ_i es el grado de reducción, definido como el número de electrones disponibles transferibles por mol de sustancia i (anexo B).

Algunos autores han empleado como función objetivo la maximización de biomasa.^{35,36,38} Aprovechando este concepto se fijó la biomasa al máximo alcanzable por las condiciones experimentales definidas en esta investigación (ver sección 2.3).

2.1.1.3 Restricciones bioquímicas

2.1.1.3.1 Intermediarios del metabolismo. Algunas de las reacciones de la ruta metabólica de *C. acetobutylicum* requieren NADPH como poder reductor, pero en esta investigación se utilizó NADH como el único poder reductor. Tal

8 PAPOUTSAKIS, Efetherios Terry. Op. Cit., p. 20.

35 SENGER, Ryan S and PAPOUTSAKIS, Eleftheruis T. Op. Cit., p. 33.

36 LEE, Joungmin. et al. Op. Cit., p. 34.

38 SALIMI, Fahimeh. et al. Op. Cit., p. 35.

simplificación está sustentada en la propiedad bioquímica de la nula o exigua energía que requiere la conversión de NADH a NADPH por medio de las transhidrogenasas.⁸

En el metabolismo el NADH y la ferredoxina (ecuaciones 27 y 28) se consideraron moléculas de carácter cíclico, por lo tanto su cambio neto de masa es nulo. El piruvato, el acetil-CoA y el butiril-CoA (ecuaciones 29 a 31) fueron aproximados a la condición de estado pseudo-estacionario y por ende su acumulación es cero.^{8,22}

NADH: $2g + t - l - 2r - 2e - 2b - \beta = 0$ **Ec. 27**

Ferredoxina reducida (RdFd): $w + t - f - \beta = 0$ **Ec. 28**

Piruvato: $2g - l - f = 0$ **Ec. 29**

Acetil-CoA: **Ec.** $f - a - e - 2d - 2r = 0$ **30**

Butiril-CoA: $r - c - b = 0$ **Ec. 31**

Del ATP generado en la glucólisis y en la producción de los ácidos, solo una parte es utilizada en la síntesis de biomasa y en la reasimilación de los ácidos. Por lo tanto el ATP está en exceso y su restricción puede representarse por una desigualdad (ecuación 32).⁸

ATP: **Ec.** $2g + h + i - m - n - \gamma > 0$ **32**

2.1.1.4 Balance de masa de carbono elemental. Empleando las ecuaciones 24 y 25 se contabilizaron los átomos de carbono y se obtuvo la siguiente ecuación:

$6g - f - 3l - 4d - 2a - 4c - 2e - 4b = 0$ **Ec. 33**

En teoría los balances de masa elemental de hidrógeno u oxígeno pueden emplearse como restricciones del sistema. Pero ésta, como la mayoría de las

8 PAPOUTSAKIS, Efetherios Terry. Op. Cit., p. 20.

22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.

fermentaciones ocurren en medio acuoso y dichos elementos (H y O) exhiben problemas de verificación y medición.⁸ Por tal razón los balances de masa elemental de H y O no se tuvieron en cuenta.

2.1.1.5 Balance de electrones. En virtud de que cada elemento químico de la ecuación estequiométrica debe estar correctamente contabilizado, en consecuencia el balance de electrones (ecuación 34) se satisface implícitamente.⁷⁸ En la ecuación 34 no aparecen aquellos intermediarios cuyo cambio neto de masa es nulo.

$$g\Psi_{glucosa} = a\Psi_{Acetato} + c\Psi_{Butirato} + l\Psi_{Lactato} + d\Psi_{acetona} + e\Psi_{etanol} + b\Psi_{n-butanol} + w\Psi_{Hidrógeno} \quad \text{Ec. 34}$$

2.1.1.6 Restricciones termodinámicas. Suele denominarse rendimiento máximo termodinámico cuando todos los electrones disponibles de la fuente de electrones (glucosa) se transfieren a un único producto.⁷⁸ A partir de la ecuación 34 se determinó el límite superior para cada uno de los productos ($a_{m\acute{a}x}$, $b_{m\acute{a}x}$, $c_{m\acute{a}x}$, $d_{m\acute{a}x}$, $e_{m\acute{a}x}$ y $w_{m\acute{a}x}$) de la fermentación ABE. Adicionalmente se obtuvieron nuevos límites superiores ($a'_{m\acute{a}x}$, $b'_{m\acute{a}x}$, $c'_{m\acute{a}x}$, $d'_{m\acute{a}x}$, $e'_{m\acute{a}x}$ y $w'_{m\acute{a}x}$) aplicando el balance de electrones sin despreciar los efectos del ATP, NADH, CO₂ y H₂. Finalmente, las ecuaciones 35 a 40 simbolizan los límites máximos para:

Acetato: $0 < a < a'_{m\acute{a}x} < a_{m\acute{a}x}$ **Ec. 35**

Butírate: $0 < c < c'_{m\acute{a}x} < c_{m\acute{a}x}$ **Ec. 36**

Acetona: $0 < d < d'_{m\acute{a}x} < d_{m\acute{a}x}$ **Ec. 37**

Etanol: $0 < e < e'_{m\acute{a}x} < e_{m\acute{a}x}$ **Ec. 38**

$0 < b < b'_{m\acute{a}x} < b_{m\acute{a}x}$

Butanol: $0 < w < w'_{m\acute{a}x} < w_{m\acute{a}x}$ **Ec. 39**

Hidrógeno: **Ec. 40**

2.1.1.6.1 Estimación de la energía de Gibbs estándar de formación (ΔG°)

⁸ PAPOUTSAKIS, Efetherios Terry. Op. Cit., p. 20.

⁷⁸ DORAN, M. Pauline. Principio de Ingeniería de los Bioprocesos. España. (1998): p. 80-83.

Debido a que la medición experimental de la energía de Gibbs estándar de formación (ΔG°) para la mayoría de los compuestos es técnicamente complicada, la gran parte de los metabolitos no se han caracterizado termodinámicamente. Entonces, se utilizó eQuilibrator* una interfaz web sencilla diseñada para el análisis de sistemas bioquímicos, que permitió la estimación del ΔG° de los metabolitos o las reacciones a diferentes condiciones. eQuilibrator emplea el método de contribución de grupos para estimar o predecir el ΔG° .⁷⁹

2.1.1.7 Función objetivo

La finalidad de la función objetivo fue maximizar teóricamente la cantidad de n-butanol formada sin ignorar la dinámica de los otros productos extracelulares (acetato, butírate, acetona, etanol, CO_2 y H_2). Para el caso de estudio I se plantearon tres funciones objetivos con sus respectivos factores de peso. La magnitud de los factores de peso fueron establecidos entre 0.01 y 0.1 según el nivel de importancia establecido.²²

2.1.1.7.1 Caso de estudio IA. Maximización de n-butanol Se utilizó como función objetivo la maximización de la producción de n-butanol, debido a que es el principal objetivo de esta investigación.

2.1.1.7.2 Caso de estudio IB. Minimización de ATP. En *C. acetobutylicum* el ATP es generado en la glucólisis, durante la síntesis de acetato y butírate. En este caso de estudio se garantizó el consumo total de glucosa y se minimizó la generación de ATP. De tal manera que las cantidades de acetato y butírate producidas sean mínimas y por consiguiente más átomos de carbonos estén disponibles para la optimización de n-butanol.

2.1.1.7.3 Caso de estudio IC. Minimización de ΔG° . Entre menor sea el

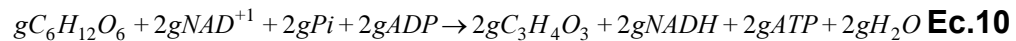
* Milo Lab. Weizmann Institute in Rehovot, Israel. eQuilibrator biochemical thermodynamics calculator. [Visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://equilibrator.weizmann.ac.il/>>
79 MAVROVOUNIOTIS, M. L. 1991; JANKOWSKI, M. D. et al., 2008 y MILO LAB. eQuilibrator biochemical thermodynamics calculator [Visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://equilibrator.weizmann.ac.il/>>
22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.

ΔG° más favorable es la fermentación ABE. Lo anterior motivó a seleccionar como función objetivo la minimización de la energía de Gibbs de la ecuación estequiométrica simplificada neta (ecuación 24).

2.1.2 Caso de estudio II. Construcción del modelo estequiométrico generalizado El caso de estudio I ignoró las distintas rutas de reasimilación de los ácidos y estudió la fermentación como un todo. Ahora bien, con la finalidad de incluir estos fenómenos en el modelo se aplicó una restricción cinética adicional considerando la glucólisis, acidogénesis y solventogénesis como cascadas de eventos dependientes paralelos.

2.1.2.1 Construcción de la ecuación estequiométrica generalizada. Las reacciones pertenecientes a la ecuación estequiométrica generalizada son:

Glucólisis

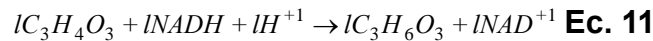


Glucosa

Piruvato

Acidogénesis: como no se tiene certeza de la cantidad de moles de piruvato que reaccionan en dirección de la síntesis de acetato, butírate y eventualmente lactato (figura 5); se le asignaron letras (l,f,h,i,t) a los moles involucrados en cada una de las reacciones consecutivas descritas así:

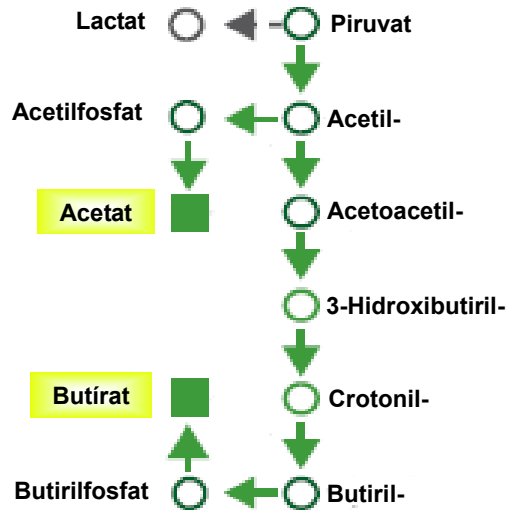
Conversión de piruvato a lactato



Piruvato

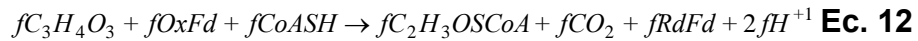
Lactato

Figura 5. Esquema de la acidogénesis.



Adaptado de: LÜTKE-EVERSLOH, Tina and BAHL, Hubert. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. Current opinion in Biotechnology. (2011): 22. p. 634-647.

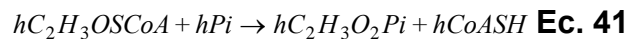
Conversión de piruvato a acetil-CoA



Piruvato

Acetil-CoA

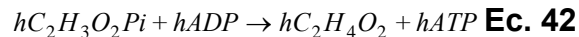
Conversión de acetil-CoA a acetilfosfato



Acetil-CoA

Acetilfosfato

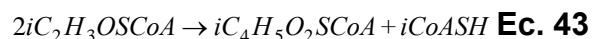
Formación de acetato a partir del acetilfosfato



Acetilfosfato

Acetato

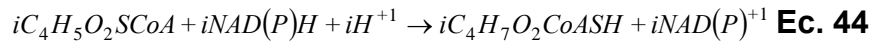
Conversión de acetil-CoA a acetoacetil-CoA



Acetil-CoA

Acetoacetil-CoA

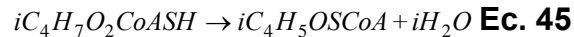
Conversión de acetoacetil-CoA a β-hidroxiacetil-CoA



Acetoacetil-CoA

β-hidroxiacetil-CoA

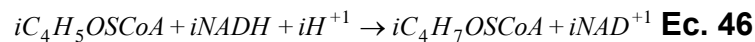
Deshidratación de β-hidroxiacetil-CoA a crotonil-CoA



β-hidroxiacetil-CoA

Crotonil-CoA

Conversión de crotonil-CoA a butiril-CoA



Crotonil-CoA

Butiril-CoA

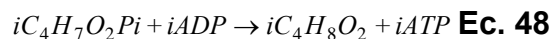
Conversión de butiril-CoA a butirilfosfato



Butiril-CoA

Butirilfosfato

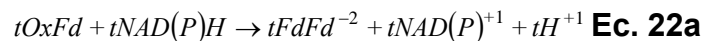
Formación de butírate a partir de butirilfosfato



Butirilfosfato

Butirato

Acoplamiento ferredoxina NAD(P)H oxidoreductasa



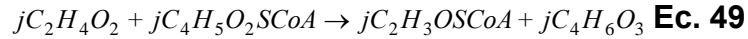
Ferredoxina oxidada

Ferredoxina reducida

Solventogénesis: en esta etapa ocurre la biosíntesis de acetona, n-butanol y etanol (figura 6) debido a la reasimilación del acetato y butírate, al mismo tiempo que se consume la glucosa. Para cada una de las reacciones implicadas se

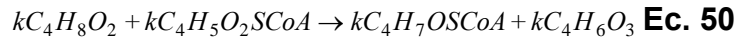
obtuvo:

Reasimilación de acetato vía acetoacetyl-CoA acetato CoA-transferasa



Acetato Acetoacetyl-CoA Acetyl-CoA Acetoacetato

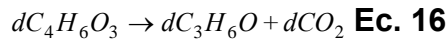
Reasimilación de butírateo vía Acetoacetyl-CoA butírateo CoA-transferasa



Butírateo Acetoacetyl-CoA Butíril-CoA Acetoacetato

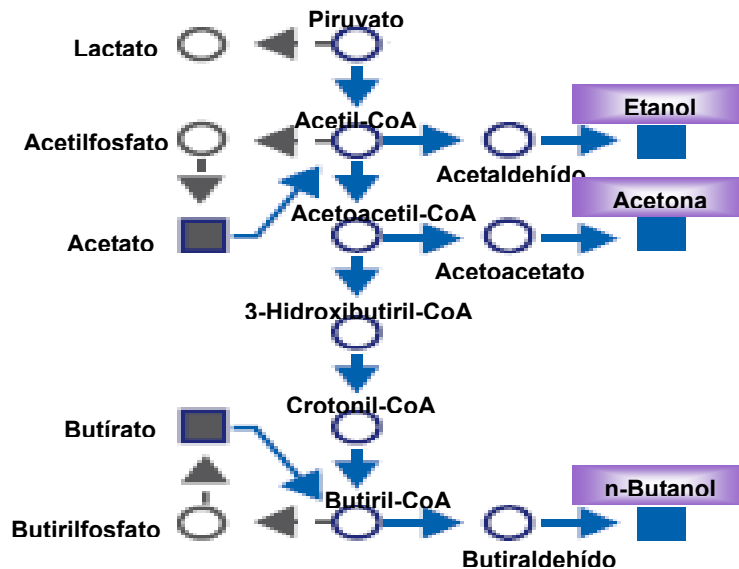
Síntesis de acetona

Los coeficientes j+k=d



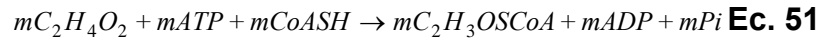
Acetoacetato Acetona

Figura 6. Esquema de la solventogénesis.



Modificado de: LÜTKE-EVERSLOH, Tina and BAHL, Hubert. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. Current opinion in Biotechnology. (2011): 22. p. 634-647.

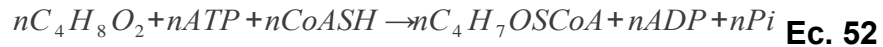
Reasimilación de acetato vía fosfotrans-acetilasa y acetato quinasa



Acetato

Acetil-CoA

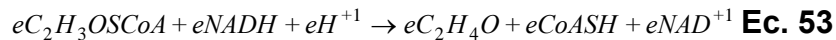
Reasimilación de butírate vía fosfotrans-butilasa y butírate quinasa



Butírate

Butiril-CoA

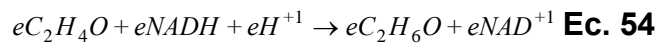
Reducción de acetil-CoA a acetaldehído



Acetil-CoA

Acetaldehído

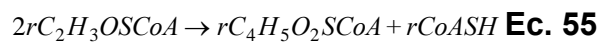
Reducción de acetaldehído a etanol



Acetaldehído

Etanol

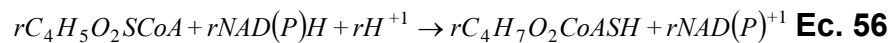
Formación del acetoacetil-CoA a partir del acetil-CoA



Acetil-CoA

Acetoacetil-CoA

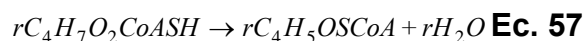
Conversión del acetoacetil-CoA a β -hidroxibutil-CoA



Acetoacetil-CoA

β -hidroxibutil-CoA

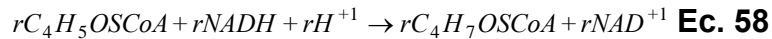
Deshidratación de β -hidroxibutil-CoA a crotonil-CoA



β -hidroxibutil-CoA

Crotonil-CoA

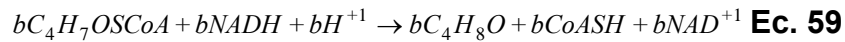
Conversión de crotonil-CoA a butiril-CoA



Crotonil-CoA

Butiril-CoA

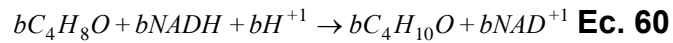
Reducción de butiril-CoA a butiraldehído



Butiril-CoA

Butiraldehído

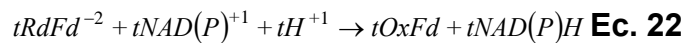
Reducción de butiraldehído a n-butanol



Butiraldehído

n-Butanol

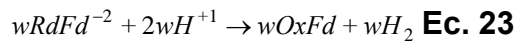
Acoplamiento ferredoxina NAD(P) reductasa



Ferredoxina reducida

Ferredoxina oxidada

Síntesis de hidrógeno molecular



Ferredoxina reducida

Ferredoxina

oxidada

2.1.2.2 Restricciones bioquímicas En la tabla 11 se resumen las restricciones bioquímicas establecidas para el modelo estequiométrico generalizado.

Tabla 11. Restricciones bioquímicas modelo estequiométrico generalizado

Balace	Restricción
Piruvato	$2g - l - f = 0$
Acetil-CoA	$f + j + m - h - e - 2i - 2r - 2(j+k) = 0$
Butiril-CoA	$k + n + r - b = 0$
NADH	$2g + t - l - 2i - 2r - 2e - 2b - \beta = 0$
Ferredoxina (FdRd)	$w + t - f - \beta = 0$
ATP	$2g + h + i - m - n - \gamma > 0$
Carbono elemental	$6g + 2m + 4n - 3l - f - 2h - 2j - 2e - 4i - 4b = 0$
Electrones	$24g + 8m + 20n + 4k - 2w - 8j - 8h - 12e - 12l - 20i - 24b = 0$
Acetona/Acetoacetato/Acetoacetyl-CoA	$j + k = d$
Acetato	$h - j - m = a > 0$
Butírate	$l - k - n = c > 0$

Fuente: Autor.

2.1.2.3 Restricciones termodinámicas

Las mismas estudiadas en la sección 2.1.1.6.

2.1.2.4 Restricciones Cinéticas

Desai, Nielsen y Papoutsakis (1999) a partir de la información cinético-enzimática de ensayos *in vitro* para acetato/butírate CoA-transferasa³² propusieron la siguiente relación para la reasimilación de los ácidos:

$$\frac{r_{upAB}}{r_{upAC}} = 0.315 \frac{[AB]}{[AC]}$$

r_{upAB} : Velocidad de reasimilación de ácido butírico.

r_{upAC} : Velocidad de reasimilación de ácido acético.

[AB]: Concentración de ácido butírico.

[AC]: Concentración de ácido acético.

0.315 es el parámetro de selectividad para ambas reacciones.

Este trabajo replanteó la relación cinética de reasimilación de los ácidos²² en términos estequiométricos (ecuación 61) de la siguiente manera:

32 WIESENBERN, Dennis P; RUDOLPH, Frederick B and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 30.
22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.

$$\frac{k}{j} = 0.315 \quad \text{Ec. 61}$$

Donde k y j son las cantidades de butírate y acetato reasimilados respectivamente.

2.1.2.5 Función objetivo

Se maximizó la cantidad de n-butanol formada.

2.1.3 Caso de estudio III. Construcción del modelo estequiométrico subespaciado En este modelo estequiométrico se utilizaron las mismas ecuaciones del caso de estudio II e impusieron restricciones termodinámicas adicionales. Básicamente se construyó dividiendo el modelo estequiométrico generalizado en dos partes. La primera parte optimizó la acidogénesis como un evento independiente de la solventogénesis. En la segunda optimizó el n-butanol condicionado a los ácidos formados en la acidogénesis y a las restricciones termodinámicas adicionales.

2.1.3.1 Construcción de la ecuación estequiométrica subespaciada La primera parte consta solamente de las ecuaciones de la acidogénesis del modelo estequiométrico generalizado (ecuaciones 10, 11, 12, 41 a 48). La segunda fue el mismo modelo estequiométrico generalizado sujeto a la optimización de la acidogénesis.

2.1.3.1.1 Parte I. Optimización de la acidogénesis

2.1.3.1.1.1 Restricciones Única y exclusivamente las restricciones correspondientes a los ácidos (tabla 11 y las ecuaciones 35, 36 y 62).

2.1.3.1.1.2 Restricción termodinámica de eficiencia La eficiencia termodinámica se define como la relación entre la energía consumida y la energía

disponible. En términos metabólicos puede escribirse por medio de la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
 & A + B \rightarrow C + D; \Delta G_1^{\circ} \\
 & \quad \quad \quad + \\
 & nADP + nPi \rightarrow nATP; \Delta G_{ATP}^{\circ} \\
 \hline
 & A + B + nADP + nPi \rightarrow C + D + nATP; \Delta G_T^{\circ} \\
 & \text{Eficiencia: } \varepsilon = \frac{n\Delta\Delta_{ATP}^{\circ}}{\Delta G_1^{\circ}} \quad \mathbf{Ec. 62} \\
 & \varepsilon * (\Delta G_1^{\circ} - n\Delta\Delta_{ATP}^{\circ}) - n\Delta\Delta_{ATP}^{\circ} = 0
 \end{aligned}$$

Los límites superior e inferior de la eficiencia en la acidogénesis se fijan cuando el metabolismo se dirige exclusivamente a la formación de acetato o butírate. Matemáticamente la eficiencia (ecuación 62) es una restricción no lineal.

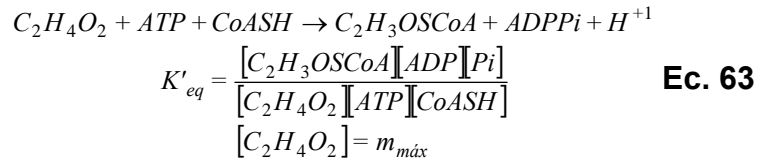
2.1.3.1.1.3 Función objetivo Se utilizó como función objetivo la generación de ATP máxima ajustada a diferentes factores de peso, los cuales dependiendo del nivel de importancia o prioridad del metabolito oscilaron entre 0.01 y 0.1.²² El butírate por ser un precursor clave en la síntesis de n-butanol,⁶⁰ se le fijó el factor de peso más alto (0.1) y para el acetato se establecieron tres niveles 0.01, 0.05 y 0.1 indicando prioridad baja, media y alta respectivamente.

2.1.3.1.2 Parte II. Optimización del n-butanol

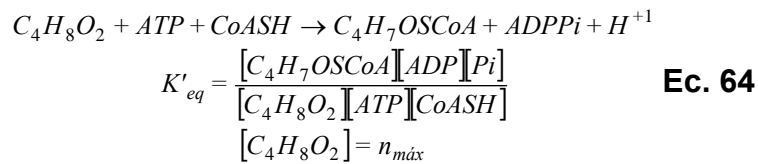
2.1.3.1.2.1 Restricciones termodinámicas adicionales Se fijaron los límites de acetato y butírate mediante un análisis termodinámico al inicio de la solventogénesis. De modo similar se fijó el valor mínimo de etanol. En el anexo C se presenta detalladamente los cálculos de las raíces del sistema de ecuaciones no lineales para cada uno de los grupos de reacciones planteadas.

22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.
60 TASHIRO, Yukihiro. et al. Op. Cit., p. 44.

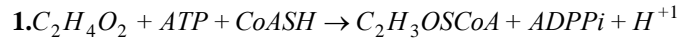
2.1.3.1.2.2 Acetato máximo Considerando la reacción de equilibrio de reasimilación de acetato vía acetato quinasa/fosfotrans-acetilasa como una reacción independiente (ecuación 63), se obtuvo la cantidad máxima de acetato reasimilada por esta ruta.



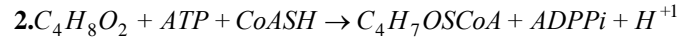
2.1.3.1.2.3 Butírate máximo Similarmente a lo planteado para el acetato se obtuvo la reasimilación máxima de butírate vía butírate quinasa/fosfotrans-butirilasa (ecuación 64).



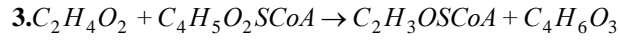
2.1.3.1.2.4 Reasimilación de acetato y butírate Para el mecanismo completo de reasimilación de los ácidos se establecieron los siguientes equilibrios simultáneos: acetoacetyl-CoA acetato/butírate CoA-transferasa, fosfotrans-acetilasa/acetato quinasa y fosfotrans-butirilasa /butírate quinasa. Los cuales se agruparon en la ecuación 65.



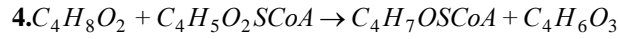
$$K'_1 = \frac{[C_2H_3OSCoA][ADP][Pi]}{[C_2H_4O_2][ATP][CoASH]}$$



$$K'_2 = \frac{[C_4H_7OSCoA][ADP][Pi]}{[C_4H_8O_2][ATP][CoASH]}$$



$$K'_3 = \frac{[C_4H_6O_3][C_2H_3OSCoA]}{[C_2H_4O_2][C_4H_5O_2SCoA]}$$

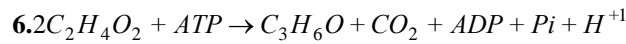


$$K'_4 = \frac{[C_4H_6O_3][C_4H_7OSCoA]}{[C_4H_8O_2][C_4H_5O_2SCoA]}$$

$$[C_2H_4O_2] = j_{min}; [C_4H_8O_2] = k_{min}$$

Reemplazarlas relaciones 3 y 4 por 5 y 6:

$$5. [C_4H_8O_2] - 0.315 * [C_2H_4O_2] = 0$$



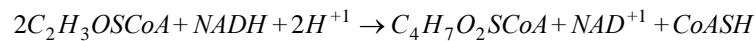
$$K'_6 = \frac{[C_3H_6O][CO_2][ADP][Pi]}{[C_2H_4O_2]^2[ATP]}$$

Ec. 65

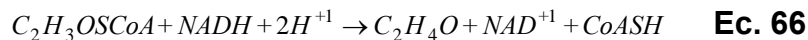
La solución simultánea de las reacciones 1, 2, 3 y 4 de la ecuación 65 presentó regiones no factibles debido a las singularidades del sistema, para corregir este inconveniente y determinar la mínima relación acetato/butirato se reemplazaron las reacciones 3 y 4 por la relación 5 y la reacción 6 respectivamente.

2.1.3.1.2.5 Etanol mínimo

Con base en la competencia entre de β -hidroxibitiril-CoA y acetaldehído a partir del Acetil-CoA por el NADH, se estimó la cantidad de etanol mínimo (ecuación 66).



$$K'_{eq} = \frac{[C_4H_7O_2SCoA][NAD^{+1}][CoASH]}{[C_2H_3OSCoA]^2[NADH]}$$



$$K'_{eq} = \frac{[C_2H_4O][NAD^{+1}][CoASH]}{[C_2H_3OSCoA][NADH]}$$

$$[C_2H_4O] = [C_2H_6O] = e_{min}$$

2.1.3.1.2.2 Función objetivo Se maximizó la cantidad de n-butanol producida.

Una vez completado todos los elementos del modelo (ecuación estequiométrica, restricciones y función objetivo) el siguiente paso fue solucionarlo. Cabe aclarar que para aquellos modelos donde la función objetivo y las restricciones son lineales, el problema de optimización se resolvió por programación lineal y cuando se presentaron ecuaciones no lineales, los métodos de la programación no lineal fueron los aplicados.

2.2 SOLUCIÓN DEL MODELO ESTEQUIOMÉTRICO

Uno de los softwares utilizado en la solución de los modelos fue GAMS (General Algebraic Modeling System) versión de prueba 24.0.2. Este es un sistema de modelado de alto nivel para la optimización y programación matemática. Se trata de un lenguaje compilador y programas de cómputo integrados. GAMS está diseñado para aplicaciones a gran escala y problemas de elevada complejidad.⁸⁰

El problema de optimización para la casos de estudio I, II y III fue solucionado con ayuda del servidor NEOS* (Network-Enabled Optimization System) desarrollado por la Universidad de Wisconsin, debido a que ofrece un servicio gratuito en Internet para la solución de estos tipo de problemas de optimización. NEOS proporciona un enfoque simple para la solución de una amplia variedad de estudios sobre optimización y facilita múltiples interfaces para el acceso a los sistema de cómputo.^{81,82,83}

80 ROSENTHAL, Richard E. 2012. [En línea, visitado el 12 de mayo del 2013]. Disponible en internet: <<http://www.gams.com/docs/document.htm>>

* NEOS Server [En línea, visitado el 12 de mayo del 2013]. Disponible en internet: <<http://www.neos-server.org/neos/>>

81 GROPP, W. AND MORÉ, J. Optimization Environments and the NEOS Server. Approximation Theory and Optimization. BUHMANN, M. D. AND ISERLES, A. Eds. Cambridge University Press. (1997): p. 167-182.

82 CZYZYK, J. MESNIER, M. AND MORÉ, J. IEEE Journal on Computational Science and Engineering, Vol 5, (1998): p. 68-75.

83 DOLAN, E. The NEOS Server 4.0 Administrative Guide. 2001 [En línea, visitado el 12 de mayo del 2013]. Disponible en internet: <info.mcs.anl.gov/pub/tech_reports/reports/TM-250.pdf>

GAMS⁸⁴ y NOES Server⁸⁵ son herramientas útiles en la solución de problemas característicos de la ingeniería metabólica (AFB/AFV) por programación lineal o no lineal según el caso. La implementación de los conceptos de optimización global²² aseguró el cálculo del óptimo máximo de n-butanol en la región factible. Dentro de las herramientas de cómputo disponibles se usó la opción BARON,⁸⁶ la cual es idónea para solución de estos tipos de modelos matemáticos. En el anexo D se detalla el código de programación utilizado en los casos de optimización de esta investigación.

2.3 SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.3.1 Recuperación y medios de mantenimiento de la cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Se preparó el medio de recuperación de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 con los siguientes componentes: glucosa 4g/L; peptona 10g/L; almidón soluble 1g/L; extracto de levadura 5g/L; NaCl 5g/L; extracto de carne 10g/L; acetato de sodio 3g/L; resazurina 0.1mg/L.⁸⁷ Después se calentó la ampolla de la cepa liofilizada y se rompió por la adición de unas gotas de agua. Paso seguido fue removido el material bajo condiciones anaerobias (atmósfera de nitrógeno) y se adicionaron 0.5mL del medio de cultivo líquido donde se logró la rehidratación del microorganismo. La cepa rehidratada fue inoculada en los medios de cultivo sólidos y líquidos, y se dejó crecer por 8 horas. Finalmente los cultivos fueron almacenados a 5°C.⁸⁸

Para el mantenimiento de la cepa cada 15 días se prepararon medios de cultivo

84 WANG, Shaohua. et al. Appl Microbiol Biotechnol. 93. (2012): p. 1021–1030.

85 NEOS Server [En línea, visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://www.neos-guide.org/content/metabolic-engineering-problem>>

22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.

86 NEOS Server. [En línea, visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://www.neos-server.org/neos/solvers/go:BARON/GAMS.html>>.

87 ATCC. [En línea, visitado el 15 noviembre 2009]. Disponible en internet: <<https://www.atcc.org/products/all/824.aspx#2F93F855AA1943AC8F4392E86118D08A>>

88 DMSZ, Cultivation of Anaerobes. [En línea, visitado el 15 noviembre 2009]. Disponible en internet: <http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=11>

líquidos, los cuales fueron inoculados y se dejaron crecer mínimo por 8 horas, y cada 30 días se hizo el mismo procedimiento para medios de cultivo sólidos y después fueron almacenados a 5°C.

2.3.2 Pruebas de fermentación preliminares. Las etapas empleadas en la preparación de medios de cultivo de mantenimiento y de fermentación fueron las siguientes:

1. Reactivación del microorganismo
2. Inoculación del microorganismo reactivado
3. Fermentación
4. Medición de la concentración de biomasa, glucosa y productos

2.3.2.1 Procedimiento general del medio de cultivo de mantenimiento o preinóculo

- a. El medio de mantenimiento de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 se preparó con los siguientes nutrientes en un litro de agua destilada: glucosa 4g; peptona 10g; almidón soluble 1g; extracto de levadura 5g; NaCl 5g; extracto de carne 10g; acetato de sodio 3g; resazurina 0.1 mg.
- b. Al medio de mantenimiento se le agregó un 10% de agua destilada adicional.
- c. El medio de cultivo se calentó suavemente hasta burbujeo y reducción del volumen un 10%.
- d. Posteriormente se introdujo en la cámara de anaerobiosis en atmósfera de N₂ para mantenerla libre de O₂.
- e. Después de enfriado el medio se le adicionó 0.5 g/l de cisteína clorohidratada bajo atmósfera de N₂. Se llenaron viales de 20mL con 15mL y las botellas de 500mL con 270mL de medio.
- f. Los viales y las botellas se sellaron con corchos de nitrilo y tapa metálica y fueron esterilizados en una autoclave a 15psi de presión por 15 minutos.
- g. Finalmente se inoculó con un 10% en volumen y se dejó incubar por 24

horas.

2.3.2.2 Preparación medios de cultivo de fermentación

- a. El medio de fermentación de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 se preparó con los siguientes nutrientes en un litro de agua destilada: glucosa 20-60; extracto de levadura 5; KH_2PO_4 0,75; K_2HPO_4 0,75; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,20; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01; MnSO_4 0,01; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2; NaCl 1; resazurina 0,1mg.⁴³
- b. Al medio de fermentación se le agregó un 10% de agua destilada adicional.
- c. El medio de cultivo se calentó suavemente hasta burbujeo y reducción del volumen un 10%.
- d. El medio de cultivo se introdujo en la cámara de anaerobiosis en atmósfera de N_2 para mantenerla libre de O_2 .
- e. Después de enfriado al medio se adicionó 0,5 g/l de cisteína clorohidratada bajo la atmósfera de N_2 . Se llenaron las botellas de 500mL con 270mL de medio.
- f. Se sellaron las botellas con corchos de nitrilo y tapa metálica. Estos fueron esterilizadas en una autoclave a 15psi de presión por 15 minutos.
- g. Una vez esterilizados se inoculó con un 10% en volumen y se dejó incubar por 24 horas.
- h. Finalmente el medio de fermentación fue Inoculado con la cepa del medio de mantenimiento (preinóculo) y se inició la fermentación por 24h. Las muestras se tomaron cada 3 ó 4 horas según el caso.

2.3.2.3 Medición de la concentración de biomasa Se elaboró una curva de calibración de concentración de biomasa (peso seco) de la siguiente manera: se construyeron tres cajas pequeñas de papel aluminio, las cuales fueron marcadas y secadas a 105°C durante 8 horas. Seguidamente se colocaron en una cámara desecadora hasta peso constante y después fueron pesadas. El cultivo celular fue centrifugado a 10000 gravedades por 15 minutos y se desechó el sobrenadante; este procedimiento se realizó tres veces evitando la pérdida de

43 YANG, Xiaoping and TSAO, George G. Op. Cit., p. 36.

células. El pellet o células resultantes fueron resuspendidas en un volumen conocido de agua destilada y depositado en las cajas de papel aluminio. Antes de ser pesado el sedimento se secó a 105°C durante 6 horas y se colocó en un desecador hasta peso constante. A continuación fueron preparadas diluciones seriadas de las células resuspendidas y se procedió a medir la densidad óptica a 600nm, de esta manera se correlacionó la absorbancia con la concentración del peso seco obteniéndose la curva de calibración (anexo E).⁸⁹

2.3.2.4 Medición de la concentración de glucosa Se utilizó la prueba enzimática de la glucosa oxidasa (BioSystems S.A.) para determinar la concentración de glucosa.^{23,49,70}

2.3.2.5 Medición de la concentración de productos La concentración de los metabolitos solubles (acetato, butírate, acetona, etanol y n-butanol) en la fase líquida fue estimada después de la eliminación de las células por centrifugado. Los análisis fueron desarrollados por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC).⁹⁰

2.3.2.5.1 HPLC El equipo de HPLC empleado está equipado con una columna supelcogel C-610H (dimensiones 300 x 7.8mm) y un detector de índice de refracción. Para el análisis, la fase móvil (ácido sulfúrico 0,5 mM) fue bombeado isocráticamente durante 30 min a una velocidad de flujo de 0.8mL/min y una temperatura de 30°C. A cada uno de los metabolitos se le realizó su respectiva curva de calibración (anexo E).

2.3.3 Fermentación en un biorreactor de pruebas Para *C. acetobutylicum* ATCC 824 varias investigaciones han producido altos niveles de n-butanol en el

89 MADIGAN, Michael. T. et al. Brock. Biología de los Microorganismos. Pearson. 10 ed. España. (2009): p. 168-172.

23 TASHIRO, Yukihiro. et al. Op. Cit., p 24.

49 QURESHI, Nasib. et al. Op. Cit., p 42.

70 EZEJI, T. QURESHI, N. AND BLASCHEK, H. Op. Cit., p. 46.

90 GONZALEZ-PAJUELO, María. et al. Metabolic Engineering. 7. (2005): p. 329-336.

intervalo de pH entre 4.5 y 5.5.^{9,51,91} Entonces este trabajo seleccionó como el pH de operación de 5.0 debido a que fue el nivel donde generalmente se obtiene la máxima cantidad de n-butanol.^{48,51,92,93}

2.3.3.1 Fermentación sin control de pH Los experimentos se llevaron a cabo en un fermentador BIOFLO 110 de 5L con un volumen operacional de 2L, en modo de operación discontinuo bajo condiciones estrictas de anaerobiosis mediante el burbujeo de nitrógeno (figura 7). Este fue cargado con una concentración inicial de 40g/L de glucosa grado industrial y el medio de fermentación (ver sección 2.3.2.2.). Antes de iniciar la fermentación, el biorreactor fue esterilizado en una autoclave a 121°C de temperatura y 15psi de presión durante 15 minutos. Después se agregó 10%v/v de inóculo (ver sección 2.3.2.1). La fermentación duró 36 horas, durante todo el proceso fermentativo la temperatura y la agitación se mantuvieron constantes a 37°C y 200rpm respectivamente. Cada tres horas se midió el pH y se tomaron muestras del caldo de fermentación para evaluar la concentración de sustrato, células y metabolitos.

9 JONES, David T and WOODS David R. Op. Cit., p. 20.

51 WALTER, K; MERMELSTEIN, L. and PAPOUTSAKIS, T. Op. Cit., p. 42.

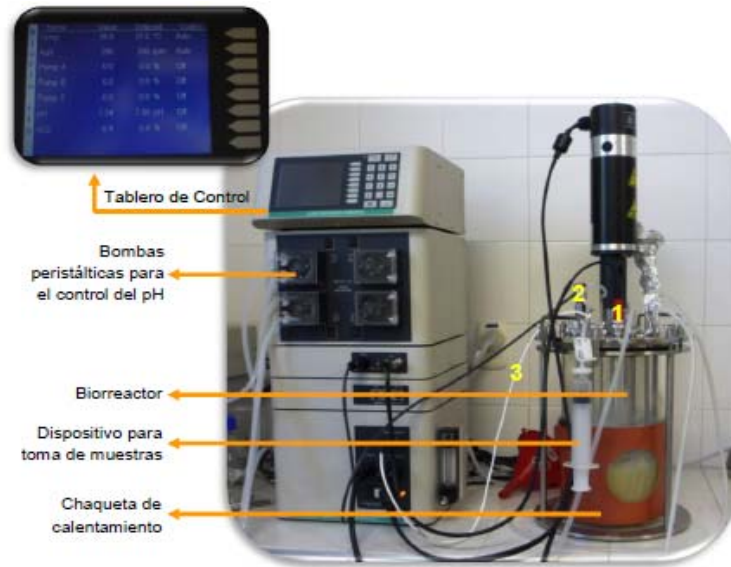
91 HUSEMANN, Michael H. W and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 32. (1988): p. 843-852.

48 QURESHI, N and MADDOX, I. S. Op. Cit., p. 42.

92 MONOT, Frederic. et al. *Appl Microbiol Biotechnol*. 19. (1984) : p. 422-426.

93 HARRIS, Latonia M. et al. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 67. (2000): p. 1-11.

Figura 7. Montaje experimental del biorreactor de pruebas



Montaje experimental para la fermentación ABE. 1) Sensor de Oxígeno; 2) Sensor de pH; 3) Sensor de Temperatura.



Caldo de la fermentación al principio y al final de la misma.

2.3.3.2 Fermentación con control de pH Los experimentos se llevaron a cabo en un fermentador BIOFLO 110 de 5L con un volumen operacional de 2L, en modo de operación discontinuo bajo condiciones estrictas de anaerobiosis mediante el burbujeo de nitrógeno. Este fue cargado con una concentración inicial de 40g/L de glucosa grado industrial y el medio de fermentación (ver sección 2.3.2.2. a). Antes de iniciar la fermentación, el biorreactor fue esterilizado en una autoclave a 121°C de temperatura y 15psi de presión durante 15 minutos aproximadamente. Después se agregó 10%v/v de inóculo (ver sección 2.3.2.1). La fermentación duró 48 horas, mientras todo el proceso fermentativo la temperatura, la agitación y el pH se mantuvieron constantes a 37°C, 200rpm y 5.0

respectivamente. El control de pH fue realizado automáticamente por el equipo empleando NaOH 1.5N y/o H₂SO₄ 1.5N. Cada tres horas se tomaron muestras del caldo de fermentación para evaluar la concentración de sustrato, células y metabolitos.

2.4 MODELADO CINÉTICO

Se propuso un modelo cinético estructurado para *C. acetobutylicum* ATCC 824 con base en el planteamiento matemático de Shinto, H. et al., 2007 (tabla 6) y los balance de masa de los metabolitos involucrados en la ruta metabólica⁴⁶ (anexo F). Las ecuaciones diferenciales que describen la dinámica de la fermentación ABE fueron solucionadas utilizando Matlab versión 7.0.4.

Para la estimación de los parámetros cinéticos del modelo se utilizaron tres conjuntos de datos experimentales: los obtenidos por Fuciños y Pallares (2011) en la fermentación *batch* sin control de pH,⁹⁴ los obtenidos por Rojas y González (2011) en la fermentación *batch* a pH 5.0 constante⁹⁵ y los realizados en esta investigación (ver secciones 2.3.3.1. y 2.3.3.2.); posibilitando así la simulación y predicción de los metabolitos extracelulares de la fermentación ABE.

46 SHINTO, Hideaki. et al. Op. Cit., p. 40.

94 FUCIÑOS, Viviana y PALLARES, Andrea. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. (2011).

95 ROJAS, Cindy y GONZÁLEZ, Nancy. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. (2011).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ECUACIÓN DE BIOSÍNTESIS DE BIOMASA A PARTIR DE GLUCOSA

En la tabla 12 se presentan las relaciones y los coeficientes estequiométricos estimados para ecuación bioquímica de síntesis de biomasa (ecuación 25).

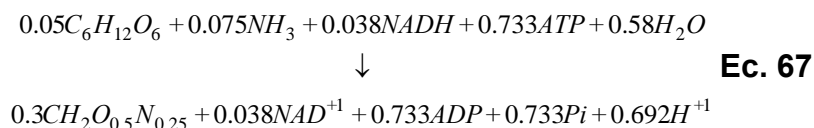
Tabla 12. Coeficientes de la ecuación bioquímica de biosíntesis de biomasa

Sustancia	Expresión como función de la biomasa	Valor [mol]
Biomasa	q	0.300
ATP	$\gamma = (73/30) \square q$	0.730
NADH	$\beta = 0.125 \square q$	3.75×10^{-2}

Fuente: Autor

La ecuación 67 representa la biosíntesis de biomasa para *C. acetobutylicum* ATCC 824 y se construyó reemplazando los datos de la tabla 12 en la ecuación 25. De la cual se infiere que bajo las condiciones empleadas el 36.5% del ATP y el 1.875% del NADH resultantes de la glucólisis fueron utilizados en la biosíntesis de la biomasa; el restante quedó disponible para el metabolismo primario u otros requerimientos celulares.

Ecuación de biosíntesis de biomasa a partir de glucosa para *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824



3.2 LÍMITES SUPERIORES DE LOS PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN ABE

Los límites superiores calculados o espacios de solución factible para lactato, acetato, butírate, acetona, n-butanol, etanol e hidrógeno se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Límites superiores de los productos de la fermentación ABE

Producto	Intervalo posible I	Intervalo posible II
Lactato	$0 < l < 2.0$	$0 < l < 2.0$
Acetato	$0 < a < 3.0$	$0 < a < 2.0$
Butírate	$0 < c < 1.2$	$0 < c < 1.0$
Acetona	$0 < d < 1.5$	$0 < d < 1.0$
Etanol	$0 < e < 2.0$	$0 < e < 2.0$
n-Butanol	$0 < b < 1.0$	$0 < b < 1.0$
Hidrógeno	$0 < w < 12$	$0 < w < 6$

Fuente: Autor.

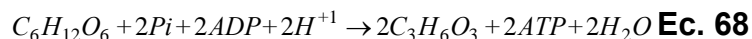
En la tabla 13 el intervalo posible I son las regiones probables estimadas con el balance de electrones (ecuación 34) para cada metabolito sin tener en cuenta el metabolismo celular. El intervalo posible II son aquellas regiones factibles calculadas a partir de la conexión entre el balance de electrones (ecuación 34) y la ruta metabólica de *C. acetobutylicum* ATCC 824.

La diferencia entre el intervalo posible I y el II, es que el primero ignora por completo la dinámica del NADH, ATP e hidrógeno molecular; en cambio el intervalo posible II no lo hace. Una consecuencia directa de no omitir la dinámica del metabolismo fue una ligera reducción del espacio probable de solución para el acetato, acetona, butírate e hidrógeno molecular. Por consiguiente, el número de soluciones óptimas de la fermentación ABE se acotaron.

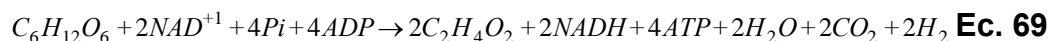
El intervalo posible II, o espacio de solución, bioquímicamente representa la reacción neta de formación cuando el metabolismo se dirige exclusivamente hacia la formación de un único producto. Por ejemplo: la ecuación 68 indica la cantidad

máxima de moles de lactato (2moles) formados por mol de glucosa consumida, y a su vez este proceso se caracteriza por la generación de 2moles de ATP. Las reacciones particulares de acetato, butírate, acetona, etanol y n-butanol fueron representadas mediante de las ecuaciones 69 a 73.

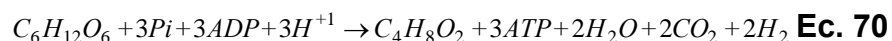
Formación de lactato:



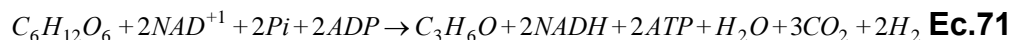
Formación de acetato:



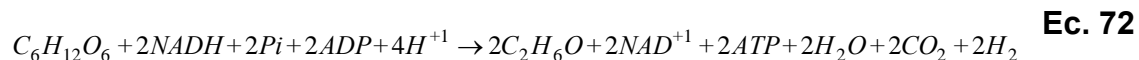
Formación de butírate



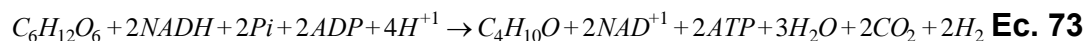
Formación de acetona



Formación de etanol



Formación de n-butanol



La ecuación 69 no solo fijó el máximo de acetato sino también el extremo superior de ATP (4moles) por mol de glucosa consumida en la fermentación ABE. Si solo se formara butírate (ecuación 70), el máximo de ATP serían 3moles. Entonces las ecuaciones 69 y 70 numéricamente establecieron que al final de la acidogénesis el ATP generado estará entre 3 y 4moles. Es más, tanto la formación de acetato

como la de butírate conservaron la cantidad de NADH producida en la glucólisis y en ambas reacciones se formaron 2 moles de H₂ y 2 moles de CO₂.

En la ruta de producción de acetona (ecuación 71) no varió el NADH y el ATP previamente sintetizados en la glucólisis. La síntesis de etanol (ecuación 72) y la de n-butanol (ecuación 73) se caracterizaron por la necesidad de NADH, esto significa que además de consumir el NADH producido en la glucólisis necesitaron una fracción adicional. La producción de H₂ y CO₂ en las rutas de síntesis de los solventes ABE (ecuaciones 71 a 73) fueron iguales a las observadas para el acetato y butírate; salvo en la ecuación 71 (acetona) donde se produjeron 3 moles de CO₂.

La ecuación 73 es la solución *trivial o máximo teórico* de n-butanol alcanzable cuando los demás productos no son sintetizados. Esta ecuación teóricamente sugiere que la biosíntesis de n-butanol en *C. acetobutylicum* requiere de poder reductor (NADH) suplementario al producido en la glucólisis. **A la misma conclusión llegó Tashiro, Y. et al., (2004) para *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 en cultivos por lotes alimentados.⁶⁰ De este resultado probablemente “la producción de n-butanol está relacionada directa o indirectamente con la ferredoxina y el transporte de electrones a nivel celular”.**

3.3 CASO DE ESTUDIO I. MODELO ESTEQUIOMÉTRICO SIMPLIFICADO

Las restricciones bioquímicas (ecuaciones 27 a 31), el balance de masa de carbono (ecuación 33) y el balance de electrones (ecuación 34) definidos en el capítulo anterior están esquematizadas matricialmente por la ecuación 74. La restricción del ATP (ecuación 32) para *C. acetobutylicum* se transformó en la

60 TASHIRO, Yukihiro. et al. Op. Cit., p. 44.

ecuación 75. Finalmente, el modelo simplificado para los casos de estudios IA, IB y IC quedaron sujetos a las restricciones de las tablas 12, 13 y, a las ecuaciones 74 y 75.

La función objetivo del caso de estudio IA fue maximizar la variable b correspondiente al n-butanol, en el caso de estudio IB fue minimizar el ATP neto (ecuación 75) y el caso de estudio IC minimizar la energía de Gibbs (ecuación 76) de la ecuación estequiométrica simplificada neta de la fermentación ABE (ecuación 24).

$$\begin{array}{cccccccccc|c}
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 2 & -1 & 0 & 0 & 0 & a \\
 -1 & 0 & 0 & -2 & -1 & 1 & 0 & 0 & -2 & 0 & 0 & b \\
 0 & -2 & 0 & 0 & -2 & 0 & 2 & -1 & -2 & 1 & 0 & c \\
 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & d \\
 -2 & -4 & -4 & -4 & -2 & 1 & 6 & -3 & 0 & 0 & 0 & e \\
 8 & -24 & -20 & -16 & -12 & 0 & 24 & -12 & 0 & 0 & -2 & f \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & g \\
 & & & & & & & & & & & l \\
 & & & & & & & & & & & r \\
 & & & & & & & & & & & t \\
 & & & & & & & & & & & w
 \end{array} = \begin{array}{c} 0 \\ 0 \\ 0.0375 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0.0375 \end{array}$$

Ec. 74

$$2g + a + c + d - 0.730 \text{ Ec. 75}$$

La energía de Gibbs de cada componente (tabla 14) fue calculada utilizando eEquilibrator a condiciones estándar (T=298.15K y pH=7.0)

Tabla 14. Energías de Gibbs a condiciones estándar. Caso de estudio IC

Sustancia	ΔG° [KJ/mol]	Sustancia	ΔG° [KJ/mol]
Glucosa	-436.7	CO ₂	-547.4
ADP	-1429.2	Acetato	-249.5
Pi	-1058.6	Butírate	-73.1
ATP	-2292.9	Acetona	79.9
H ₂ O	-157.3	Etanol	58.0
H ₂	97.5	n-Butanol	227.5

Milo Lab. Weizmann Institute in Rehovot, Israel. eQuilibrator biochemical thermodynamics calculator. [Visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://equilibrator.weizmann.ac.il/>>

A partir de los datos de la tabla 14 se obtuvo la función objetivo del caso de estudio IC (ecuación 76).

$$\Delta G'_{neto} = 227.5b + 58e - 547.4f + 97.5w + 75.2g - 157.3r - 272.6d - 54.6a + 121.8c - 312.6l - 142.277$$

Ec. 76

La solución para los tres casos de estudio del modelo simplificado fue exactamente la misma (tabla 15). Una posible explicación para este comportamiento es: las restricciones y la función objetivo son un conjunto de ecuaciones lineales, así que geoméricamente el problema de optimización y su solución se visualizan como la intersección de n-dimensiones lineales, las cuales convergieron a la misma región (la *trivial* de n-butanol), probablemente por los métodos de optimización global u óptimo absoluto utilizados en su resolución. De lo anterior se deduce que el máximo de n-butanol en los modelos simplificados no dependió de la función objetivo empleada.

La solución de los tres casos de estudios fue independiente del factor de peso aplicado, no se presentaron singularidades ni regiones no factibles. Por lo tanto la técnica de programación lineal fue la apropiada, tal y como lo han reportado otros autores en investigaciones similares.^{96,97,98}

De la tabla 15 se puede afirmar que la actividad enzimática en las reacciones de

96 BONARIUS, H. et al. *Biotechnol. Bioeng.* 50. (1996): p. 299-318. Citado por: DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T *Journal of Biotechnology.* Vol. 71. (1999): p. 191-205.

97 VARMA, VARMA, A and PALSSON, B. O. *Appl. Environ. Microbiol.* 60. (1994): p. 3724-3731. Citado por: DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T *Journal of Biotechnology.* Vol. 71. (1999): p. 191-205.

98 MAJEWSKI, R. A and DOMACH, M M. *Biotechnol. Bioeng.* 35. (1990): P. 732-738. Citado por: DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T *Journal of Biotechnology.* Vol. 71. (1999): p. 191-205.

formación de lactato, acetato, butírate, acetona y etanol fue nula. Los equivalentes de poder reductor necesarios para la formación del n-butanol fueron aportados por la transferencia de electrones de la ferredoxina a NAD(P)^{+1} sin la formación de hidrógeno molecular. Teóricamente este tipo de fermentación es posible y se ha denominado producción de n-butanol homofermentativa.⁴

Otra interpretación igualmente válida para los resultados de los modelos simplificados es que la actividad enzimática para todos los productos extracelulares es nula, excepto para el acetato y butírate ya que fueron re-asimilados completamente vía fosfotransferasa/quinasa demostrando así la no formación de acetona. Estas deducciones para la acetona son consecuentes con la estructura del modelo, porque este simplificó su síntesis limitándola al acetyl-CoA como único precursor (ecuación 18), dejando de lado la re-asimilación de los ácidos vía CoA-transferasa (CoAT) responsables indirectos de su formación.

Tabla 15. Resultados modelo simplificado y los casos de estudio IA, IB y IC.

Metabolito	Caso de estudio IA	Caso de estudio IB	Caso de estudio IC
Glucosa	g=1.00	g=1.00	g=1.00
Acetato	a=0.00	a=0.00	a=0.00
Butírate	c=0.00	c=0.00	c=0.00
Lactato	l=0.00	l=0.00	l=0.00
H ₂	w=0.00	w=0.00	w=0.00
CO ₂	f=2.00	f=2.00	f=2.00
Biomasa	q=0.30	q=0.30	q=0.30
Acetona	d=0.00	d=0.00	d=0.00
Etanol	e=0.00	e=0.00	e=0.00
n-Butanol	b=1.00	b=1.00	b=1.00
Ferredoxina ^a	t=2.038	t=2.038	t=2.038
Butiril-CoA ^b	r=1.00	r=1.00	r=1.00
Función Objetivo	b=1.00	ATP=1.270	$\Delta G^{\circ}=-1091.7$

^a Cantidad de ferredoxina acoplada a la producción de NADH (ecuación 22)

^b Formación de Butiril-CoA a partir de Acetil-CoA (ecuación 19)

Fuente: Autor

⁴ LÜTKE-EVERSLOH, Tina and BAHL, Hubert. Op. Cit., p. 17.

Por otro lado, el NADH necesario para la biosíntesis de biomasa y el adicional para alcanzar el óptimo trivial de n-butanol fue suministrado por el acople de la ferredoxina reducida a la formación de NADH (ecuación 22). De manera que se cerró el ciclo de la ferredoxina y por lo tanto no quedó cantidad alguna disponible para la formación de hidrógeno molecular. Lo anterior respalda la idea de la relación indirecta de la ferredoxina con la síntesis de n-butanol (sección 3.2).

En resumen, debido a la naturaleza global o macroscópica del modelo simplificado y sus casos de estudio, la optimización no proporcionó información relevante sobre la fisiología o dinámica metabólica teórica de la mayoría de los productos extracelulares, sobretodo en el mecanismo de síntesis de la acetona, la cual al no poseer restricción alguna que la limite a un espacio de solución específico, el modelo simplemente ignoró por completo su producción.

3.4 CASO DE ESTUDIO II. MODELO ESTEQUIOMÉTRICO GENERALIZADO

Representando matricialmente las restricciones de igualdad de la tabla 11 se obtiene la ecuación 77.

$$\begin{bmatrix}
 0 & 0 & -1 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & -1 & 1 & 0 & -1 & -2 & -1 & -2 & 0 & 1 & 0 & -2 & 0 & 0 \\
 -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\
 -2 & -2 & 0 & 2 & 0 & -2 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & -2 & 1 & 0 \\
 -4 & -2 & -1 & 6 & -2 & -4 & -2 & -0 & -3 & 2 & 4 & 0 & 0 & 0 \\
 -24 & -12 & 0 & 24 & -8 & -20 & -8 & 4 & -12 & 8 & 20 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1
 \end{bmatrix}
 \begin{bmatrix}
 b \\
 e \\
 f \\
 g \\
 h \\
 i \\
 j \\
 k \\
 l \\
 m \\
 n \\
 r \\
 t \\
 w
 \end{bmatrix}
 =
 \begin{bmatrix}
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0.0375 \\
 0 \\
 0.0375 \\
 0
 \end{bmatrix}$$

Ec. 77

Para las demás restricciones se obtuvieron las ecuaciones 78 a 81:

Acetona: $j+k=d$ **Ec. 78**

Acetato neto: $h-j-m=a>0$ **Ec. 79**

Butírate neto: $i-k-n=c>0$ **Ec. 80**

Restricción cinética: $k-0.315j=0$ **Ec. 81**

El modelo estequiométrico generalizado está sujeto a las restricciones de las tablas 12, 13 y, las ecuaciones 75, 77-81.

Para el caso de estudio II se obtuvo de nuevo la solución trivial de n-butanol (tabla 16), igual a la obtenida en el modelo estequiométrico simplificado. A pesar de que en este modelo se incluyeron restricciones que jerarquizaron las diferentes rutas de reasimilación de los ácidos, igualmente convergió a la misma región óptima. Por lo tanto todas las interpretaciones del modelo simplificado son válidas para el modelo generalizado.

Tabla 16. Resultados caso de estudio II. Modelo estequiométrico generalizado

Metabolito	Caso de estudio II		
Glucosa	g=1.00	Butírate total	i-n-k=0.00
Lactato	l=0.00	H ₂	w=0.00
Acetato inicial	h=0.00	CO ₂	f=2.00
Butírate inicial	i=0.00	Biomasa	q=0.30
Acetato (FTQ)	m=0.00	Acetona	j+k=0.00
Butírate (FTQ)	n=0.00	Etanol	e=0.00
Acetato (CoAT)	j=0.00	n-Butanol	b=1.00
Butírate (CoAT)	k=0.00	Ferredoxina ^a	t=2.038
Acetato total	h-m-j=0.00	Butiril-CoA ^b	r=1.00
Función Objetivo	b=1.00		

^a Cantidad de ferredoxina acoplada a la producción de NADH (ecuación 22)

^b Formación de Butiril-CoA a partir de Acetil-CoA (ecuación 19)

FTQ: Fosfotransferasa/quinasa

CoAT: Acetoacetil-CoA acetato/butírate CoA-transferasa

Fuente: Autor.

Matemáticamente no existió diferencia entre el estudio teórico global del metabolismo de *C. acetobutylicum* ATCC 824 y el que investigó la glucólisis, acidogénesis y solventogénesis como cascadas de eventos paralelos (modelo estequiométrico generalizado). Para superar las mencionadas dificultades se propuso un tercer caso de estudio llamado **Modelo estequiométrico subespaciado**, el cual modeló y simuló primero la acidogénesis como un suceso independiente y finalmente optimizó el n-butanol en la solventogénesis. Siendo este modelo fisiológicamente más aproximado a los observables experimentales.

3.5 CASO DE ESTUDIO III. MODELO ESTEQUIOMÉTRICO SUBESPACIADO

Está dividido en dos partes, en la primera se optimizó la acidogénesis y en la segunda, con base en los resultados obtenidos, se prosigió a optimizar la producción de n-butanol.

3.5.1 Parte I. Optimización de la acidogénesis. Después de analizada la ruta metabólica de *C. acetobutylicum* ATCC 824 se describió la acidogénesis como un fenómeno inicial independiente de la solventogénesis. La estructura biológica permitió optimizar los ácidos producidos mediante la maximización del ATP generado (función objetivo), bajo dos escenarios denominados: NADH abierto, debido a un NADH residual disponible para la solventogénesis y NADH cerrado, donde el NADH neto es nulo.

3.5.1.1 Modelo de la acidogénesis NADH abierto. Los balances de masa de piruvato, ferredoxina y carbono están expresados en la ecuación 82.

$$\begin{bmatrix} -1 & 2 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ -1 & 6 & -2 & -4 & -3 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} f \\ g \\ h \\ i \\ l \\ w \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad \text{Ec. 82}$$

El NADH fue una restricción de desigualdad (ecuación 83) debido a que excluyó el NADH utilizado en la síntesis de biomasa y el consumido en la reacción mediada por NADH/NAD(P)H ferredoxina oxidoreductasa (ecuación 22a). Sin embargo se incluyó una restricción no lineal de eficiencia termodinámica (ecuación 84) porque según Desai, R; Nielsen, L. K. and Papoutsakis, E. T. (1999) evitan la convergencia a la solución trivial.²² Utilizando las ecuaciones 63 y 69 el máximo de la eficiencia se fijó en 60.9%; del mismo modo con las ecuaciones 63 y 70 la eficiencia mínima fue de 42.9%.

$$2g - 2i - l > 0 \quad \text{Ec. 83}$$

$$(2 + h + i)(\varepsilon - 1) + 4.044\varepsilon = 0 \quad \text{Ec. 84}$$

Se incorporó una restricción de desigualdad que favorece la producción de butírate (ecuación 85). También se introdujeron los efectos de los factores de peso sobre la función objetivo (ecuación 86). Todo lo anterior basado en los resultados de Tashiro, Y. et al., (2004), quienes demostraron experimentalmente que: “entre más butírate presente en el medio de cultivo más cantidad de n-butanol es producido”.⁶⁰

$$i - h > 0 \quad \text{Ec. 85}$$

$$ATP = 2g + p_1 * i + p_2 * h - 0.73 \quad \text{Ec. 86}$$

p_1 y p_2 son los factores de peso para butírate y acetato respectivamente.

22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.
60 TASHIRO, Yukihiko. et al. Op. Cit., p. 44.

El modelo NADH abierto está constituido por las ecuaciones 82 a la 86 y los resultados de su solución se muestran en la tabla 17.

Las soluciones del modelo NADH abierto no presentaron regiones no factibles, ni singularidades y convergieron a un espacio de solución diferente al trivial (tabla 17). Se obtuvieron tres conjuntos de soluciones diferentes para el acetato y el butírate, las cuales teóricamente significan que existen al menos tres subespacios independientes o regiones termodinámicamente posibles para estos ácidos bajo las condiciones establecidas.

Tabla 17. Resultados del modelo de la acidogénesis NADH abierto

Metabolitos	Solución o subespacio					
	p ₁ =0.1	p ₂ =0.01	p ₁ =0.1	p ₂ =0.05	p ₁ =0.1	p ₂ =0.1
Glucosa	g=1.00		g=1.00		g=1.00	
Lactato	l=0.000		l=0.000		l=0.000	
Acetato	h=0.101		h=0.500		h=0.667	
Butírate	i=0.949		i=0.750		i=0.667	
H ₂	w=2.00		w=2.00		w=2.00	
CO ₂	f=2.00		f=2.00		f=2.00	
NADH residual	0.102		0.500		0.666	
Relación molar acetato/butírate	h/i=0.106		h/i=0.667		h/i=1.00	
Eficiencia	ε=0.430		ε=0.446		ε=0.452	
Función objetivo	ATP=2.32		ATP=2.52		ATP=2.60	
ΔG°[KJ/mol]	-115.6		-117.7		-118.5	

Fuente: Autor

En la tabla 17 se observa que el subespacio que contiene 0.50moles de acetato y 0.75moles de butírate fue igual al obtenido hace tres décadas por Palmer, Rogers. (1984), excepto por la producción hidrógeno molecular (2.00moles para este trabajo y 2.50moles para Palmer, Rogers. 1984).²⁸ Dicha diferencia se debió a que con el propósito de beneficiar la producción de n-butanol se planteó lo siguiente: ***“los 0.500moles de NADH residuales pueden ser empleados en la síntesis de etanol o n-butanol al inicio de la solventogénesis”***, en lugar de ser reciclados por la acción de la NADH/NAD(P)H ferredoxina oxidoreductasa en la producción

28 ROGERS, Palmer. Op. Cit., p. 28.

ferredoxina reducida y posteriormente contribuya a la producción de 0.500moles adicionales de H₂ por acción de le ferredoxina/hidrogenasa (ecuación 23).

La relación acetato/butírate, la eficiencia global y, las eficiencias individuales de acetato y butírate calculadas para *Clostridium pasteurianum* fueron 0.857, 62%, 85% y 52% respectivamente.²⁹ Estos valores fueron diferentes a los cuantificados en esta investigación (tabla 17). Tales discrepancias están relacionadas al efecto de tener en cuenta la bioenergética de intermediarios como: ferredoxina, piruvato, acetil-CoA, butiril-CoA y NADH; cuyos aspectos fueron omitidos en *C. pasteurianum*. Sin duda alguna las eficiencias evaluadas utilizando la bioenergética fueron más precisas y por lo tanto más aproximadas a la bioquímica real de *C. acetobutylicum*.

De las soluciones obtenidas en la tabla 17 se observa que entre más elevado fue el factor de peso del acetato, aumentaron la producción de acetato (h moles), la generación de ATP y la eficiencia; y la de butírate (i moles) disminuyó. Este comportamiento puede justificarse de la siguiente manera: a) Entre más grande sea el factor de peso de un metabolito mayor preferencia se tiene hacia éste; si el acetato aumenta, el balance de masa de carbono indica que el butírate debe disminuir y b) por mol de acetato formado se genera un 33.33% más de ATP que por mol de butírate, entonces el incremento del acetato inevitablemente repercuten en el aumento del ATP y la eficiencia.

La relación molar de acetato/butírate igual a la unidad posee el máximo de ATP, generando la mayor eficiencia y el menor ΔG° . Indiscutiblemente es el subespacio termodinámicamente más favorable. Pero, en las reacciones metabólicas no solo el control termodinámico es importante sino también la cinética, el control y regulación enzimática. Por lo tanto los otros dos posibles estados aunque ligeramente menos favorables no se pueden desestimar.

²⁹ THAUER, Rudolf K; JUNGERMANN, Kurt and KARL, Decker. Op. Cit., p. 28.

3.5.1.2 Modelo de la acidogénesis NADH cerrado La ecuación 87 fue el resultado de incorporar la restricción de NADH (ecuación 27) y el balance de electrones (ecuación 34) a la ecuación 81. Este modelo utilizó las ecuaciones 84 a la 87.

$$\begin{bmatrix} -1 & 2 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 0 & -2 & -1 & -1 & 0 \\ -1 & 6 & -2 & -4 & -3 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 \\ 0 & 24 & -8 & -20 & -12 & 0 & -2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} f \\ g \\ h \\ i \\ l \\ t \\ w \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0.0375 \\ 0 \\ 0.0375 \\ 0 \end{bmatrix} \quad \text{Ec. 87}$$

En la tabla 18 se presentan los resultados para el modelo de la acidogénesis NADH cerrado.

Tabla 18. Resultados del modelo de la acidogénesis NADH cerrado

Metabolitos	Solución o subespacio					
	p ₁ =0.1	p ₂ =0.01	p ₁ =0.1	p ₂ =0.05	p ₁ =0.1	p ₂ =0.1
Glucosa	g=1.00		g=1.00		g=1.00	
Lactato	l=0.00		l=0.00		l=0.00	
Acetato	h=0.101		h=0.358		h=0.667	
Butírate	i=0.949		i=0.821		i=0.667	
H ₂	w=2.10		w=2.36		w=2.67	
CO ₂	f=2.00		f=2.00		f=2.00	
Ferredoxina reducida ^a	t=0.064		t=0.321		t=0.629	
Relación molar acetato/butírate	h/i=0.106		h/i=0.436		h/i=1.00	
Eficiencia	ε=0.430		ε=0.440		ε=0.452	
Función objetivo	ATP=2.32		ATP=2.45		ATP=2.60	
ΔG°[KJ/mol]	-115.6		-117.2		-118.5	

^a Cantidad de ferredoxina reducida formada debido a la actividad de la NADH-ferredoxina oxidoreductasa (Ecuación 22a)

Fuente: Autor.

De la solución del modelo de la acidogénesis NADH cerrado se obtuvieron tres subespacios factibles, dos iguales y uno distinto a los calculados por el modelo de

NADH abierto (tabla 17 y 18). A causa de ello, todas las justificaciones del modelo de NADH abierto son también aplicables para el modelo de NADH cerrado. Pero en la tabla 18 se observa que entre mayor fue el factor de peso del acetato, mayores fueron las producciones de hidrógeno y ferredoxina reducida.

En el modelo NADH cerrado el ciclo del NADH se completa y en su semejante (modelo NADH abierto) finalizó con un remanente de este. Esta diferencia estructural se debió a la actividad de la NADH/NAD(P)H ferredoxina oxidoreductasa, la cual catalizó la reducción de ferredoxina por NADH. Entonces se puede afirmar que en el modelo NADH cerrado, el NADH residual del modelo NADH abierto (tabla 17) se aprovecha en la síntesis de biomasa y en la producción de ferredoxina reducida. Posteriormente esta ferredoxina reducida se le suma a la producción de hidrógeno molecular y de esta manera se cumple el ciclo catalítico de la acidogénesis.

Hasta ahora la actividad de la NADH/NAD(P)H ferredoxina oxidoreductasa justificó la mayor disponibilidad de la ferredoxina reducida para la producción de hidrógeno molecular. Sin embargo hacia la ruta de síntesis del butírate se requiere NADH, de manera que la disminución del butírate (aumento del acetato por el incremento de su factor de peso) habilitó una mayor cantidad de NADH utilizable en la reducción de la ferredoxina y por consiguiente una mayor producción de hidrógeno molecular, como lo demuestran los resultados de la tabla 18.

Claramente los resultados teóricos del modelo NADH cerrado (tabla 18) constataron el hecho de que en la acidogénesis prevalece la actividad de la NADH/NAD(P)H ferredoxina oxidoreductasa sobre la ferredoxina NAD(P)/NAD reductasa.²⁴ Pese a que esta reacción termodinámicamente no es favorable ($\Delta G^\circ = 14.3 \text{ JK/mol}$), no es un problema porque con el ATP generado es más que suficiente para suplir los requerimientos energéticos de la mencionada conversión.

²⁴ VASCONCELOS, Isabel. GIRBAL, Laurence and SOUCAILLE, Philippe. Op. Cit., p. 24.

Los cuatro subespacios obtenidos en la optimización de la acidogénesis cumplieron con lo deducido en la sección 3.2, donde se estableció que para el metabolismo primario de *C. acetobutylicum* las moles de ATP generados por mol de glucosa consumida oscilan entre 3 y 4. Por lo expuesto en los modelos NADH abierto y cerrado se puede deducir que la generación de ATP tiene un rol importante en la acidogénesis,^{20,22} ya que proporciona la energía para la síntesis de biomasa y otras reacciones de la ruta metabólica, además cuando alcanza su máximo posiblemente sea una de las señales que inducen el paso a la solventogénesis.^{16,53}

Con toda seguridad según las condiciones del medio de cultivo se activan los sistemas de control y regulación enzimática, y de estos dependen los posibles estados alcanzables en la acidogénesis. Aunque los modelos NADH abierto y cerrado no poseen la capacidad de predecir condiciones experimentales, se puede afirmar que los factores de peso, sobre todo los del acetato, simularon de alguna forma el control y la regulación enzimática en la acidogénesis. Debido a que los subespacios teóricos obtenidos en dicha optimización similares a estados experimentales²⁸ y cambiaron en la medida que el factor de peso del acetato varió.

En definitiva la optimización teórica de la acidogénesis homologó la importancia de la generación del ATP; la trascendencia de la ferredoxina en la transferencia de electrones y quizás lo más significativo fue la limitación de infinitas regiones factibles a solo cuatro termodinámicamente probables. En consecuencia estos subespacios son un nuevo punto de partida que restringe la optimización de la n-butanol. A continuación se articularon los subespacios obtenidos en la acidogénesis al cómputo del máximo teórico no trivial de n-butanol de la ruta metabólica de *C. acetobutylicum* ATCC 824.

20 DESAI, Ruchir P. et al. Op. Cit., p. 23.

22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.

16 GRUPE, Helga. and GOTTSCHALK, Gehard. Op. Cit., p. 22.

53 MEYER, C. and PAPOUTSAKIS, E. Op. Cit., p. 42.

28 ROGERS, Palmer. Op. Cit., p. 28.

3.5.2 Parte II. Optimización de la n-butanol Como se explicó anteriormente, el modelo estequiométrico subespaciado fue en realidad el mismo modelo estequiométrico generalizado, condicionado a los subespacios obtenidos en la optimización de la acidogénesis y a las restricciones termodinámicas adicionales inherentes a la dinámica metabólica (ecuaciones 63-66).

Los posibles estados alcanzables o subespacios obtenidos en la optimización de la acidogénesis se categorizaron en: subespacio I, II, III y IV según las correspondientes relaciones de acetato/butírate (h/i) de 0.106, 0.667, 1.00 y 0.436 (tablas 17 y 18). Estos a su vez se emplearon como condición suficiente o punto de partida para la optimización de la n-butanol y fueron denominados como modelos subespaciados I, II, III y IV respectivamente. Los resultados obtenidos de la citada optimización están resumidos en la tabla 19.

Evidentemente la solución del modelo estequiométrico subespaciado dependió de los posibles estados alcanzables en la acidogénesis³⁸ y conforme a estos diferentes óptimos de n-butanol fueron calculados (tabla 19). Análogamente a lo demostrado en el modelo a escala del genoma para *C. acetobutylicum* ATCC 824,35 se puede afirmar que los resultados de los modelos subespaciados II, III y IV son otro ejemplo de como a partir de soluciones particulares se definieron las características fenotípicas del metabolismo, específicamente las propiedades de la solventogénesis.

38 SALIMI, Fahimeh. et al. Op. Cit., p. 35.

35 SENGER, Ryan S and PAPOUTSAKIS, Eleftheruis T. Op. Cit., p. 33.

Tabla 19. Resultados del modelo estequiométrico subespaciado

Metabolitos	Subespaciado I	Subespaciado II	Subespaciado III	Subespaciado IV
Glucosa	No Factible	g=1.00	g=1.00	g=1.00
Lactato		l=0.00	l=0.00	l=0.00
NADH plus		t=1.44	t=1.15	t=1.63
CO ₂		f+d=2.11	f+d=2.15	f+d=2.07
H ₂		w=0.601	w=0.884	w=0.405
Biomasa		q=0.300	q=0.300	q=0.300
Acetato FTA/AQ		m=0.360	m=0.431	m=0.281
Acetato CoAT		j=0.080	j=0.113	j=0.053
Acetato neto		a=0.060	a=0.123	a=0.024
Butírate FTB/BuQ		n=0.695	n=0.609	n=0.765
Butírate CoAT		k=0.025	k=0.036	k=0.017
Butírate neto		c=0.030	c=0.022	c=0.039
Acetona		j+k=d=0.110	j+k=d=0.149	j+k=d=0.070
Etanol		e=0.022	e=0.026	e=0.018
n-Butanol		b=0.824	b=0.755	b=0.870
ATP residual		1.47	1.56	1.40
Y _{BG} [mol/mol]		0.824	0.755	0.870
Y _{BG} [másico:g/g]		0.339	0.311	0.358
Y _{SG} [másico:g/g]	0.380	0.366	0.387	

FTA/AQ: Reasimilación de acetato vía fosfotransferasa-acetilasa/Acetato quinasa

FTB/BuQ: Reasimilación de butírate vía fosfotransferasa-butirilasa/Butírate quinasa

CoAT: Reasimilación de ácidos vía acetoacetyl-CoA acetato/butírate CoA-transferasa

NADH plus: NADH acoplado a la ferredoxina (Ecuación 22)

Y_{BG}: Rendimiento teórico de n-butanol formado por glucosa consumida

Y_{BG}: Rendimiento teórico de solventes (ABE) formados por glucosa consumida

Fuente: Autor.

El modelo subespaciado I no convergió debido a que el espacio matricial de solución fue no factible, dicho de otra manera no existe solución en el conjunto de los números reales positivos incluyendo el cero, que cumpla las restricciones impuestas a la optimización de n-butanol. Lo más significativo de este resultado fue que de las infinitas combinaciones de acetato/butírate no todas son viables para alcanzar un máximo de n-butanol. Los restantes modelos subespaciados (II,

III y IV) se caracterizaron por la ausencia de singularidades, la inexistencia de regiones no factibles y la convergencia a un espacio de solución diferente al trivial para n-butanol.

En consecuencia, los resultados de la optimización de los modelos subespaciados II, III y IV demostraron que no es imposible establecer un máximo teórico de n-butanol. Además esta es la primera investigación teórica que sin simplificar o ignorar la complejidad del metabolismo de *C. acetobutylicum* ATCC 824 logró estimar la producción teórica de n-butanol.

El orden descendente de los óptimos de n-butanol estimados para el metabolismo primario de *C. acetobutylicum* fue: 0.870, 0.824 y 0.755 moles de n-butanol por mol de glucosa consumida; los cuales correspondieron a los modelos subespaciados IV, II y III. Cabe resaltar que los óptimos de n-butanol calculados en esta investigación superan ampliamente las estimaciones teóricas realizadas por otros autores* (ver sección 1.3).

En la tabla 19 se identificaron las siguientes generalidades comunes para los modelos subespaciados II, III y IV: a) la cantidad de lactato siempre fue cero, b) se conoce con exactitud las relaciones estequiométricas de las 28 reacciones planteadas para *C. acetobutylicum* ATCC 824, c) la cantidad de acetona fue mayor al etanol, d) la reasimilación de los ácidos vía fosfotrans-acetilasa/acetato quinasa (FTA/AQ) y fosfotrans-butilulasa/butírate quinasa (FTB/BuQ) fueron superiores a la acetato/butírate CoA-transferasa (CoAT) y e) siempre queda un residual positivo de ATP.

En los resultados presentados en la tabla 19 se observa la siguiente tendencia entre más NADH plus sea sintetizado y menos acetona, etanol, hidrógeno

* 0.65 moles de n-butanol por mol de glucosa consumida (ROGERS, Palmer. 1984).
0.60 moles de n-butanol por mol de glucosa consumida (YERUSHALMI, Laleh. et al., 1983; y LÜTKE-EVERSLOH, Tina and BAHL Hubert 2011).
0.56 moles de n-butanol por mol de glucosa consumida (JONES, David. T. and WOODS, David. R. 1986).

molecular y CO₂ fueron producidos, el óptimo de n-butanol aumenta. Por lo tanto las soluciones de los modelos subespaciados II, III y IV teóricamente sugieren que para favorecer la biosíntesis de n-butanol en *C. acetobutylicum* se tiene que cumplir que: en primer lugar, haya un estricto control metabólico que minimice las producciones netas de acetato, butírate, acetona y etanol; y en segundo lugar garantizar la suficiente disponibilidad de poder reductor (NADH/NAD(P)H).

En términos metabólicos los modelos subespaciados revelaron que para lograr bajas producciones netas de acetato y butírate, más completa debe ser su reasimilación; pero la misma dinámica de solución condicionó que la reasimilación vía fosfotransferasa/quinasa fuera superior a la CoAT, impidiendo así la formación de grandes cantidades de acetona y CO₂. Por otra parte la actividad de la acetaldehído deshidrogenasa y etanol deshidrogenasa deben ser lo suficientemente bajas para evitar elevados rendimientos de etanol. Una vez cumplidas estas condiciones el flujo de átomos de carbonos fue dirigido hacia la formación de n-butanol.

No solo a expensas de la disminución del acetato, butírate, acetona y etanol se aumenta la producción de n-butanol. Sino que con los modelos subespaciados se confirma la necesidad de controlar la transferencia de electrones hacia la producción de NADH (t moles), a costa de una menor actividad de la hidrogenasa de la síntesis de hidrógeno molecular (w moles), garantizando el poder reductor necesario para la optimización del n-butanol. También se puede inferir que la ferredoxina reducida y la biosíntesis de n-butanol inevitablemente están relacionadas de manera indirecta, revalidando así el razonamiento previamente planteado en sección 3.2 de este documento.

Las deducciones de los modelos subespaciados con respecto a la transferencia de electrones concordaron con los resultados obtenidos en la simulación del modelo a escala del genoma, en donde sus autores sugirieron lo siguiente: “*la producción*

de n-butanol aumentó en la medida que el flujo de la ferredoxina/hidrogenasa disminuyó”.³⁶

Ahora se discutirá la capacidad de los modelos subespaciados para explicar teóricamente o predecir los observables experimentales de las diferentes cepas productoras de n-butanol.

Experimentalmente se ha observado que la formación de acetona y n-butanol en *C. acetobutylicum* ATCC 824 están acopladas, de modo que es imposible obtener n-butanol sin la formación paralela de acetona.²¹ Esta afirmación puede justificarse a partir de los resultados obtenidos en los modelos subespaciados II, III y IV. Si las cantidades j y k son ceros es posible producir n-butanol pero no acetona; ahora si tales cantidades son diferentes de cero como se muestra la tabla 19, significa que por intermedio de la CoAT se formarán acetil-CoA, acetoacetato y butiril-CoA, intermediarios claves en la síntesis de acetona y n-butanol.

También se ha comprobado que más acetona se produce vía reasimilación de acetato que butírate.^{20,22,93} aunque la reasimilación de acetato fue mayor vía FTA/BuQ (m , moles) que vía CoAT (j , moles). Bajo estas condiciones los j moles de acetato deben ser siempre mayores a los k moles de butírate, y a su vez los n moles de butírate (reacción 52, vía FTB/BuQ) superiores a los k moles, justamente lo pronosticado por los modelos subespaciados II, III y IV.

En parte la poca producción de acetona predicha por los modelos teóricos subespaciados II, III y IV se debió a la baja actividad enzimática de la CoAT en la reasimilación del acetato (j moles) y butírate (k moles); sumada a la alta actividad de FTB/BuQ (n moles). Fenomenológicamente resultados similares se obtuvieron

36 LEE, Joungmin. et al. Op. Cit., p. 34.

21 HARTMANIS, Maris G N; KLASON, Tomas y GATENBECK, Sten. Op. Cit., p. 23.

20 DESAI, Ruchir P. et al. Op. Cit., p. 23.

22 DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 23.

93 HARRIS, Latonia M. et al. Op. Cit., p. 72.

con PJC4BK20⁹³ PJC4BK(pTAAD),⁹³ dos cepas modificadas genéticamente a partir de *C. acetobutylicum* ATCC 824.

La expresión de la enzima BuQ fue inactivada en la cepa PJC4BK^{20,93} y en la PJC4BK(pTAAD)⁹³ combinaron el efecto de anular la BuQ con la sobre expresión de los genes que codifican las enzimas aldehído-alcohol deshidrogenasa (AAD).⁹³ Ambas cepas obtuvieron relaciones de n-butanol/acetona superiores a la típica, en otras palabras, menos acetona por más n-butanol formado. Lo anterior claramente valida los resultados obtenidos por los modelos subespaciados (II, III y IV) y establece los fundamentos teóricos asociados a las bajas conversiones de acetona y selectividad hacia el butírate vía FTB/BuQ.

Los porcentajes de reasimilación de butírate vía FTB/BuQ para los modelos subespaciados IV, II y III fueron: 93.2, 92.7 y 91.3% respectivamente. Teóricamente sugiere un vínculo entre la producción de n-butanol y la reasimilación de butírate vía FTB/BuQ; presumiblemente **la cantidad de n-butanol aumenta en la medida que una mayor cantidad de butírate es consumida**. Algunas evidencias que respaldan esta idea se obtuvieron utilizando *C. acetobutylicum* 824 pN5-1,51 *C. acetobutylicum* 824 (pPTBAAD)* y *C. acetobutylicum* 824 (pCASAAD)** cepas recombinantes de *C. acetobutylicum* ATCC 824.99

C. acetobutylicum 824 pN5-1 está caracterizada por la sobre expresión de las enzimas fosfotrans-butirilasa (FTB) y butírate quinasa (BuQ) responsables de la síntesis de butírate a partir de Butiril-CoA. PN5-1 a un pH de 4.5 mostró una mayor producción de n-butanol y una elevada reasimilación de acetato y

20 DESAI, Ruchir P. et al. Op. Cit., p. 23.

93 HARRIS, Latonia M. et al. Op. Cit., p. 72.

51 WALTER, K; MERMELSTEIN, L. and PAPOUTSAKIS, T. Op. Cit., p. 42.

* Sobre expresión de los genes alcohol/aldehído deshidrogenasa (promotor de fosfotrans-butirilasa).

** Sobre expresión de los genes alcohol/aldehído deshidrogenasa (promotor de fosfotrans-butirilasa) y acetoacetil-CoA-butírate CoA-transferasa, subunidad B (promotor de tiolasa).

99 SILLERS, Ryan; ALI AL-HINAI, Mohab and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 102. No. 1. (2009): p. 38-49.

butírate.51 Entre tanto *C. acetobutylicum* 824 (pPTBAAD) y *C. acetobutylicum* 824 (pCASAAD) lograron reasimilar todo el butírate y la cantidad de n-butanol formada fue superior con respecto a su semejante genéticamente no modificado.⁹⁹

Aunque la interpretación de los resultados de *C. acetobutylicum* pN5-1, 824 (pPTBAAD) y 824 (pCASAAD) avaló el supuesto teórico sobre el incremento de n-butanol como consecuencia de un mayor reasimilación de butírate vía FTB/BuQ, no se puede considerar del todo concluyente, porque no necesariamente se aumenta la producción de n-butanol a partir de una reasimilación más completa de butírate^{51,93}, sino que otros factores de control y regulación enzimática están interviniendo en el metabolismo primario de *C. acetobutylicum* ATCC 824.^{93,99,100}

Pequeñas cantidades de etanol y acetato con niveles de n-butanol ligeramente mayores a los tradicionales fueron producidas en cepas no productoras de solventes (*C. acetobutylicum* M5)¹⁰⁰ y *C. acetobutylicum* ATCC 824 con la sobre expresión simultánea de las enzimas tiolasa (que cataliza la conversión de acetyl-CoA a acetoacetyl-CoA) y AAD.⁹⁹ Con esto se confirma otro aspecto teórico pronosticado por los modelos subespaciados: ***entre menos cantidad haya de compuestos de 2 carbonos (etanol y acetato), se favorece la síntesis de n-butanol, debido a la mayor disponibilidad de átomos de carbono.***

El mecanismo exacto de activación de la reasimilación de los ácidos aún no es conocido, a pesar de que ha sido ampliamente estudiado.⁹⁹ Por lo tanto el entendimiento del inicio de la solventogénesis está limitado. Los modelos subespaciados sugieren que la transición entre la acidogénesis y la solventogénesis ocurre cuando la relación entre el acetato y el butírate (subespacio) fue la apta para alcanzar el óptimo de n-butanol. Sin embargo estos modelos no poseen la capacidad de predecir cuál es la fuerza impulsora que

51 WALTER, K; MERMELSTEIN, L. and PAPOUTSAKIS, T. Op. Cit., p. 42.

93 HARRIS, Latonia M. et al. Op. Cit., p. 72.

100 SILLERS, Ryan. et al., Metabolic Engineering. 10. (2008): p. 321–332 .

99 SILLERS, Ryan. et al. Op. Cit., p. 96.

activa la finalización de la acidogénesis y el inicio de la solventogénesis.

Así como la optimización de la acidogénesis desarrollada en esta investigación demostró la importancia del consumo del poder reductor a través de la actividad de la NADH/NAD(P)H ferredoxina oxidoreductasa; los modelos subespaciados II, III y IV probaron que en la solventogénesis prevaleció la actividad de la ferredoxina NAD(P)/NAD reductasa sobre la NADH/NAD(P)H ferredoxina oxidoreductasa.²⁴ De tal modo que en esta fase principalmente se sintetiza el NADH/NAD(P)H necesario y primordial para la síntesis de n-butanol y etanol.

Los modelos subespaciados indican que la Inhibición de la ferredoxina/hidrogenasa (menor producción de H₂) causa el aumento de la actividad de la ferredoxina NAD(P)/NAD reductasa. Entonces la transferencia de electrones se dirige hacía un flujo más elevado de NADH (poder reductor). Indiscutiblemente una mayor disponibilidad de NADH provocó una mayor producción de n-butanol.

Diferentes estudios respaldan la anterior consideración teórica, entre ellos tenemos: 1) El empleo de transportadores artificiales de electrones como el metil viológeno^{40,101,102} o el rojo neutro¹⁰³, 2) la utilización de medios de cultivos deficientes de hierro⁴⁰ y 3) el suministro de corrientes gaseosas de monóxido de carbono (CO).^{39,104} Estas técnicas básicamente alteraron el flujo electrónico y la célula para compensar la transferencia de electrones expresó una mayor actividad de la ferredoxina NAD(P)/NAD reductasa, favoreciendo así la producción de NADH/NAD(P)H y como consecuencia se aumentaron los rendimientos de n-butanol. Se puede concluir que los modelos subespaciados modelaron

24 VASCONCELOS, Isabel; GIRBAL, Laurence and SOUCAILLE. Op. Cit., p. 24.

40 PEGUIN, Sophie and SOUCAILLE, Philippe. Op. Cit., p. 35.

101 PEGUIN, S et al. Appl Microbiol Biotechnol. 42. (1994): p. 611-616.

102 TASHIRO, Yukihiro et al. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 104, No. 3. (2007): p. 238-240.

103 GIRBAL, L; VASCONCELOS, I and SOUCAILLE P. Microbiology Reviews. Vol. 16.(1995): p. 151-162. Citado por: PEGUIN, Sophie and SOUCAILLE, Philippe. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 61. No 1. (1995): p. 403-405.

39 KIM, Byung Hong. et al. Op. Cit., p. 35.

104 MEYER, Charles. L and PAPOUTSAKIS, Eleftherios. T. Appl. Microbiol Biotechnol. 30. (1989): p. 450-459.

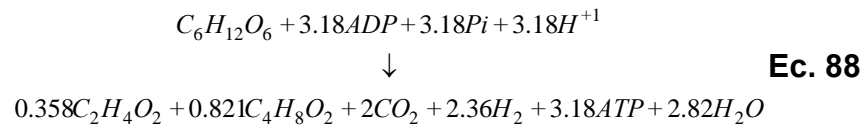
exitosamente la naturaleza de la transferencia de electrones y su relación con la producción de n-butanol.

Sin duda alguna la adecuada aplicación de los conceptos de optimización y las herramientas de cómputo al metabolismo primario de *C. acetobutylicum* ATCC 824, establecieron las bases teóricas para el entendimiento de la complejidad de los fenómenos relacionados en la producción de n-butanol. Esto fue posible a partir de un lógico y apropiado modelado y simulación del balance de masa de carbono elemental, el balance de electrones, las restricciones bioquímicas, termodinámicas y cinéticas de la ruta metabólica. Por lo tanto los modelos subespaciados (II, III y IV) son pioneros en la optimización teórica de la biosíntesis de n-butanol.

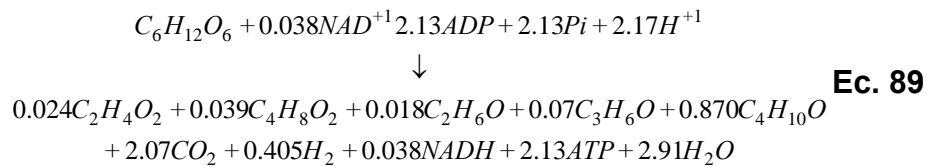
De todos los modelos estudiados el de mayor rendimiento de n-butanol fue el modelo subespaciado IV. Para ilustrar mejor los resultados de este modelo, se representaron la optimización de la acidogénesis (ecuación 88), del n-butanol (ecuación 89) y la del n-butanol incluyendo la síntesis de biomasa (ecuación 90) por medio de ecuaciones químicas. En estas ecuaciones solo se tuvieron en cuenta aquellos componentes que presentaron un intercambio neto de masa con el ambiente.

La ecuación 88 representa el punto de vista macroscópico de la acidogénesis de *C. acetobutylicum* ATCC 824. También indica el estado (subespacio) de la acidogénesis que proporcionó el valor más elevado de n-butanol. No se olvide que la optimización de la acidogénesis señala los estados más probables que cumplen con las restricciones impuestas al sistema biológico. Sin embargo, no todos los estados alcanzables en esta fase, matemáticamente tienen la posibilidad de alcanzar un máximo de n-butanol, como quedó demostrado con el subespacio I.

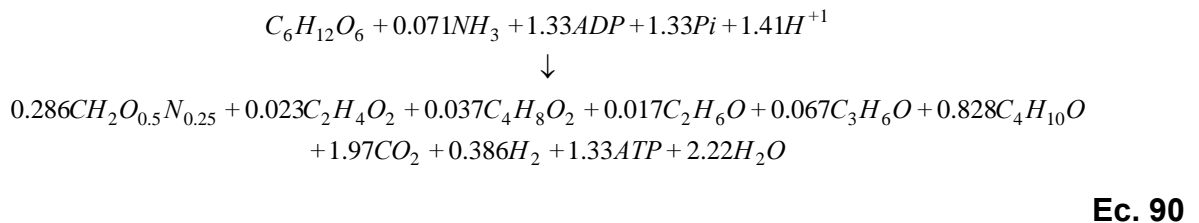
Ecuación estequiométrica neta de la optimización de la acidogénesis del modelo subespaciado IV (Subespacio IV)



Ecuación estequiométrica neta de la optimización de n-butanol del modelo subespaciado IV



Ecuación estequiométrica neta de la optimización de n-butanol del modelo subespaciado IV incluyendo la biosíntesis de biomasa



Análogamente a la ecuación 88 (acidogénesis) las ecuaciones 89 y 90 representan globalmente el metabolismo primario y el metabolismo primario con biosíntesis de biomasa. Además estas ecuaciones pueden considerarse la sinopsis de la ecuación estequiométrica optimizada de la producción de n-butanol por la vía fermentativa. La versión detallada de la estequiometría optimizada de los modelos subespaciados son los resultados presentados en las tablas 17, 18 y 19.

Para *C. acetobutylicum* ATCC 824 la relación típica de acetona:n-butanol:etanol (A:B:E) normalmente es de 60:90:30. La relación teórica de A:B:E del modelo subespaciado IV (Ecuación 90) fue de 7:90:2, donde claramente hay menos

acetona y etanol por más n-butanol producido. La adición de 6mM de rojo neutro al medio de fermentación cambió la relación A:B:E de 26:63:11 a 7:90:3,¹⁰⁵ pero con un rendimiento de n-butanol menor al teórico. Debido a que la relación A:B:E teórica y experimental pueden llegar a ser comparables, se abre la posibilidad de que los estados teóricos predichos por los modelos subespaciados sean realmente alcanzables.

De la ecuación 90 se observa que el rendimiento molar máximo de biomasa con respecto al sustrato ($Y_{XS}^{Máx}$) fue de 0.286mol/mol. El cual equivale a que el 4.77% de los átomos de carbono de la glucosa sean incorporados a la biomasa. Estos resultados están conformes a lo observado experimentalmente para este tipo de fermentaciones, donde generalmente menos del 10% del carbono de la glucosa son utilizados en la síntesis de biomasa. Además el $Y_{XS}^{Máx}$ de *C. acetobutylicum* fue ligeramente superior al observado para *C. butyricum* (0.220 - 0.279mol/mol).⁷⁶

3.5.3 Validación del modelo subespaciado Según LÜTKE-EVERSLOH and BAHL (2011) la mejor aproximación para la acidogénesis es el estado que alcanza 0.7moles de butírate y 0.6moles de acetato por mol de glucosa.⁴ Entonces, se alimentó este subespacio ($h/i=0.857$) a la estructura del modelo subespaciado con el propósito de comprobar si tiene la capacidad de proporcionar el mayor óptimo de n-butanol. En la tabla 20 se comparan los resultados de la validación del modelo subespaciado con el modelo subespaciado IV.

105 Hongo, M. Nippon Nogei Kagaku Kaishi. 31. (1957): p. 735-738. Citado por: KIM, Byung Hong et al. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 48. No 4. (1984): p. 764-770.

76 CHEN, Xi. et al. Op. Cit., p. 53.

4 LÜTKE-EVERSLOH, Tina and BAHL, Hubert. Op. Cit., p. 17.

Tabla 20. Comparación entre la validación del modelo subespaciado y el modelo subespaciado IV

Metabolitos	Subespaciado IV	Validación
Glucosa	$g=1.00$	$g=1.00$
Lactato	$l=0.00$	$l=0.00$
NADH plus	$t=1.63$	$t=1.27$
CO ₂	$f+d=2.07$	$f+d=2.13$
H ₂	$w=0.405$	$w=0.766$
Biomasa	$q=0.300$	$q=0.300$
Acetato FTB/BuQ	$m=0.281$	$m=0.405$
Acetato CoAT	$j=0.053$	$j=0.100$
Acetato neto	$a=0.024$	$a=0.095$
Butírate FTB/BuQ	$n=0.765$	$n=0.643$
Butírate CoAT	$k=0.017$	$k=0.032$
Butírate neto	$c=0.039$	$c=0.025$
Acetona	$j+k+d=0.070$	$j+k+d=0.132$
Etanol	$e=0.018$	$e=0.024$
n-Butanol	$b=0.870$	$b=0.784$
ATP residual	1.40	1.52
Y _{BG} [mol/mol]	0.870	0.784
Y _{BG} [másico:g/g]	0.358	0.324
Y _{SG} [másico:g/g]	0.387	0.371

Fuente: Autor.

De los resultados obtenidos en la tabla 20 se puede afirmar que el modelo subespaciado se validó exitosamente. Sin embargo, el óptimo de n-butanol fue menor al calculado (0.784moles) por el modelo subespaciado IV. Todo esto significa que el subespacio IV fue el estado de la acidogénesis que condujo hacia el óptimo teórico absoluto de n-butanol, ratificando que de todos los modelos evaluados el modelo subespaciado IV fue el que predijo el valor más elevado de n-butanol (0.870moles).

Como complemento al análisis de los modelos subespaciados se graficó la tendencia de los metabolitos como una función del subespacio o relación molar de acetato/butírate antes de iniciar la solventogénesis (figura 8). En la figura 8A se observa que una mayor disponibilidad de poder reductor (NADH plus), más

elevado fue el óptimo teórico de n-butanol y un rendimiento de butírate residual más alto. Los demás metabolitos (figura 8B) aumentaron cuando la relación acetato/butírate se elevó. Además en la medida que el poder reductor empezó a limitarse el n-butanol decreció y como respuesta al balance de masa del sistema los otros productos de la fermentación aumentaron.

La simulación de los modelos subespaciados II, III y IV, y su posterior validación estuvieron de acuerdo con la evidencia experimental de que en *C. acetobutylicum* se genera un exceso de ATP (figura 8B).^{8,16,52,104} En cultivos continuos altas relaciones de ATP/ADP han sido asociadas al balance de pH a través de la membrana citoplasmática.⁹¹ Además, elevados niveles de ATP fueron vinculados al inicio de la producción de solventes.^{52,91,104} Indudablemente el ATP es fundamental en las funciones de mantenimiento celular de la acidogénesis y solventogénesis.^{8,20}

En la figura 8B se observa que el ATP residual tiende a incrementarse conforme se aumenta la relación acetato/butírate. Un comportamiento similar se presenta en la simulación de un modelo a escala del genoma, donde la energía de mantenimiento asociado al crecimiento celular también aumenta con la relación acetato/butírate,³⁶ justificando de alguna forma las grandes cantidades de ATP.

8 PAPOUTSAKIS, Efetherios Terry. Op. Cit., p. 20.

16 GRUPE, Helga. and GOTTSCHALK, Gehard. Op. Cit., p. 22.

52 MEYER, C. and PAPOUTSAKIS, E. Op. Cit., p. 42.

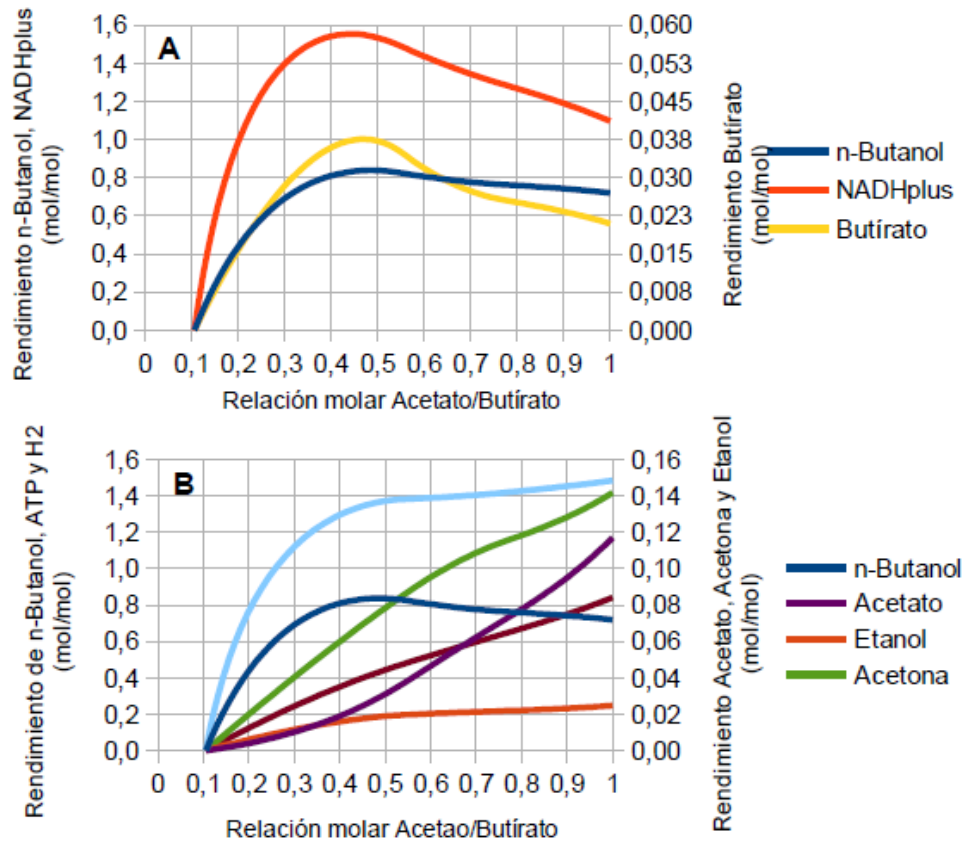
104 MEYER, Charles. L and PAPOUTSAKIS, Eleftherios. Op. Cit., p. 99.

91 HUSEMANN, Michael H. W and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Op. Cit., p. 72.

20 DESAI, Ruchir P. et al. Op. Cit., p. 23.

36 LEE, Joungmin. et al. Op. Cit., p. 34.

Figura 8. Tendencia de los metabolitos de los modelos subespaciados



(A) Relación entre el poder reductor (NADH), butirato y la producción de n-butanol. (B) Incremento del acetato, etanol, acetona, H₂ y ATP en la medida que se aumentó la relación molar acetato/butirato.

En síntesis, los modelos subespaciados poseen la capacidad de explicar los fenómenos del metabolismo de *C. acetobutylicum* relacionados con la producción de n-butanol. Además, sugieren que para alcanzar elevados rendimientos de n-butanol se debe cumplir: I) inhibición de la hidrogenasa en la producción de hidrógeno molecular, con la finalidad de proporcionar el poder reductor necesario para la síntesis de n-butanol, II) inhibición de la FTA y de la AQ, para evitar altas concentraciones de acetato y acetona y III) sobre expresión de la FTB y BuQ, de manera que se favorezca la reasimilación del butirato sin la producción concomitante de acetona.

3.6 RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.6.1 Cultivo Batch sin control de pH Los experimentos sin control de pH se realizaron en un biorreactor Batch o fermentador discontinuo (BIOFLO 110) estrictamente anaerobio durante 36 horas. Las condiciones de operación fueron las siguientes: a) glucosa inicial de 40.14g/L, b) pH inicial de 5.23, c) temperatura constante de 37°C, d) velocidad de agitación constante de 200rpm y e) concentración del inóculo de 10%v/v en un medio de fermentación de 2L. Los resultados obtenidos de la fermentación sin control de pH se presentan en la figura 9.

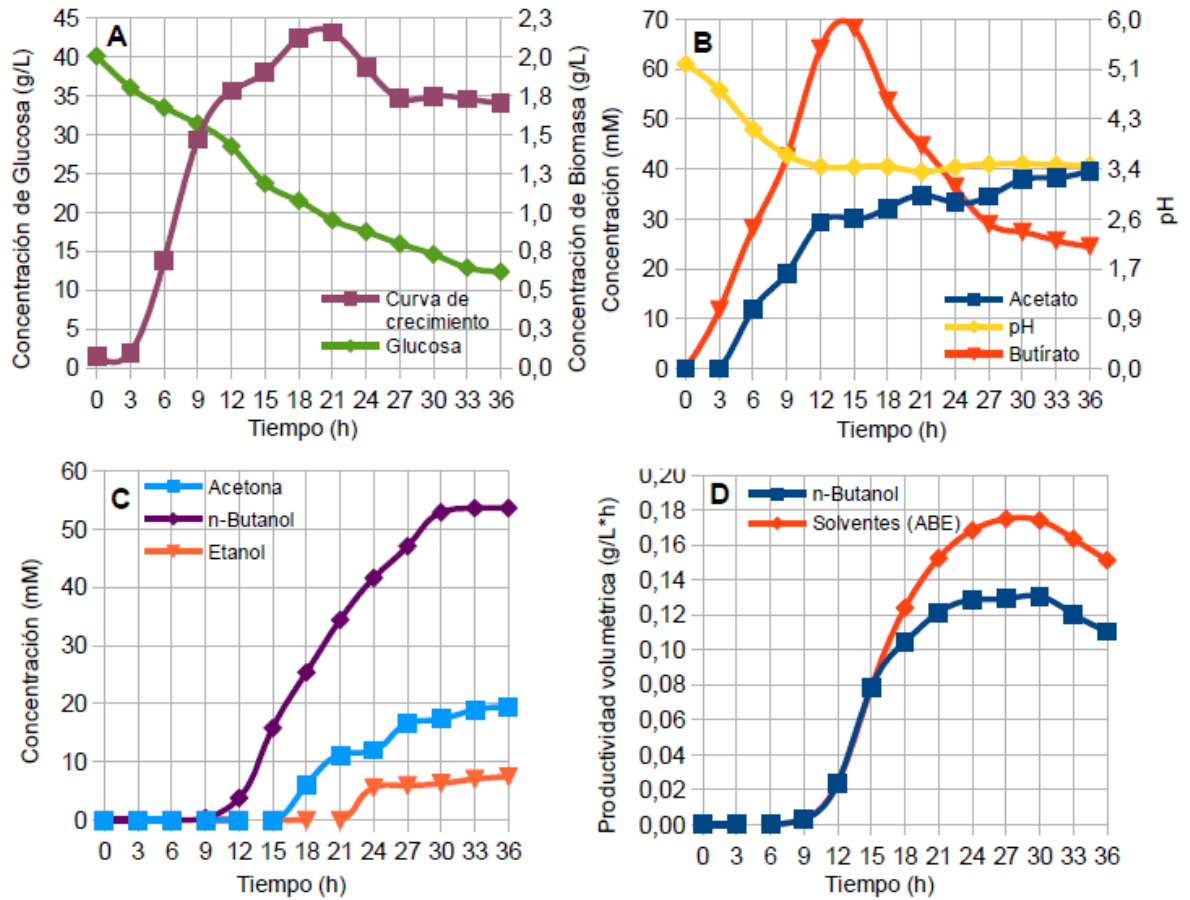
Los datos de la producción de ABE de la figura 9 mostraron un comportamiento bifásico (acidogénesis y solventogénesis), característico de este tipo de fermentaciones. En la figura 9A se observa que la producción máxima de biomasa fue de 2.21g/L y la glucosa no se metabolizó completamente, logrando tan solo una conversión del 69.21%.

Las primeras 12 horas de fermentación corresponden a la fase de crecimiento exponencial (acidogénesis), en la cual el pH del medio disminuyó debido a la producción de acetato y butírate (figura 9A y 9B). Como consecuencia de la reasimilación de los ácidos (acetato y butírate) e inicio de la solventogénesis o producción de ABE, el pH del medio se mantuvo aproximadamente constante^{16,51} (figura 9B y 9C).

16 GRUPE, Helga. and GOTTSCHALK, Gehard. Op. Cit., p. 22.
51 HAN, B. and EZEJI, T. Op. Cit., p. 42.

ZHANG, Y;

Figura 9. Producción de ABE a partir de glucosa utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824 sin control de pH.



A) Curva de crecimiento y consumo de glucosa, B) Perfil de producción de ácidos y pH, C) Producción de ABE y D) Productividad volumétrica de n-butanol y solventes ABE.

En la solventogénesis la producción neta de ácidos se interrumpe debido a la activación de las enzimas acetoacetyl-CoA acetato/butirato CoAT, FTA/AQ y FTB/BuQ en dirección de la formación de acetoacetyl-CoA, acetyl-CoA y butiril-CoA respectivamente. Al mismo tiempo que se sintetizaron los solventes se evidenció un ligero aumento del acetato (figura 9B), probablemente por la generación adicional de ATP a través de la acetato quinasa.²⁰

El máximo rendimiento de n-butanol por mol de glucosa consumida fue de

²⁰ DESAI, Ruchir P. et al. Op. Cit., p. 23.

0.37mol/mol (figura 9C), la máxima productividad volumétrica de n-butanol de 0.13g/L*h y la productividad de solventes de 0.17g/L*h (figura 9D). Estos parámetros fueron alcanzados a las 30 horas de fermentación, justamente en la fase de crecimiento estacionaria^{16,51} (figura 9A).

3.6.2 Cultivo Batch a pH 5 constante. En la fermentación a pH controlado se utilizaron las mismas condiciones iniciales y operacionales de los experimentos sin control de pH (punto 3.6.1). Se usó NaOH 1.5N y H₂SO₄ 1.5N para mantener el pH en 5.0 durante toda la prueba. En general la producción neta de metabolitos extracelulares, la biomasa y el consumo de glucosa (figura 10) fueron más elevados comparados con los observados en la prueba realizada sin control de pH (figura 9).

La fermentación a pH 5.0 constante reveló que al cabo de 30 horas se utilizó toda la glucosa y la máxima concentración de biomasa fue de 2,81g/L (figura 10A); un 27.3% más de la biomasa producida en los experimentos sin control de pH. La formación de acetato y butírate se prolongó más allá de la fase de crecimiento exponencial (figura 10A y 10B). Tal comportamiento contrasta opuestamente con los datos obtenidos para *C. acetobutyicum* ATCC 824 en condiciones similares (55g/L de glucosa inicial).⁹² Por otro lado, dichas tendencias fueron semejantes a las reportadas por *C. acetobutyicum* M5 y sus cepas recombinantes utilizando 80g/L de glucosa inicial en un volumen de reacción de 4.0L.¹⁰⁰

En la figura 10C se observa que la máxima concentración de n-butanol fue de 71.5mM, la cual equivale a un rendimiento de 0.32moles por mol de glucosa consumida. Aunque la producción máxima de n-butanol superó a la obtenida sin control de pH (figura 9C), no sucedió lo mismo con el rendimiento. Lo anterior significa un menor aprovechamiento de la glucosa para la producción de n-

16 GRUPE, Helga. and GOTTSCHALK, Gerhard. Op. Cit., p. 22.

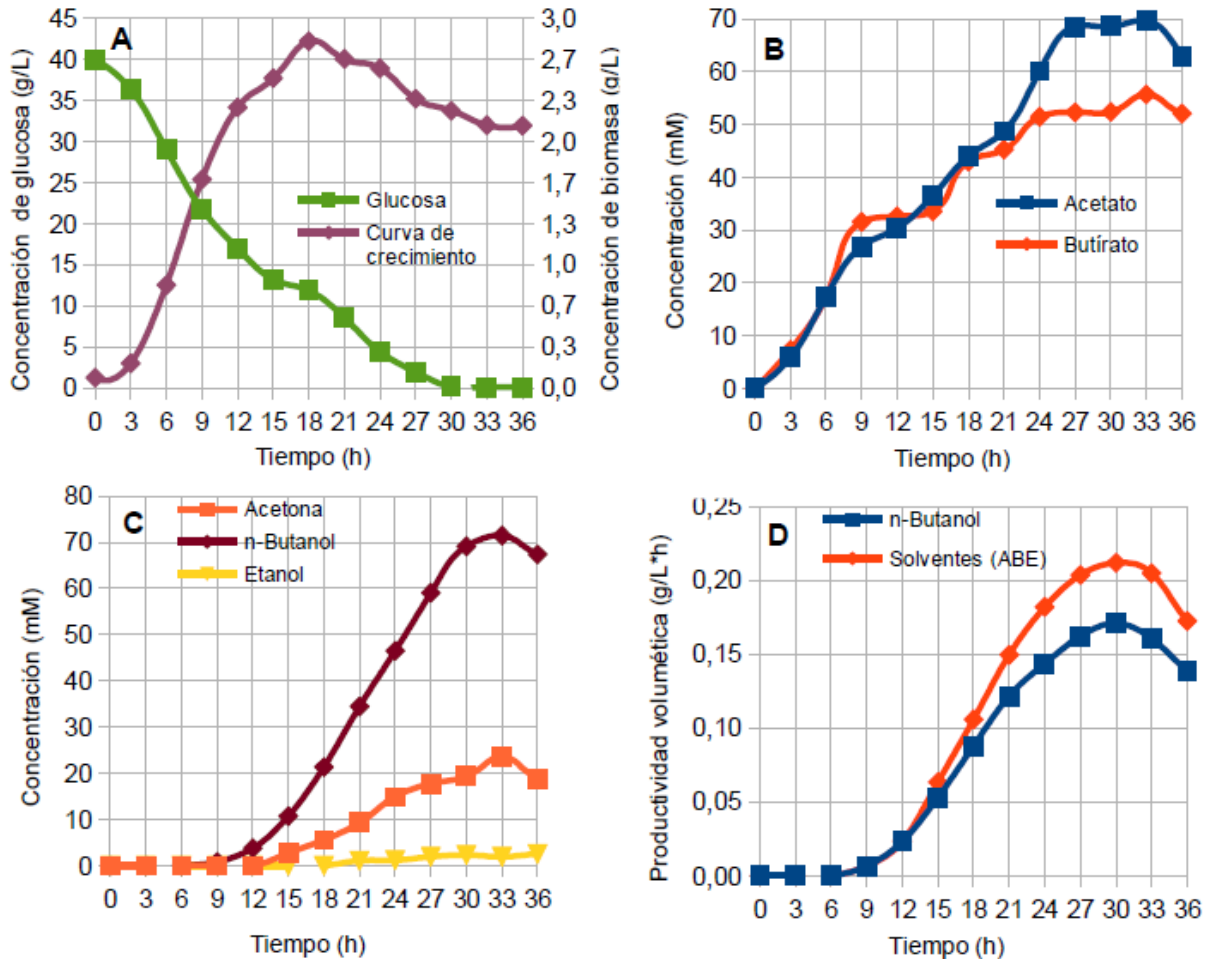
51 ZHANG, Y; HAN, B. and EZEJI, T. Op. Cit., p. 42.

92 MONOT, Frederic. et al. Op. Cit., p. 72.

100 SILLERS, Ryan. et al., Op. Cit., p. 97.

butanol, y puede atribuirse a su mayor consumo para la formación de los otros productos extracelulares.

Figura 10. Producción de ABE a partir de glucosa utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824 a pH 5 constante.



A) Curva de crecimiento y consumo de glucosa, B) Perfil de producción de ácidos, C) Producción de ABE y D) Productividad volumétrica de n-butanol y solventes ABE.

Por otro lado, la productividad máxima de n-butanol (0.17g/L*h) y solventes (0.21g/L*h) presentados en la figura 10D, sugiere mayores beneficios operacionales por unidad de tiempo y de volumen. Es decir, mayores concentraciones de n-butanol y/o solventes producidos en el mismo tiempo de

fermentación.

La mejor relación acetona:n-butanol:etanol (A:B:E) fue de 30:90:10 (sin control de pH) y 24:71:2 (a pH 5.0). Las dos relaciones A:B:E tienen proporciones estequiométricas similares entre acetona y n-butanol, pero difieren en la de acetona-etanol y n-butanol-etanol. Debido a que en la fermentación a pH controlado la producción de etanol fue baja. También divergen con la relación típica de A:B:E (60:90:30) para *C. acetobutylicum* ATCC 824, señalando una mayor producción de n-butanol por cantidad de acetona y etanol formados.

En la tabla 21 se comparan los resultados experimentales obtenidos en esta investigación con los reportados en la literatura para las principales cepas productoras de ABE. El rendimiento y la productividad de n-butanol logrados en este trabajo fueron más bajos a los alcanzados por otros microorganismos (tabla 21). Por lo tanto, los resultados experimentales sugieren que las condiciones del medio de fermentación no fueron las mejores para la producción de n-butanol.

Rendimientos de n-butanol por glucosa consumida superiores al teórico (0.828mol/mol ó 0.341g/g) estimado en este trabajo han sido obtenidos en fermentaciones de almidón o hidrolizados de yuca, maíz o papa (tabla 21). Estos sustratos tienen presentes otros azúcares fermentables que se suman a la síntesis de n-butanol,³ por tal razón se genera un falso rendimiento cuando se comparan con la glucosa consumida.

³ QURESHI, Nasib et al. Op. Cit., p. 16.

Tabla 21. Comparación de rendimientos de n-butanol para la principales cepas productoras de ABE

Microorganismo	Sustrato utilizado [g/L]	Proceso biotecnológico	B [g/L]	Q _B [g/L* h]	Y _{BS} [g/g]	Referencia
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Glucosa (40)	Lotes	9.19	---	0.219	34
	Glucosa (40)	Lotes	3.92	0.131	0.152	Este trabajo
	Glucosa	Lotes	5.30	0.171	0.133	Este trabajo
	Glucosa	Continuo recirculación	4.20	2.83	0.233	53
	Hidrolizado almidón de yuca (98.2)	Lotes extracción L-L	34.4	0.340	0.350	54
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Suero permeado Lactosa (157.5)	Continuo perstracción	37.4	0.130	0.237	61
	Pulpa de papa Maltosa (37.6)	Continuo células inmovilizadas	5.52	0.712	0.147	63
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 792	Lactosa (18.96)	Continuo lecho empacado	4.93	2.66	0.260	55
<i>C. acetobutylicum</i> EA2018	Hidrolizado de maíz (60)	Lotes	14.1	0.294	<0.235	64
<i>C. acetobutylicum</i> CICC 8012	Glucosa (60)	CCCF pervaporación	61.3	0.205	0.183	65
<i>C. acetobutylicum</i> JB 200	Bagazo de yuca hidrolizado (244.6)	Semicontinuo arrastre de gas	59.8	0.350	0.250	67
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	Glucosa (29)	Lotes alimentado	16.0	---	0.550	60
	Almidon de maíz Hidrolizado (60)	Lotes	16.2	0.245	0.370	68
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Almidón de maíz (37.2)	Lotes	14.3	0.199	0.384	5
	Glucosa (500.1)	Lotes alimentado arrastre de gas	151.7	0.755	0.303	72
<i>C. beijerinckii</i> P260	Paja de trigo (86) Carbohidratos(28.4)	Lotes SSF	7.40	0.167	0.261	49
<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052	Glucosa (29.6)	Continuo	7.10	0.220	0.240	69
	Glucosa (30.5)	Continuo células inmovilizadas	13.4	0.400	0.450	

Existe información en la literatura sobre rendimientos de n-butanol por glucosa consumida más elevados que la solución teórica trivial (1mol/mol o 0.412g/g). Dos casos específicos son los de *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 y *C. beijerinckii*

NCIMB8052, donde los rendimientos fueron 0.55g/g⁶⁰ y 0.45g/g⁶⁹ respectivamente (tabla 21). Cabe señalar que al medio de cultivo de estos microorganismos se les adicionó butírate, el cual es un precursor o cosustrato de la síntesis de n-butanol, ocasionando también un falso rendimiento.

Tomando como única referencia la glucosa consumida y sin la adición de otros cosustratos (acetato y/o butírate), el rendimiento teórico de n-butanol calculado en esta investigación fue más elevado que cualquiera de los valores reportados en la literatura.

3.7 MODELADO CINÉTICO

En la fase de crecimiento exponencial el tiempo de duplicación (t_d) y la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) para la prueba sin control de pH fueron 1.92h y $0.36h^{-1}$ respectivamente. Estos parámetros cinéticos fueron similares a los obtenidos en cepas recombinantes de *C. acetobutylicum* ATCC 824 a pH 5.0, cuyos valores de t_d oscilaron entre 1.4h y 2.2h.^{93,106}

Para la fermentación a pH 5.0 controlado se esperaba que el tiempo de duplicación (t_d) fuera cercano a 1.0107 y 1.2h⁹³, pero el t_d fue de 1.98h a una $\mu_{m\acute{a}x}=0.35h^{-1}$, el cual está dentro del intervalo de los valores calculados para cepas recombinantes (*C. acetobutylicum* M5) no productoras de solventes.¹⁰⁰

Evidentemente la velocidad de crecimiento para ambas condiciones experimentales (sin control de pH y a pH 5.0 constante) fue más lenta comparada

60 TASHIRO, Yukihiro. et al. Op. Cit., p. 44

69 LEE, Sun-Mi et al. Op. Cit., p. 46.

93 HARRIS, Latonia M. et al. Op. Cit., p. 72.

106 TOMAS, Christopher A. WELKER, Neil E. and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Applied and environmental microbiology. Vol. 69. No. 8. (2003): p. 4951–4965 .

107 ALSAKER, Keith V. and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Journal of bacteriology. Vol. 187. No. 20. (2005): p. 7103–7118.

100 SILLERS, Ryan. et al., Op. Cit., p. 97.

con la información reportada en la literatura, confirmando que las condiciones del medio de fermentación no favorecieron la cinética del crecimiento celular y por ende afectando la producción de n-butanol.

Los datos experimentales de esta investigación se utilizaron como complemento para la calibración de los modelos cinéticos estructurados propuestos por Fuciños y Pallares (2011) en la fermentación Batch sin control de pH⁹⁴ y por Rojas y González (2011) en la fermentación Batch a pH 5.0 controlado.⁹⁵ Básicamente se calcularon un nuevo conjunto de parámetros cinéticos (tabla 22), los cuales mejoraron la predicción o simulación de la producción de n-butanol en la fermentación de la glucosa utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824.

En la figura 11 se compara la dinámica experimental y simulada de los metabolitos extracelulares de la fermentación ABE (*C. acetobutylicum* ATCC 824) a pH 5.0 constante. La predicción de la producción de n-butanol (figura 11A) logró el mismo nivel de correlación ($R^2=0.992$) al obtenido en el modelo matemático de la fermentación de la glucosa utilizando *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564⁴⁶ (tabla 22). Además, puede afirmarse que la calidad del ajuste de los restantes compuestos extracelulares también fue buena (figuras 11B a 11F). Los resultados de la simulación sin control de pH exhibieron un menor grado de correlación (anexo F).

Tabla 22. Comparación de parámetros del modelo cinético estructurado

Parámetro	Shinto, H. et al., 2007	Fuciños y Pallares (2011)	Rojas y González (2011)	Este trabajo
$V_{máx1}$ (h^{-1})	3.20	1.15	4.34	5.84
$V_{máx10}$ (h^{-1})	20.0	20.0	21.0	25.2
K_{m1} (mM)	46.0	20.5	45.2	48.7
K_{m10} (mM)	1.00	1.00	0.68	3.97
$V_{máx19}$ (h^{-1})	3.15	7.75	4.40	23.6
K_{m19} (mM)	5.00	2.00	6.63	16.8
$V_{máx4}$ (h^{-1})	7.50	0.001	4.60	5.14

94 FUCIÑOS, Viviana y PALLARES, Andrea. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. (2011).

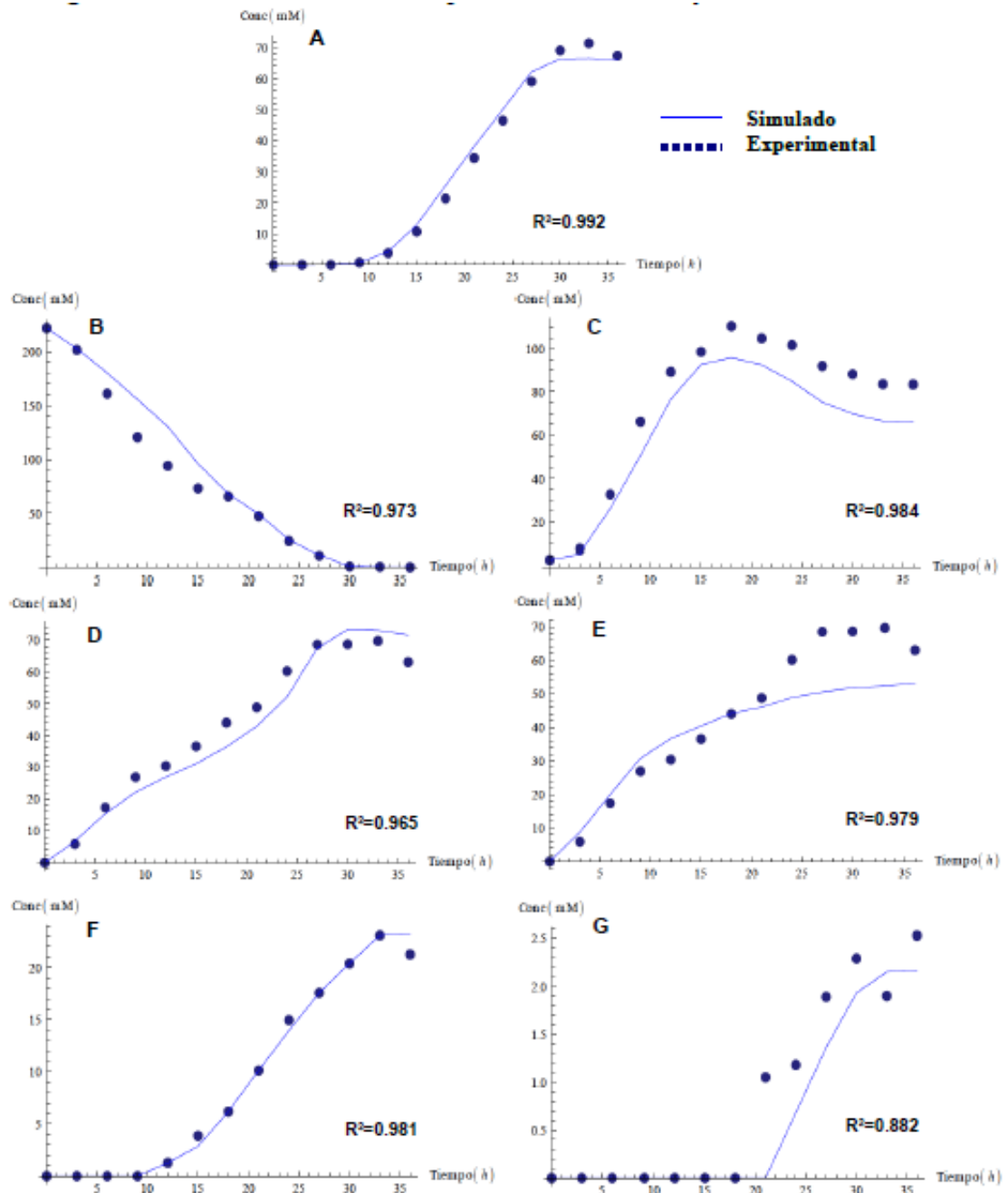
95 ROJAS, Cindy y GONZÁLEZ, Nancy. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. (2011).

46 SHINTO, Hideaki. et al. Op. Cit., p. 40.

Tabla 22. Continuación

K_{m4} (mM)	177	200	800	799.4
$V_{m\acute{a}x14}$ (h^{-1})	10.0	40.0	27.3	21.8
K_{m12} (mM)	1.10	---	2.21	2.32
$V_{m\acute{a}x12}$ (h^{-1})	8.10	---	---	12.5
K_{m14} (mM)	5.20	15.0	---	6.35
$V_{m\acute{a}x15}$ (h^{-1})	80.0	9.50	---	38.3
K_{mB15} (mM)	50.0	9.00	---	51.2
K_{m9} (mM)	51.0	0.05	---	46.9
$V_{m\acute{a}x9}$ (h^{-1})	26.5	22.8	---	999.9
K_{m11} (mM)	30.0	27.0	---	36.7
$V_{m\acute{a}x11}$ (h^{-1})	7.45	31.8	---	1.39
$V_{m\acute{a}x6}$ (h^{-1})	180	180	---	175.7
K_{m5} (mM)	50.0	3.00	---	45.6
K_{m6} (mM)	1.50	0.10	---	5.75
$V_{m\acute{a}x5}$ (h^{-1})	9.70	98.5	---	76.5
K_{is1} (mM)	55.6	1.75	---	49.1
$V_{m\acute{a}x7}$ (h^{-1})	0.30	4.5	---	6.59
K_{ji1} (mM)	67.5	2.0	---	70.7
K_{m17} (mM)	4.90	30	---	10.8
K_{ji19} (mM)	67.5	379.4	---	68.6
K_{ji12} (mM)	23.0	---	---	24.9
$V_{m\acute{a}x18}$ (h^{-1})	100	3.0	---	199.9
$V_{m\acute{a}x17}$ (h^{-1})	35.0	5.0	---	7.39
K_{m18} (mM)	6.10	0.5	---	15.3
K_{13}^a (h^{-1})	0.017	0.017	---	0.45
K_{mA15} (mM)	15.0	15.0	---	21.0
$V_{m\acute{a}x8}$ (h^{-1})	19.0	3.0	---	20.2
K_{mB8} (mM)	70.0	77.2	---	71.8
K_{mA8} (mM)	40.0	60.0	---	40.4
K_{a17} (mM)	2.20	2.20	---	6.03
K_{a19} (mM)	2.20	2.20	---	11.0
$V_{m\acute{a}x2}$ (h^{-1})	40.0	10.0	---	40.8
K_{m3} (mM)	26.5	26.5	---	27.2
K_{m7} (mM)	50.0	25.0	---	48.0
K_{m2} (mM)	10.0	10.0	---	12.5
$V_{m\acute{a}x3}$ (h^{-1})	120.0	30.0	---	119.1
$V_{m\acute{a}x16}$ (h^{-1})	12.0	100	---	44.4
K_{m16} (mM)	10.0	200	---	3.01
R^2 (n-butanol)	0.993	0.775	0.970	0.992

Figura 11. Perfil experimental y simulado de la producción de ABE a partir de glucosa utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824 a pH 5 constante



A) n-butanol, B) glucosa, C) biomasa, D) acetato, E) butírate, F) acetona y G) etanol.

Fuente: Autor.

4. CONCLUSIONES

- Los modelos subespaciados demostraron que a partir de un lógico y apropiado modelado y simulación del balance de masa de carbono elemental, el balance de electrones, las restricciones bioquímicas, termodinámicas y cinéticas de la ruta metabólica de *C. acetobutylicum* ATCC 824 fue posible la optimización teórica no *trivial* de la producción de n-butanol.
- Se comprobó que el modelo subespaciado IV estimó el óptimo de n-butanol (0.870 moles por mol de glucosa consumida) más elevado para el metabolismo primario de *C. acetobutylicum* ATCC 824, y sí se tiene en cuenta la síntesis de biomasa el óptimo de n-butanol disminuye a 0.828 mol/mol. Sin embargo, estos valores superan ampliamente los óptimos teóricos y experimentales reportados hasta la actualidad para las cepas productoras de n-butanol.
- El exitoso modelado, simulación y optimización del n-butanol utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824, hacen de este tipo de modelo matemático el pionero y único en su especie para estimar el óptimo teórico de n-butanol. Inclusive, la base conceptual desarrollada en esta investigación se puede aplicar a otros sistemas biológicos.
- El modelado de la acidogénesis (**modelo subespaciado parte I**) como un fenómeno inicial independiente, generó solo cuatro estados termodinámicos o subespacios de los infinitamente posibles. La posterior integración de los subespacios a la solventogénesis determinó que no todos fueron factibles para alcanzar un máximo teórico de n-butanol. Por lo tanto, los denominados modelos subespaciados son los primeros en predecir el óptimo teórico de n-butanol sin ignorar la dinámica del metabolismo de *C. acetobutylicum* ATCC 824 y la sinergia con los demás metabolitos extracelulares (acetato, butírate,

acetona, etanol, etc).

- Los modelos subespaciados poseen la capacidad de explicar y predecir observables del metabolismo celular de *C. acetobutylicum* ATCC 824. Estableciendo así las bases teóricas para la comprensión de la estructura y las características fenotípicas del metabolismo. Definiendo a su vez el papel que juegan las reacciones claves de la acidogénesis, solventogénesis y su relación con la producción máxima posible de n-butanol.
- La transferencia y distribución de electrones en la acidogénesis y solventogénesis fueron simuladas correctamente por los modelos subespaciados. En teoría la relación entre la producción de n-butanol, la ferredoxina y la transferencia de electrones es indirecta. Porque en la medida que se inhiba la ferredoxina/hidrogenasa el balance electrónico ocasiona un flujo más elevado de NADH como consecuencia del aumento en la actividad de la ferredoxina NAD(P)/NAD reductasa. Favoreciendo, de esta manera la producción de n-butanol.
- Los modelos estequiométricos subespaciados desarrolladas en esta investigación indican que es posible obtener altos rendimientos de n-butanol siempre y cuando se cumplan las siguientes condiciones: I) inhibición de la hidrogenasa en la producción de hidrógeno molecular, con la finalidad de proporcionar el poder reductor necesario para la síntesis de n-butanol, II) inhibición de las enzimas fosfotransferasa acetilasa y acetato quinasa, para evitar altas concentraciones de acetato y acetona y III) sobre expresión de las enzimas fosfotransferasa butirulasa y butírate quinasa, de manera que se favorezca la reasimilación del butírate sin la producción concomitante de acetona.
- Los planteamientos teóricos del metabolismo primario de *Clostridium*

acetobutylicum ATCC 824 como un fenómeno global (**modelo estequiométrico simplificado**) o como eventos paralelos de la glucólisis, acidogénesis y solventogénesis (**modelo estequiométrico generalizado**); no suministraron información sobre la fisiología o dinámica metabólica de la mayoría de los productos extracelulares y la solución simplemente convergió al óptimo trivial de n-butanol.

- Las condiciones experimentales del medio de fermentación sin control de pH y a pH 5.0 constante, no fueron las adecuadas para alcanzar rendimientos y productividades de n-butanol similares a las reportadas en la literatura para las cepas productoras de n-butanol. Sin embargo, el modelado cinético consiguió excelentes niveles de correlación ($R^2=0.992$) en la predicción de la concentración de n-butanol a lo largo de la fermentación a pH 5.0 constante.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. LEE, Sang Yup; PARK, Jin Hwan; JANG, Seh Hee; NIELSEN, Lars K; KIM; Jaehyun and JUNG, Kwang S. Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 101, No. 2. (October 1, (2008): p. 209-228.
2. EZEJI, T. C; QURESHI, N and BLASCHEK, H. P. Production of acetone butanol (AB) from Liquefied corn starch a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii* coupled with product recovery by gas stripping. *J Ind Microbiol Biotechnol*. Vol. 34. (2007): p. 771-777.
3. QURESHI, Nasib; EZEJI, Thaddeus; EBENER, Jennifer; DIEN, Bruce S; COTTA, Michael A and BLASCHEK, Hans P. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of the acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Biosource Technology*. Vol. 99. (2008): p. 5915-5922.
4. LÜTKE-EVERSLOH, Tina and BAHL, Hubert. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current opinion in Biotechnology*. (2011): 22. p. 634-647.
5. EZEJI, T. C; QURESHI, N and BLASCHEK, H. P. Continuous butanol fermentation and feed starch retrodegradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Biotechnology*. Vol. 115. (2005): p 179-187.
6. Green Biologics Ltda. [Visitado el 01 de octubre, 2012]. Disponible en: <http://www.greenbiologics.com/biobutanol-fuel.php>

7. DÜRRE, Peter. Fermentative Butanol Production Bulk Chemical an Biofuel. Annals of the New York Academy of Sciences. 1125. (2008): p. 353-362.
8. PAPOUTSAKIS, Efetherios Terry. Equations and Calculations for Fermentations of Butyric Acid Baceteria. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXVI. (1984): p. 174-187.
9. JONES, David T y WOODS David R. Acetone-Butanol Fermentation Revisted. Microbiological Reviews. Vol 50. No 4. (1986): p 484-524.
10. GHESHLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. Biotechnology Advances. Vol. 27 (2009): p. 764–781.
11. COSTA, JM. Solvent toxicity in the acetone-butanol fermentation. Proc Ann Biochem Eng Symp 11. (1981): p. 83-90 . Citado por HARTMANIS, Maris G N; KLASON, Tomas y GATENBECK, Sten. Uptake and activation of acetate and butyrate in Clostridium acetobutylicum . Appl Microbiol Biotechnol. Vol 20. (1984): p. 66-71.
12. HERRERO, A. A; R. F. GOMEZ, B; SNEDECOR, C. J; TOLMAN, and M. F. ROBERTS. Growth inhibition of Clostridium thermocellum by carboxylic acids: a mechanism based on uncoupling by weak acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 22. (1985): p. 53-62. Citado por WIESENBORN, Dennis P; RUDOLPH, Frederick B and PAPOUTSAKISI, Eleftherios T. Coenzyme A Transferase from Clostridium acetobutylicum ATCC 824 and Its Role in the Uptake of Acids. Applied and environmental microbiology. Feb. (1989): p. 323-329.
13. KELL, DB; PECK, MW; RODGER, G and MORRIS, JGX. On the permeability

to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 99 (1973): p. 81–8. Citado por: GHESLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*. Vol. 27 (2009): p. 764–781 .

14. FOND, O; MATTA-AMMOURI, G; PETITDEMANGE, H and ENGASSER, JM. The role of acids on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 22 (1985): p. 195–200. Citado por: GHESLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*. Vol. 27 (2009): p. 764–781.
15. GRUPE, Helga and GOTTSCHALK, Gehard. *Clostridium acetobutylicum* and the production of solvents. In H. Heslot, J. Davies, J. Florent, L. Bobichon, G. Durand, and L. Penasse (ed.), *Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms (GIM 90)*, vol. II. Societ Francaise de Microbiologie, Strasbourg, France. (1990): p. 715-729.
16. GRUPE, Helga. and GOTTSCHALK, Gehard. Physiological Events in *Clostridium acetobutylicum* during the Shift from Acidogenesis to Solventogenesis in Continuous Culture and Presentation of a Model for Shift Induction. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 58. No 12. (1992): p. 3896-3902.
17. TERRACCIANO, Joseph S. and KASHKET, Eva R. Intracellular Conditions Required for Initiation of Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 52. No 1. (1986): p. 86-91.
18. BAHL, H. and GOTTSCHALK G. Parameters effecting solvent production by

- Clostridium acetobutylicum in continuous culture. Biotechnol Bioeng Symp. Vol 14 (1984): p. 215–23. Citado por:GHESHLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. Biotechnology Advances. Vol. 27 (2009): p. 764–781 .
19. BAHL, H; GOTTWALD M; KUHN A; RALE V; ANDERSCH W. And GOTTSCHALK, Nutritional Factors affecting the Ratio of Solvents Produced by Clostridium acetobutylicum. Appl Environ Microbiol. Vol. 52 (1986): p. 169–72. Citado por: GHESHLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. Biotechnology Advances. Vol. 27 (2009): p. 764–781 .
 20. DESAI, Ruchir P; HARRIS, Latonia M; WELKER, Neil E. and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Metabolic Flux Analysis Elucidates the Importance of the Acid-Formation Pathways in Regulating Solvent Production by Clostridium acetobutylicum. Metabolic Engineering 1. (1999): p. 206-213.
 21. HARTMANIS, Maris G N; KLASON, Tomas y GATENBECK, Sten. Uptake and activation of acetate and butyrate in Clostridium acetobutylicum . Appl Microbiol Biotechnol. Vol 20. (1984): p. 66-71 .
 22. DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Stoichiometric model of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. Journal of Biotechnology. Vol. 71. (1999): p. 191-205.
 23. TASHIRO, Yukihiro; TAKEDA, Katsuhisa; KOBAYASHI, Genta; SONOMOTO, Kenji; ISHIZAKI, Ayaaki and YOSHINO, Sadazo. High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed batch culture with pH-stat Continuous butyric acid and glucose feeding method. Journal of Bioscience and bioengineering. Vol. 98. No. 4. (2004): p 263-268.

24. VASCONCELOS, Isabel. GIRBAL, Laurence and SOUCAILLE , Philippe. Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Grown in Chemostat Culture at Neutral pH on Mixtures of Glucose and Glycerol. *Journal of Bacteriology*. Vol. 176. No. 3 (1994): p. 1443-1450.
25. JUNGERMANN, K; THAUER, RK; LEIMENSTOLL, G. and DECKER K. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. *Biochim Biophys Acta* (1973): p. 268–80.
26. LLANERAS, Francisco y PICÓ, Jesús. Stoichiometric Modelling of Cell Metabolism. *Journal od Bioscience and Bioengineering*. Vol. 105. (2008): p. 1-11.
27. STEPHANOPOULOS , Gregory N; ARISTIDOU , Aristos A. and NIELSEN, Jens. *Metabolic Engineering: Principles and Metadologies*. Academic Press. (1998): p. 25.
28. ROGERS, Palmer. Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. *Appl. Microbiol*. Vol. 31 (1984): p. 1-60.
29. THAUER, Rudolf K; JUNGERMANN, Kurt and KARL, Decker. Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriological Review*. Vol. 41 N° 1. (1977): p.100-180.
30. LALEH, Yerushalmi ; VOLESKY, B. LEUNG, W. K. and NEUFELD, R. J. Variations of Solvent Yield in Acetone-Butanol Fermentation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 18 (1983): p. 279-286

31. HAGGSTROM, Lena. Acetone – Butanol Fermentation and its Variants . Biotech Adv. Vol. 3. (1985): p. 13-28.
32. WIESENBORN, Dennis P; RUDOLPH, Frederick B and PAPOUTSAKISI, Eleftherios T. Coenzyme A Transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Uptake of Acids . Applied and environmental microbiology. Feb. (1989): p. 323-329.
33. SENGER, Ryan S; y PAPOUTSAKIS, Eleftheruis T. Genome-Scale for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic Network Resolution and Analysis. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 101. No. 5. (2008): p. 1036-1052.
34. MONOT, Frederic. MARTIN, Jean-René. PITITDEMANGE, Henry and GAY, Robert. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 44. No 6. (1982): p. 1318-1324.
35. SENGER, Ryan S; y PAPOUTSAKIS, Eleftheruis T. Genome-Scale for *Clostridium acetobutylicum*: Part II. Metabolic Network Resolution and Analysis. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 101. No. 5. (2008): p. 1053-1071.
36. LEE, Joungmin; YUN, Hongseok; FEIST, Adam M; PALSSON, Bernhard Ø and LEE, Sang Yup. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. Appl Microbiol Biotechnol (2008): p. 849–862.
37. MAHADEVAN, R. and SCHILLING, C.H. The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. Metabolic Engineering, (2003): p. 264–276; Citado por: SALIMI, Fahimeh. MANDAL,

Rupasri. WISHART, David and MAHADEVAN, Radhakrishnan. Understanding *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Metabolism Using Genome Scale Thermodynamics and Metabolomics-based Modeling. Proceedings of the 11th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology (CAB 2010), Leuven, Belgium, July 7-9, 2010.

38. SALIMI, Fahimeh. MANDAL, Rupasri. WISHART, David and MAHADEVAN, Radhakrishnan. Understanding *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Metabolism Using Genome Scale Thermodynamics and Metabolomics-based Modeling . Proceedings of the 11th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology (CAB 2010), Leuven, Belgium, July 7-9, 2010.
39. KIM, Byung Hong; BELLOWS, Para; DATTA, Rathin and ZEIKUSI, J. G. Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentation: Utilization of Carbon Monoxide to Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 48. No 4. (1984): p. 764-770.
40. PEGUIN, Sophie and SOUCAILLE, Philippe. Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61. No 1. (1995): p. 403-405.
41. MCNEIL, Brian; HARVEY, Linda M. *Practical fermentatation technology*. 1 ed. London: John Wiley and Sons, Ltd, (2008): p. 167-230.
42. RATLEDGE, Colin; KRISTIANSEN, Bjorn. *Basic Biotechnology*. 3 ed. United Kingdon. (2006): p. 57, 491-493.
43. YANG, Xiaoping and TSAO, George G. Mathematical of inhibition kinetics in

acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnol. prog. Vol. 10. (1994): p 532-538.

44. NAPOLI, Fabio; OLIVIERI, Giuseppe; RUSSO, Maria Elena; MARZOCHELLA, Antonio and SALATINO, Piero. Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* Assessment of acidogenesis kinetics . Bioresource Technology 102 (2011): p. 1608–1614.
45. SHULER, Michael L. and KARGI, Fikret. Bioprocess Engineering. Basic Concepts. 2 Ed. Prentice Hall. (2002): p. 184-185.
46. SHINTO, Hideaki; YAMASHITA , Mayu; KOBAYASHI, Genta; SEKIGUCHI, Tatsuya; HANAI, Taizo; KURIYA, Yuki; OKAMOTO, Masahiro and SONOMOTO, Kenji. Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone–butanol–ethanol production . Journal of Biotechnology 131 (2007): p. 45–56.
47. SHINTO, Hideaki; TASHIRO , Yukihiro; KOBAYASHI, Genta; SEKIGUCHI, Tatsuya; HANAI, Taizo; KURIYA, Yuki; OKAMOTO, Masahiro and SONOMOTO, Kenji. Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone–butanol–ethanol fermentation . Process Biochemistry 43 (2008): p. 1452–1461.
48. QURESHI, N and MADDOX, I. S. 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 (2005): p 43-52.
49. QURESHI, Nasib; SAHA; Badal C; HECTOR, Ronald E; HUGHES, Stephen R; and COTTA, Michael A. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentetion using *Clostridium beijerinckii*:

Part I-Batch fermentation. Biomass and Bioenergy. Vol. 32 (2008): p 168-175.

50. WALTER, K; MERMELSTEIN, L. and PAPOUTSAKIS, E. Studies of Recombinant *Clostridium acetobutylicum* with Increased Dosages of Butyrate Formation Genes. Annals new york academy of sciences (1994): p. 69-72.
51. ZHANG, Y; HAN, B. and EZEJI, T. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 during butanol fermentation. New Biotechnology. Vol. 29. N° 3. February (2012): p. 345-351.
52. MEYER, C. and PAPOUTSAKIS, E. Continuous and biomass recycle fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. Bioprocess Engineering. 4. (1989): p. 1-10 .
53. MEYER, C. and PAPOUTSAKIS, E. Continuous and biomass recycle fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. Bioprocess Engineering. 4. (1989): p. 49-55.
54. LI, Xin; LI, Zhigang; ZHENG, Junping; SHI, Zhongping; and LI, Le. Yeast extract promotes phase shift of bio-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 using cassava as substrate . Bioresource Technology 125 (2012): p. 43–51.
55. MATTA-EL-AMMOURI, Ghassan; JANATI-IDRISSI, Rachid; RAMBOURG, Jean-Marc; PETITDEMANGE, Henri and Gay, R. Acetone butanol fermentation by a *Clostridium acetobutylicum* mutant with high solvent productivity. Biomass. Vol. 10, N° 2. (1986): p. 109-119.
56. QURESHI, N; MEAGHER, M.M; HUANG, Jicai; HUTKINS, R.W. Acetone

butanol ethanol (ABE) recovery by pervaporation using silicalite–silicone composite membrane from fed-batch reactor of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Membrane Science* 187 (2001) 93–102.

57. RAGANATI, F; OLIVIERI, G; PROCENTESE, A; RUSSO, M.E; SALATINO, P. and MARZOCHELLA, A. Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor *Bioresource Technology*. 138. (2013): p. 259–265.
58. NAPOLI, Fabio; OLIVIERI, Giuseppe; RUSSO, Maria Elena; MARZOCHELLA, Antonio and SALATINO, Piero. Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a continuous packed bed reactor. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 37 (2010): p. 603–608.
59. TASHIRO, Yukihiro; TAKEDA, Katsuhisa; KOBAYASHI, Genta; and SONOMOTO, Kenji. High production of acetone–butanol–ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding. *Journal of Biotechnology*. Vol. 120. (2005): p. 197–206.
60. TASHIRO, Yukihiro; TAKEDA, Katsuhisa; KOBAYASHI, Genta; SONOMOTO, Kenji; ISHIZAKI, Ayaaki and YOSHINO, sadazo. High Butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in Fed-Batch Culture with pH-Stat Continuous Butyric Acid and Glucose Feeding Method. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 98, No. 4. (2004): 263–268.
61. QURESHI, Nasibuddin; MADDOX, Ian S. and FRIEDL, Anton. Application of Continuous Substrate Feeding to the ABE Fermentation: Relief of Product Inhibition Using Extraction, Perstraction, Stripping, and Pervaporation. *Biotechnol. Prog.* 8. (1992): p. 382-390.

62. MADDOX, I. S; QURESHI, N. and IS. THOMSON, Roberts. Process Biochemistry . Vol.30. No. 3. (1995): p. 209-215.
63. BADR, H; TOLEDO, R and HAMDY, M. Continuous acetone–ethanol–butanol fermentation by immobilized cells of Clostridium acetobutylicum. Biomass and Bioenergy. 20. (2001): p. 119–132.
64. GU, Yang; HU, Shiyuan; CHEN, Jun; SHAO, Lijun; HE, Huiqi; YANG, Yunliu and YANG, Sheng. Weihong Jiang . Ammonium acetate enhances solvent production by Clostridium acetobutylicum EA 2018 using cassava as a fermentation medium . J. Ind Microbiol Biotechnol. 36 (2009): p. 1225–1232.
65. CHEN, Chunyan; XIAO, Zeyi; TANG, Xiaoyu; CUI, Haidi; ZHANG, Junqing; LI, Weijia and YING, Chao. Acetone–butanol–ethanol fermentation in a continuous and closed-circulating fermentation system with PDMS membrane bioreactor . Bioresource Technology. 128. (2013): p. 246–251.
66. XUE, Chuang; ZHAO, Jingbo; LIU, Fangfang; LU, Congcong; YANG, Shang-Tian and BAI, Feng-Wu. Two-stage in situ gas stripping for enhanced butanol fermentation and energy-saving product recovery . Bioresource Technology. 135. (2013): p. 396–402.
67. LU, Congcong; ZHAO, Jingbo; YANG, Shang-Tian and WEI, Dong. Fed-batch fermentation for n-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed reactor with continuous gas stripping. Bioresource Technology. 104. (2012): P. 380–387.
68. THANG, Vu Hong; KANDA, Kohzo and KOBAYASHI, Genta. Production of Acetone–Butanol–Ethanol (ABE) in Direct Fermentation of Cassava by Clostridium saccharoperbutylacetonicum N-14. Appl Biochem Biotechnol.

161. (2010): p. 157–170.
69. LEE, Sun-Mi; CHO, Min Ok; PARK, Cheol Hee; CHUNG, Yun-Chul; KIM, Ji Hyeon; SANG, Byoung-In and UM, Youngsoon. Continuous Butanol Production Using Suspended and Immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with Supplementary Butyrate. *Energy & Fuels*, Vol. 22. No. 5. (2008): p. 3459–3464.
70. EZEJI, T. QURESHI, N. AND BLASCHEK, H. Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. *Appl Microbiol Biotechnol* . 63. (2004): p. 653–658.
71. Biobased Butanol Info. [En línea, visitado el 28 de abril de 2013]. Disponible en internet:<<http://www.biobutanol.com/Biobutanol-Producers-Gevo,-Butamax,-Cobalt,.html>>).
72. BLASCHEK, Hans Champaign; ANNOUS, Bassam North Wales; FORMANEK, Joseph Lisle; CHEN, Chih-Kuang Champaign, all of IL (US). Method of Producing Butanol Using a Mutant Strain of *clostridium beijerinckii*. Patente N° US 6,358,717 B1 (2002).
73. UYEDA, Kosaku and RABIKOWITZ, Jesse C. Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductase IV. Studies on the reaction mechanism. *Journal de Biology Chemistry*. Vol. 246. N°10. (1971): p. 3120-3125.
74. VAN DIJKEN, J. P and HARDER, W. Growth Yields of Microorganisms on Methanol and Methane. A Theoretical Study. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 17. (1975): p. 15-30.

75. ZENG, AP; BIEBL, H; SCHILIEKER, H; and DECKWER, WD. Pathway Analysis of Glycerol Fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of Reducing Equivalent Balance and Product Formation. *Enzyme Microbial Technology*. 15. (1993): p. 770-779.
76. CHEN, Xi; SUN, Yaquin; XIU, Zhilong; LI, Xiaohui and ZHANG, Daijia. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. 31. (2006): p. 539-549.
77. BAHL, Hubert; ANDERSCH, Wolfram and GOTTSCHALK, Gerhard. Continuous Production of Acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a Two-Stage Phosphate Limited Chemostat . *European J Appl Microbiol Biotechnol*. 15. (1982): p. 201-205.
78. DORAN, M. Pauline. *Principio de Ingeniería de los Bioprocesos*. España. (1998): p. 80-83.
79. MAVROVOUNIOTIS, M. L. 1991; JANKOWSKI, M. D. et al., 2008 y MILO LAB. eQuilibrator biochemical thermodynamics calculator [Visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://equilibrator.weizmann.ac.il/>>
80. ROSENTHAL , Richard E. 2012. [En línea, visitado el 12 de mayo del 2013]. Disponible en internet: <<http://www.gams.com/docs/document.htm>>.
81. GROPP, W. AND MORÉ, J. Optimization Environments and the NEOS Server. *Approximation Theory and Optimization*. BUHMANN, M. D. AND ISERLES, A. Eds. Cambridge University Press. (1997): p. 167-182.
82. CZYZYK, J. MESNIER, M. AND MORÉ, J. The NEOS Server. *IEEE Journal*

on Computational Science and Engineering, Vol 5, (1998): p. 68-75.

83. DOLAN, E. The NEOS Server 4.0 Administrative Guide. 2001 [En línea, visitado el 12 de mayo del 2013]. Disponible en internet: <info.mcs.anl.gov/pub/tech_reports/reports/TM-250.pdf>
84. WANG, Shaohua; ZHU, Yan; ZHANG, Yanping and LI, Yin. Controlling the oxidoreduction potential of the culture of *Clostridium acetobutylicum* leads to an earlier initiation of solventogenesis, thus increasing solvent productivity . *Appl Microbiol Biotechnol.* 93. (2012): p. 1021–1030.
85. NEOS Server [En línea, visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://www.neos-guide.org/content/metabolic-engineering-problem>>
86. NEOS Server. [En línea, visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://www.neos-server.org/neos/solvers/go:BARON/GAMS.html>>.
87. ATCC. [En línea, visitado el 15 noviembre 2009]. Disponible en internet: <<https://www.atcc.org/products/all/824.aspx#2F93F855AA1943AC8F4392E86118D08A>>
88. DMSZ, Cultivation of Anaerobes . [En línea, visitado el 15 noviembre 2009]. Disponible en internet: <http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=11>
89. MADIGAN, Michael. T. MARTINKO, John M; DUNLAP, Paul V and CLARK, David P. Brock. *Biología de los Microorganismos*. Pearson. 10. ed. España. (2009): p. 168-172.
90. GONZALEZ-PAJUELO, María; MEYNIAL-SALLES, Isabelle; MENDES, Filipa;

ANDRADE, José Carlos; VASCONCELOS, Isabel and SOUCAILLE , Philippe. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol . *Metabolic Engineering*. 7. (2005): p. 329–336.

91. HUSEMANN, Michael H. W and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Solventogenesis in *Clostridium Acetobutylicum* Fermentations Related to Carboxylic Acid and Proton Concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 32. (1988): p. 843-852.
92. MONOT, Frederic; ENGASSER, Jean-Marc and Petitdemange, Henri. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum* . *Appl Microbiol Biotechnol*. 19. (1984): p. 422-426.
93. HARRIS, Latonia M; DESAI, Ruchir P; WELKER, Neil E and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: Need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition?. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 67. (2000): p. 1-11.
94. FUCIÑOS, Viviana y PALLARES, Andrea. SELECCIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO Y DISEÑO DE UN SISTEMA DE CONTROL PARA LA FERMENTACIÓN ABE A PARTIR DE GLUCOSA EMPLEANDO *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824. (2011). Trabajo de grado (Ingeniería química). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Ingeniería Química.
95. ROJAS, Cindy y GONZÁLEZ, Nancy. (2011). DISEÑO CONCEPTUAL DE UN FERMENTADOR PARA LA PRODUCCIÓN DE N- BUTANOL A PARTIR DE GLUCOSA EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Trabajo de

grado (Ingeniería química). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Ingeniería Química.

96. BONARIUS, H; HATZIMANIKATIS, V; MEESTERS, K; DE GOOIJER, C; SCHMID, G and TRAMPER, J. Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnol. Bioeng.* 50. (1996): p. 299-318. Citado por: DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Stoichiometric modelig of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *Journal of Biotechnology.* Vol. 71. (1999): p. 191-205.
97. VARMA, A and PALSSON, B. O. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* 60. (1994): p. 3724-3731. Citado por: DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Stoichiometric modelig of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *Journal of Biotechnology.* Vol. 71. (1999): p. 191-205.
98. MAJEWSKI, R. A and DOMACH, M M. Simple constrained optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 35. (1990): P. 732-738. Citado por: DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Stoichiometric modelig of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *Journal of Biotechnology.* Vol. 71. (1999): p. 191-205.
99. SILLERS, Ryan; ALI AL-HINAI, Mohab and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Aldehyde–Alcohol Dehydrogenase and/or Thiolase Overexpression Coupled With CoA Transferase Downregulation Lead to Higher Alcohol Titters and Selectivity in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations . *Biotechnology and Bioengineering.* Vol. 102. No. 1. (2009): p. 38-49.

100. SILLERS, Ryan; CHOW, Alison; TRACY, Bryan and PAPOUTSAKIS , Eleftherios T. Metabolic engineering of the non-sporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of the electron balance. *Metabolic Engineering*. 10. (2008): p. 321–332.
101. PEGUIN, S; GOMA, G; DELORME, P AND SOUCAILLE, P. Metabolic flexibility of *Clostridium acetobutylicum* in response to methyl viologen addition . *Appl Microbiol Biotechnol*. 42. (1994): p. 611-616 .
102. TASHIRO, Yukihiro; SHINTO, Hideaki; HAYASHI, Miki; BABA, Shun-ichi; KOBAYASHI, Genta and SONOMOTO, Kenji. Novel High-Efficient Butanol Production from Butyrate by Non-Growing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*N1-4 (ATCC 13564) with Methyl Viologen . *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 104, No. 3. (2007): p. 238-240.
103. GIRBAL, L; VASCONCELOS, I; and SOUCAILLE, P. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 16.(1995): p. 151-162. Citado por: PEGUIN, Sophie and SOUCAILLE, Philippe. Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61. No 1. (1995): p. 403-405.
104. MEYER, Charles. L and PAPOUTSAKIS, Eleftherios. T. Increased Levels of ATP and NADH are Associated with Increased Solvent Production in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 30. (1989): p. 450-459.

105. Hongo, M. Butanol fermentation. Part XI: Change of Solvent Ratio by Addition of Redox Dye. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. 31. (1957): p. 735-738. Cited by: KIM, Byung Hong et al. Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentation: Utilization of Carbon Monoxide to Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 48. No 4. (1984): p. 764-770.
106. ALSAKER, Keith V. and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Transcriptional Program of Early Sporulation and Stationary-Phase Events in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 17. No. 20. (2005): p. 7103–7118.
107. TOMAS, Christopher A. WELKER, Neil E. and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* Results in Increased Solvent Production and Tolerance, Prolonged Metabolism, and Changes in the Cell's Transcriptional Program. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69. No. 8. (2003): p. 4951–4965.

BIBLIOGRAFÍA

ALSAKER, Keith V. and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Transcriptional Program of Early Sporulation and Stationary-Phase Events in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 17. No. 20. (2005): p. 7103–7118.

ATCC. [En línea, visitado el 15 noviembre 2009]. Disponible en internet: <<https://www.atcc.org/products/all/824.aspx#2F93F855AA1943AC8F4392E86118D08A>>

BADR, H; TOLEDO, R and HAMDY, M. Continuous acetone–ethanol–butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioenergy*. 20. (2001): p. 119–132.

BAHL, H. and GOTTSCHALK G. Parameters effecting solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Biotechnol Bioeng Symp*. Vol 14 (1984): p. 215–23. Citado por: GHESHLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*. Vol. 27 (2009): p. 764–781 .

BAHL, H; GOTTWALD M; KUHN A; RALE V; ANDERSCH W. And GOTTSCHALK, Nutritional Factors affecting the Ratio of Solvents Produced by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 52 (1986): p. 169–72. Citado por: GHESHLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*. Vol. 27 (2009): p. 764–781 .

BAHL, Hubert; ANDERSCH, Wolfram and GOTTSCHALK, Gerhard. Continuous Production of Acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a Two-Stage

Phosphate Limited Chemostat . European J Appl Microbiol Biotechnol. 15. (1982): p. 201-205.

Biobased Butanol Info. [En línea, visitado el 28 de abril de 2013]. Disponible en internet:<<http://www.biobutanol.com/Biobutanol-Producers-Gevo,-Butamax,-Cobalt,.html>>).

BLASCHEK, Hans Champaign; ANNOUS, Bassam North Wales; FORMANEK, Joseph Lisle; CHEN, Chih-Kuang Champaign, all of IL (US). Method of Producing Butanol Using a Mutant Strain of *Clostridium beijerinckii*. Patente N° US 6,358,717 B1 (2002).

BONARIUS, H; HATZIMANIKATIS, V; MEESTERS, K; DE GOOIJER, C; SCHMID, G and TRAMPER, J. Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. Biotechnol. Bioeng. 50. (1996): p. 299-318. Citado por: DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Stoichiometric model of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. Journal of Biotechnology. Vol. 71. (1999): p. 191-205.

CHEN, Chunyan; XIAO, Zeyi; TANG, Xiaoyu; CUI, Haidi; ZHANG, Junqing; LI, Weijia and YING, Chao. Acetone–butanol–ethanol fermentation in a continuous and closed-circulating fermentation system with PDMS membrane bioreactor . Bioresource Technology. 128. (2013): p. 246–251.

CHEN, Xi; SUN, Yaquin; XIU, Zhilong; LI, Xiaohui and ZHANG, Daijia. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production fermentative bacteria. International Journal of Hydrogen Energy. 31. (2006): p. 539-549.

COSTA, JM. Solvent toxicity in the acetone-butanol fermentation. Proc Ann Biochem Eng Symp 11. (1981): p. 83-90 . Citado por HARTMANIS, Maris G N;

KLASON, Tomas y GATENBECK, Sten. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum* . *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol 20. (1984): p. 66-71.

CZYZYK, J. MESNIER, M. AND MORÉ, J. The NEOS Server. *IEEE Journal on Computational Science and Engineering*, Vol 5, (1998): p. 68-75.

DESAI, Ruchir P; HARRIS, Latonia M; WELKER, Neil E. and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Metabolic Flux Analysis Elucidates the Importance of the Acid-Formation Pathways in Regulating Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*. *Metabolic Engineering* 1. (1999): p. 206-213.

DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Stoichiometric modelig of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *Journal of Biotechnology*. Vol. 71. (1999): p. 191-205.

DMSZ, Cultivation of Anaerobes . [En línea, visitado el 15 noviembre 2009]. Disponible en internet: <http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=11>

DOLAN, E. The NEOS Server 4.0 Administrative Guide. 2001 [En línea, visitado el 12 de mayo del 2013]. Disponible en internet: <info.mcs.anl.gov/pub/tech_reports/reports/TM-250.pdf>

DORAN, M. Pauline. Principio de Ingeniería de los Bioprocesos. España. (1998): p. 80-83.

DÜRRE, Peter. Fermentative Butanol Production Bulk Chemical an Biofuel. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1125. (2008): p. 353-362.

EZEJI, T. C; QURESHI, N and BLASCHEK, H. P. Continuous butanol fermentation and feed starch retrodegradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Biotechnology*. Vol. 115. (2005): p 179-187.

EZEJI, T. C; QURESHI, N and BLASCHEK, H. P. Production of acetone butanol (AB) from Liquefied corn starch a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii* coupled with product recovery by gas stripping. *J Ind Microbiol Biotechnol*. Vol. 34. (2007): p. 771-777.

EZEJI, T. QURESHI, N. AND BLASCHEK, H. Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. *Appl Microbiol Biotechnol* . 63. (2004): p. 653–658.

FOND, O; MATTA-AMMOURI, G; PETITDEMANGE, H and ENGASSER, JM. The role of acids on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 22 (1985): p. 195–200. Citado por: GHESLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*. Vol. 27 (2009): p. 764–781.

FUCIÑOS, Viviana y PALLARES, Andrea. SELECCIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO Y DISEÑO DE UN SISTEMA DE CONTROL PARA LA FERMENTACIÓN ABE A PARTIR DE GLUCOSA EMPLEANDO *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824. (2011). Trabajo de grado (Ingeniería química). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Ingeniería Química.

GHESLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*. Vol. 27

(2009): p. 764–781.

GIRBAL, L; VASCONCELOS, I; and SOUCAILLE, P. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 16.(1995): p. 151-162. Citado por: PEGUIN, Sophie and SOUCAILLE, Philippe. Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61. No 1. (1995): p. 403-405.

GONZALEZ-PAJUELO, María; MEYNIAL-SALLES, Isabelle; MENDES, Filipa; ANDRADE, José Carlos; VASCONCELOS, Isabel and SOUCAILLE , Philippe. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol . *Metabolic Engineering*. 7. (2005): p. 329–336. Green Biologics Ltda. [Visitado el 01 de octubre, 2012]. Disponible en: <http://www.greenbiologics.com/biobutanol-fuel.php>

GROPP, W. AND MORÉ, J. Optimization Environments and the NEOS Server. *Approximation Theory and Optimization*. BUHMANN, M. D. AND ISERLES, A. Eds. Cambridge University Press. (1997): p. 167-182.

GRUPE, Helga and GOTTSCHALK, Gehard. *Clostridium acetobutylicum* and the production of solvents. In H. Heslot, J. Davies, J. Florent, L. Bobichon, G. Durand, and L. Penasse (ed.), *Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms (GIM 90)*, vol. II. Societ Francaise de Microbiologie, Strasbourg, France. (1990): p. 715-729.

GRUPE, Helga. and GOTTSCHALK, Gehard. Physiological Events in *Clostridium acetobutylicum* during the Shift from Acidogenesis to Solventogenesis in Continuous Culture and Presentation of a Model for Shift Induction. *Applied and*

environmental microbiology. Vol. 58. No 12. (1992): p. 3896-3902.

GU, Yang; HU, Shiyuan; CHEN, Jun; SHAO, Lijun; HE, Huiqi; YANG, Yunliu and YANG, Sheng. Weihong Jiang . Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium . J. Ind Microbiol Biotechnol. 36 (2009): p. 1225–1232.

HAGGSTROM, Lena. Acetone – Butanol Fermentation and its Variants . Biotech Adv. Vol. 3. (1985): p. 13-28.

HARRIS, Latonia M; DESAI, Ruchir P; WELKER, Neil E and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: Need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition?. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 67. (2000): p. 1-11.

HARTMANIS, Maris G N; KLASON, Tomas y GATENBECK, Sten. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum* . Appl Microbiol Biotechnol. Vol 20. (1984): p. 66-71 .

HERRERO, A. A; R. F. GOMEZ, B; SNEDECOR, C. J; TOLMAN, and M. F. ROBERTS. Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: a mechanism based on uncoupling by weak acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 22. (1985): p. 53-62. Citado por WIESENBORN, Dennis P; RUDOLPH, Frederick B and PAPOUTSAKISI, Eleftherios T. Coenzyme A Transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Uptake of Acids. Applied and environmental microbiology. Feb. (1989): p. 323-329.

Hongo, M. Butanol fermentation. Part XI: Change of Solvent Ratio by Addition of Redox Dye. Nippon Nogei Kagaku Kaishi. 31. (1957): p. 735-738. Citado por:

KIM, Byung Hong et al. Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentation: Utilization of Carbon Monoxide to Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 48. No 4. (1984): p. 764-770.

HUSEMANN, Michael H. W and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Solventogenesis in *Clostridium Acetobutylicum* Fermentations Related to Carboxylic Acid and Proton Concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 32. (1988): p. 843-852.

JONES, David T y WOODS David R. Acetone-Butanol Fermentation Revisted. *Microbiological Reviews*. Vol 50. No 4. (1986): p 484-524.

JUNGERMANN, K; THAUER, RK; LEIMENSTOLL, G. and DECKER K. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. *Biochim Biophys Acta* (1973): p. 268–80.

KELL, DB; PECK, MW; RODGER, G and MORRIS, JGX. On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 99 (1973): p. 81–8. Citado por: GHESHLAGHI, R; SCHARER, J. M; MOO-YOUNG, M and CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*. Vol. 27 (2009): p. 764–781 .

KIM, Byung Hong; BELLOWS, Para; DATTA, Rathin and ZEIKUSI, J. G. Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentation: Utilization of Carbon Monoxide to Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 48. No 4. (1984): p. 764-770.

LALEH, Yerushalmi ; VOLESKY, B. LEUNG, W. K. and NEUFELD, R. J.

Variations of Solvent Yield in Acetone-Butanol Fermentation. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 18 (1983): p. 279-286

LEE, Joungmin; YUN, Hongseok; FEIST, Adam M; PALSSON, Bernhard Ø and LEE, Sang Yup. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. Appl Microbiol Biotechnol (2008): p. 849–862.

LEE, Sang Yup; PARK, Jin Hwan; JANG, Seh Hee; NIELSEN, Lars K; KIM; Jaehyun and JUNG, Kwang S. Fermentative butanol production by Clostridia. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 101, No. 2. (October 1, (2008): p. 209-228.

LEE, Sun-Mi; CHO, Min Ok; PARK, Cheol Hee; CHUNG, Yun-Chul; KIM, Ji Hyeon; SANG, Byoung-In and UM, Youngsoon. Continuous Butanol Production Using Suspended and Immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with Supplementary Butyrate. Energy & Fuels, Vol. 22. No. 5. (2008): p. 3459–3464.

LI, Xin; LI, Zhigang; ZHENG, Junping; SHI, Zhongping; and LI, Le. Yeast extract promotes phase shift of bio-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 using cassava as substrate . Bioresource Technology 125 (2012): p. 43–51.

LLANERAS, Francisco y PICÓ, Jesús. Stoichiometric Modelling of Cell Metabolism. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 105. (2008): p. 1-11.

LU, Congcong; ZHAO, Jingbo; YANG, Shang-Tian and WEI, Dong. Fed-batch fermentation for n-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed reactor with continuous gas stripping. Bioresource Technology. 104. (2012): P. 380–387.

LÜTKE-EVERSLOH, Tina and BAHL, Hubert. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. Current opinion in Biotechnology. (2011): 22. p. 634-647.

MADDOX, I. S; QURESHI, N. and IS. THOMSON, Roberts. Process Biochemistry . Vol.30. No. 3. (1995): p. 209-215.

MADIGAN, Michael. T. MARTINKO, John M; DUNLAP, Paul V and CLARK, David P. Brock. Biología de los Microorganismos. Pearson. 10. ed. España. (2009): p. 168-172.

MAHADEVAN, R. and SCHILLING, C.H. The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. Metabolic Engineering, (2003): p. 264–276; Citado por: SALIMI, Fahimeh. MANDAL, Rupasri. WISHART, David and MAHADEVAN, Radhakrishnan. Understanding *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Metabolism Using Genome Scale Thermodynamics and Metabolomics-based Modeling. Proceedings of the 11th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology (CAB 2010), Leuven, Belgium, July 7-9, 2010.

MAJEWSKI, R. A and DOMACH, M M. Simple constrained optimization view of acetate overflow in *E. coli*. Biotechnol. Bioeng. 35. (1990): P. 732-738. Citado por: DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Stoichiometric modelig of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. Journal of Biotechnology. Vol. 71. (1999): p. 191-205.

MATTA-EL-AMMOURI, Ghassan; JANATI-IDRISSI, Rachid; RAMBOURG, Jean-Marc; PETITDEMANGE, Henri and Gay, R. Acetone butanol fermentation by a *Clostridium acetobutylicum* mutant with high solvent productivity. Biomass. Vol. 10, N° 2. (1986): p. 109-119.

MAVROVOUNIOTIS, M. L. 1991; JANKOWSKI, M. D. et al., 2008 y MILO LAB. eEquilibrator biochemical thermodynamics calculator [Visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://equilibrator.weizmann.ac.il/>>

MCNEIL, Brian; HARVEY, Linda M. Practical fermentatation technology. 1 ed. London: John Wiley and Sons, Ltd, (2008): p. 167-230.

MEYER, C. and PAPOUTSAKIS, E. Continuous and biomass recycle fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. Bioprocess Engineering. 4. (1989): p. 1-10 .

MEYER, C. and PAPOUTSAKIS, E. Continuous and biomass recycle fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. Bioprocess Engineering. 4. (1989): p. 49-55.

MEYER, Charles. L and PAPOUTSAKIS, Eleftherios. T. Increased Levels of ATP and NADH are Associated with Increased Solvent Production in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Microbiol Biotechnol. 30. (1989): p. 450-459.

MONOT, Frederic. MARTIN, Jean-René. PITITDEMANGE, Henry and GAY, Robert. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 44. No 6. (1982): p. 1318-1324.

MONOT, Frederic; ENGASSER, Jean-Marc and Petitdemange, Henri. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum* . Appl Microbiol Biotechnol. 19. (1984): p. 422-426.

NAPOLI, Fabio; OLIVIERI, Giuseppe; RUSSO, Maria Elena; MARZOCHELLA, Antonio and SALATINO, Piero. Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* Assessment of acidogenesis kinetics . Bioresource Technology 102 (2011): p. 1608–1614.

NAPOLI, Fabio; OLIVIERI, Giuseppe; RUSSO, Maria Elena; MARZOCHELLA, Antonio and SALATINO , Piero . Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a continuous packed bed reactor. J Ind Microbiol Biotechnol. 37 (2010): p. 603–608.

NEOS Server [En línea, visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://www.neos-guide.org/content/metabolic-engineering-problem>>

NEOS Server. [En línea, visitado el 12 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <<http://www.neos-server.org/neos/solvers/go:BARON/GAMS.html>>.

PAPOUTSAKIS, Efetherios Terry. Equations and Calculations for Fermentations of Butyric Acid Bacteria. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXVI. (1984): p. 174-187.

PEGUIN, S; GOMA, G; DELORME, P AND SOUCAILLE, P. Metabolic flexibility of *Clostridium acetobutylicum* in response to methyl viologen addition . Appl Microbiol Biotechnol. 42. (1994): p. 611-616 .

PEGUIN, Sophie and SOUCAILLE, Philippe. Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 61. No 1. (1995): p. 403-405.

QURESHI, N and MADDOX, I. S. 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 (2005): p 43-52.

QURESHI, N; MEAGHER, M.M; HUANG, Jicai; HUTKINS, R.W. Acetone butanol ethanol (ABE) recovery by pervaporation using silicalite–silicone composite membrane from fed-batch reactor of *Clostridium acetobutylicum*. Journal of Membrane Science 187 (2001) 93–102.

QURESHI, Nasib; EZEJI, Thaddeus; EBENER, Jennifer; DIEN, Bruce S; COTTA, Michael A and BLASCHEK, Hans P. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of the acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. Biosource Technology. Vol. 99. (2008): p. 5915-5922.

QURESHI, Nasib; SAHA; Badal C; HECTOR, Ronald E; HUGHES, Stephen R; and COTTA, Michael A. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentetion using *Clostridium beijerinkii*: Part I-Batch fermentation. Biomass and Bioenergy. Vol. 32 (2008): p 168-175.

QURESHI, Nasibuddin; MADDOX, Ian S. and FRIEDL, Anton . Application of Continuous Substrate Feeding to the ABE Fermentation: Relief of Product Inhibition Using Extraction, Perstraction, Stripping, and Pervaporation. Biotechnol. Prog. 8. (1992): p. 382-390.

RAGANATI, F; OLIVIERI, G; PROCENTESE, A; RUSSO, M.E; SALATINO, P. and MARZOCHELLA, A. Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor Bioresource Technology. 138. (2013): p. 259–265.

RATLEDGE, Colin; KRISTIANSEN, Bjorn. Basic Biotechnology. 3 ed. United Kingdom. (2006): p. 57, 491-493.

ROGERS, Palmer. Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. Appl. Microbiol. Vol. 31 (1984): p. 1-60.

ROJAS, Cindy y GONZÁLEZ, Nancy. (2011). DISEÑO CONCEPTUAL DE UN FERMENTADOR PARA LA PRODUCCIÓN DE N- BUTANOL A PARTIR DE GLUCOSA EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Trabajo de grado (Ingeniería química). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Ingeniería Química.

ROSENTHAL , Richard E. 2012. [En línea, visitado el 12 de mayo del 2013]. Disponible en internet: <<http://www.gams.com/docs/document.htm>>.

SALIMI, Fahimeh. MANDAL, Rupasri. WISHART, David and MAHADEVAN, Radhakrishnan. Understanding *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Metabolism Using Genome Scale Thermodynamics and Metabolomics-based Modeling . Proceedings of the 11th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology (CAB 2010), Leuven, Belgium, July 7-9, 2010.

SENGER, Ryan S; y PAPOUTSAKIS, Eleftheruis T. Genome-Scale for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic Network Resolution and Analysis. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 101. No. 5. (2008): p. 1036-1052.

SENGER, Ryan S; y PAPOUTSAKIS, Eleftheruis T. Genome-Scale for *Clostridium acetobutylicum*: Part II. Metabolic Network Resolution and Analysis. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 101. No. 5. (2008): p. 1053-1071.

SHINTO, Hideaki; TASHIRO , Yukihiro; KOBAYASHI, Genta; SEKIGUCHI,

Tatsuya; HANAI, Taizo; KURIYA, Yuki; OKAMOTO, Masahiro and SONOMOTO, Kenji. Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone–butanol–ethanol fermentation . *Process Biochemistry* 43 (2008): p. 1452–1461.

SHINTO, Hideaki; YAMASHITA , Mayu; KOBAYASHI, Genta; SEKIGUCHI, Tatsuya; HANAI, Taizo; KURIYA, Yuki; OKAMOTO, Masahiro and SONOMOTO, Kenji. Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone–butanol–ethanol production . *Journal of Biotechnology* 131 (2007): p. 45–56.

SHULER, Michael L. and KARGI, Fikret. *Bioprocess Engineering. Basic Concepts*. 2 Ed. Prentice Hall. (2002): p. 184-185.

SILLERS, Ryan; ALI AL-HINAI, Mohab and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Aldehyde–Alcohol Dehydrogenase and/or Thiolase Overexpression Coupled With CoA Transferase Downregulation Lead to Higher Alcohol Titrers and Selectivity in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations . *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 102. No. 1. (2009): p. 38-49.

SILLERS, Ryan; CHOW, Alison; TRACY, Bryan and PAPOUTSAKIS , Eleftherios T. Metabolic engineering of the non-sporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of the electron balance. *Metabolic Engineering*. 10. (2008): p. 321–332.

STEPHANOPOULOS , Gregory N; ARISTIDOU , Aristos A. and NIELSEN, Jens. *Metabolic Engineering: Principles and Metadologies*. Academic Press. (1998): p. 25.

TASHIRO, Yukihiro; SHINTO, Hideaki; HAYASHI, Miki; BABA, Shun-ichi;

KOBAYASHI, Genta and SONOMOTO, Kenji. Novel High-Efficient Butanol Production from Butyrate by Non-Growing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) with Methyl Viologen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 104, No. 3. (2007): p. 238-240.

TASHIRO, Yukihiro; TAKEDA, Katsuhisa; KOBAYASHI, Genta; and SONOMOTO, Kenji. High production of acetone–butanol–ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding. *Journal of Biotechnology*. Vol. 120. (2005): p. 197–206.

TASHIRO, Yukihiro; TAKEDA, Katsuhisa; KOBAYASHI, Genta; SONOMOTO, Kenji; ISHIZAKI, Ayaaki and YOSHINO, Sadazo. High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed batch culture with pH-stat Continuous butyric acid and glucose feeding method. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 98. No. 4. (2004): p 263-268.

TASHIRO, Yukihiro; TAKEDA, Katsuhisa; KOBAYASHI, Genta; SONOMOTO, Kenji; ISHIZAKI, Ayaaki and YOSHINO, Sadazo. High Butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in Fed-Batch Culture with pH-Stat Continuous Butyric Acid and Glucose Feeding Method. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 98, No. 4. (2004): 263–268.

TERRACCIANO, Joseph S. and KASHKET, Eva R. Intracellular Conditions Required for Initiation of Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 52. No 1. (1986): p. 86-91.

THANG, Vu Hong; KANDA, Kohzo and KOBAYASHI, Genta. Production of Acetone–Butanol–Ethanol (ABE) in Direct Fermentation of Cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N-14. *Appl Biochem Biotechnol*. 161. (2010): p. 157–170.

THAUER, Rudolf K; JUNGERMANN, Kurt and KARL, Decker. Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriological Review*. Vol. 41 N° 1. (1977): p.100-180.

TOMAS, Christopher A. WELKER, Neil E. and PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* Results in Increased Solvent Production and Tolerance, Prolonged Metabolism, and Changes in the Cell's Transcriptional Program. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69. No. 8. (2003): p. 4951–4965.

UYEDA, Kosaku and RABIKOWITZ, Jesse C. Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductase IV. Studies on the reaction mechanism. *Journal de Biology Chemistry*. Vol. 246. N°10. (1971): p. 3120-3125.

VAN DIJKEN, J. P and HARDER, W. Growth Yields of Microorganisms on Methanol and Methane. A Theoretical Study. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 17. (1975): p. 15-30.

VARMA, A and PALSSON, B. O. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* 60. (1994): p. 3724-3731. Citado por: DESAI, Ruchir; NIELSEN, Larsk. K; PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Stoichiometric modelig of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *Journal of Biotechnology*. Vol. 71. (1999): p. 191-205.

VASCONCELOS, Isabel. GIRBAL, Laurence and SOUCAILLE , Philippe. Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Grown in Chemostat Culture at Neutral pH on Mixtures of Glucose and Glycerol. *Journal of Bacteriology*. Vol. 176. No. 3 (1994): p. 1443-1450.

WALTER, K; MERMELSTEIN, L. and PAPOUTSAKIS, E. Studies of Recombinant *Clostridium acetobutylicum* with Increased Dosages of Butyrate Formation Genes. *Annals new york academy of sciences* (1994): p. 69-72.

WANG, Shaohua; ZHU, Yan; ZHANG, Yanping and LI, Yin. Controlling the oxidoreduction potential of the culture of *Clostridium acetobutylicum* leads to an earlier initiation of solventogenesis, thus increasing solvent productivity . *Appl Microbiol Biotechnol.* 93. (2012): p. 1021–1030.

WIESENBORN, Dennis P; RUDOLPH, Frederick B and PAPOUTSAKISI, Eleftherios T. Coenzyme A Transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Uptake of Acids . *Applied and environmental microbiology.* Feb. (1989): p. 323-329.

XUE, Chuang; ZHAO, Jingbo; LIU, Fangfang; LU, Congcong; YANG, Shang-Tian and BAI, Feng-Wu. Two-stage in situ gas stripping for enhanced butanol fermentation and energy-saving product recovery . *Bioresource Technology.* 135. (2013): p. 396–402.

YANG, Xiaoping and TSAO, George G. Mathematical of inhibition kinetics in acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. prog.* Vol. 10. (1994): p 532-538.

ZENG, AP; BIEBL, H; SCHILIEKER, H; and DECKWER, WD. Pathway Analysis of Glycerol Fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of Reducing Equivalent Balance and Product Formation. *Enzyme Microbial Technology.* 15. (1993): p. 770-779.

ZHANG, Y; HAN, B. and EZEJI, T. Biotransformation of furfural and 5-

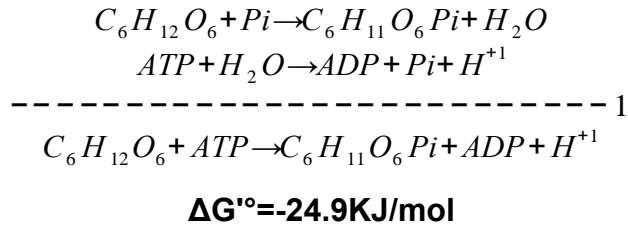
hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 during butanol fermentation. New Biotechnology. Vol. 29. N° 3. February (2012): p. 345-351.

ANEXOS

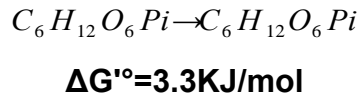
Anexo A. Reacciones de la ruta metabólica de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

La energía de Gibbs de las reacciones de la ruta metabólica de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 fueron calculadas con ayuda de eQuilibrator (79) bajo condiciones estándar (T=298K, P=1bar y pH=7.0)

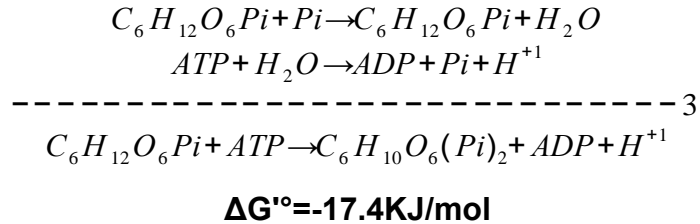
Reacción 1. Fosforilación de la glucosa



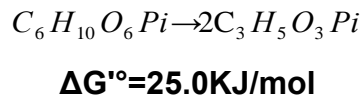
Reacción 2. Conversión de la glucosa-6-fosfato a la fructosa-6-fosfato



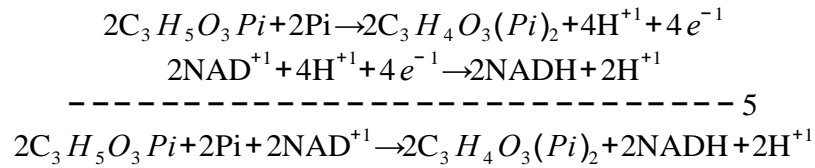
Reacción 3. Fosforilación de la fructosa-6-fosfato a la fructosa-1,6-bifosfato



Reacción 4. Ruptura de la fructosa-1,6-bifosfato a gliceraldehído-3-fosfato

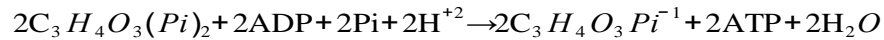


Reacción 5. Oxidación de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato



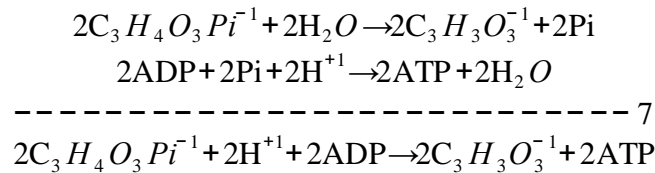
$$\Delta G^{\circ} = 15.6 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 6. Conversión de 1,3-bifosfoglicerato hasta fosfofenolpiruvato



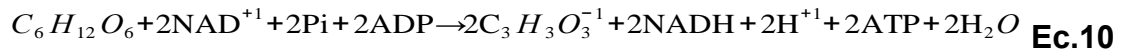
$$\Delta G^{\circ} = -8.2 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 7. Transferencia del grupo fosforil desde el fosfofenolpiruvato



$$\Delta G^{\circ} = -61.2 \text{ KJ/mol}$$

Reacción neta de la glucólisis



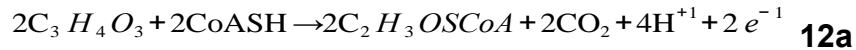
Glucosa

Piruvato

$$\Delta G^{\circ} = -67.8 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 8. Conversión de piruvato a Acetil-CoA

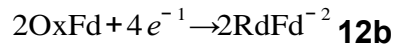
En esta reacción la ferredoxina transfiere dos moles de electrones por mol de piruvato que se consume o por mol de Acetil-CoA producido (73).



Piruvato

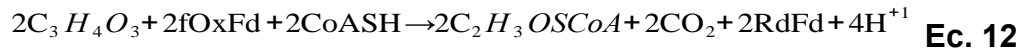
Acetil-CoA

+



Ferredoxina oxidada
Ferredoxina

reducida



Piruvato

Acetil-CoA

La energía de Gibbs de la reacción 8 fue calculada mediante la ecuación de Nernst:

Ecuación de Nernst

$$\Delta G'^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E'^{\circ}$$

n = número de electrones transferidos

F = constante de Faraday (96.485 KJ/V·mol)

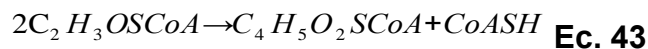
ΔE'° = diferencia de potencial estándar de reducción

Según THAUER, Rudolf K; JUNGERMANN, Kurt and KARL, Decker. (1977) los potenciales de reducción de las reacción 12a y 12b son 0.467 y 0.398V respectivamente.

$$\Delta G'^{\circ} = -4 \cdot [-0.398 - (-0.467)] \cdot 96.485 \text{ KJ/V} \cdot \text{mol}$$

$$\Delta G'^{\circ} = -26.63 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 9. Conversión de Acetil-CoA a Acetoacetil-CoA

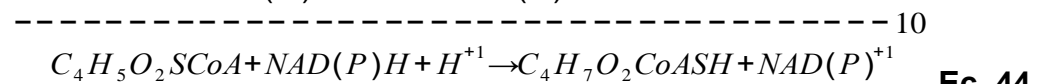
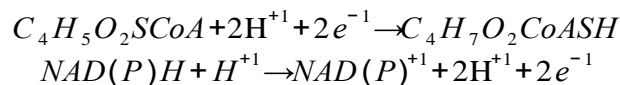


Acetil-CoA

Acetoacetil-CoA

$$\Delta G'^{\circ} = 27.5 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 10. Conversión de Acetoacetil-CoA a β-hidroxiacetil-CoA

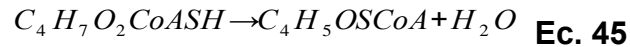


Acetoacetil-CoA

β-hidroxiacetil-CoA

$$\Delta G'^{\circ} = -20.2 \text{ KJ/mol}$$

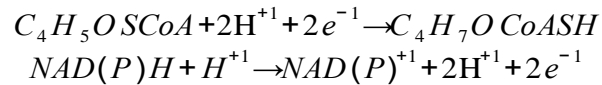
Reacción 11. Deshidratación de β-hidroxi-butiril-CoA a Crotonil-CoA



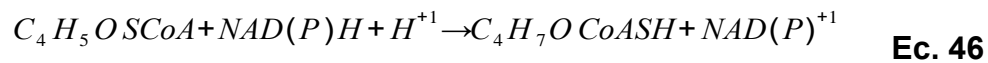
β-hidroxi-butiril-CoA **Crotonil-CoA**

$$\Delta G^\circ = -3.9 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 12. Conversión de Crotonil-CoA a Butiril-CoA



----- 10

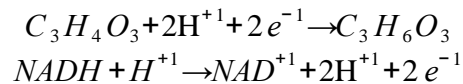


Crotonil-CoA

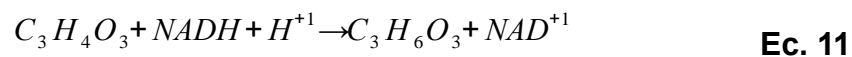
Butiril-CoA

$$\Delta G^\circ = -62.8 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 13. Conversión de Piruvato a Lactato



----- 13

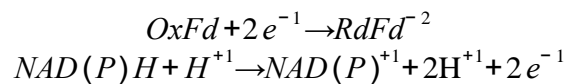


Piruvato

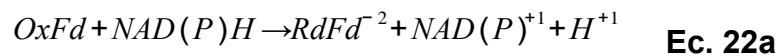
Lactato

$$\Delta G^\circ = -27.2 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 14. Acoplamiento Ferredoxina NAD(P)H oxidoreductasa



----- 22a



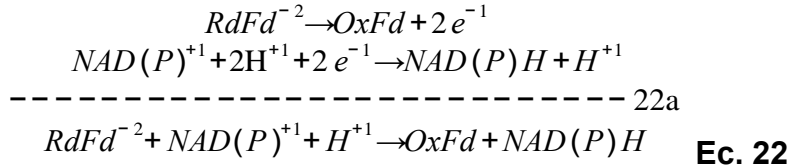
Ferredoxina oxidada

Ferredoxina reducida

$$\Delta G^\circ = -2 * [-0.398 - (-0.324V)] * 96.485 \text{ KJ/V} * \text{mol}$$

$$\Delta G^\circ = 14.3 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 15. Acoplamiento Ferredoxina NAD(P) reductasa



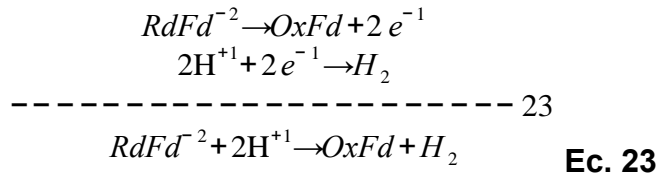
Ferredoxina reducida

Ferredoxina oxidada

$$\Delta G^{\circ} = -2 * [-0.324 - (-0.398)V] * 96.485 \text{KJ/V*mol}$$

$$\Delta G^{\circ} = -14.3 \text{KJ/mol}$$

Reacción 16. Síntesis de Hidrógeno molecular

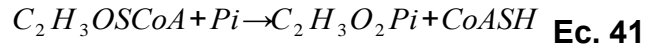


Ferredoxina reducida

Ferredoxina oxidada

$$\Delta G^{\circ} = -2 * [-0.421 - (-0.398)V] * 96.485 \text{KJ/V*mol} = 4.4 \text{KJ/mol}$$

Reacción 17. Conversión de Acetil-CoA a Acetilfosfato

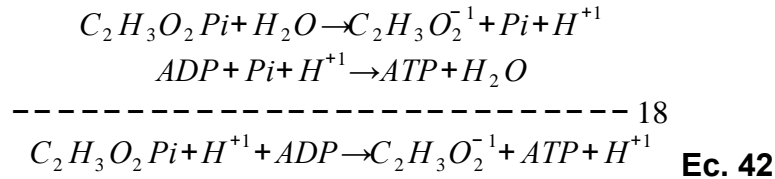


Acetil-CoA

Acetilfosfato

$$\Delta G^{\circ} = 1.7 \text{KJ/mol}$$

Reacción 18. Formación de Acetato a partir del Acetilfosfato

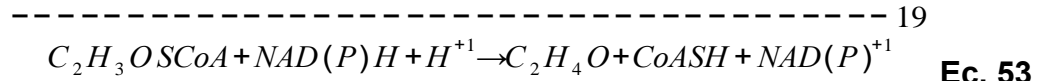
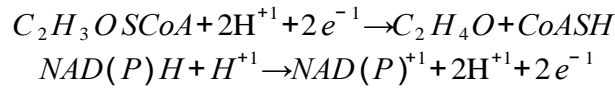


Acetilfosfato

Acetato

$$\Delta G^{\circ} = -3.8 \text{KJ/mol}$$

Reacción 19. Reducción de Acetil-CoA a Acetaldehído

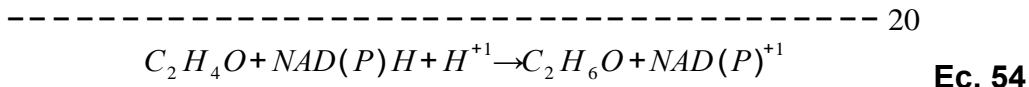
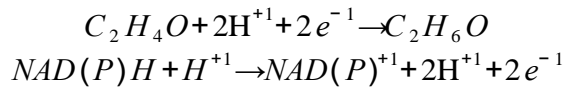


Acetil-CoA

Acetaldehído

$$\Delta G^{\circ} = 10.7 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 20. Reducción de Acetaldehído a Etanol

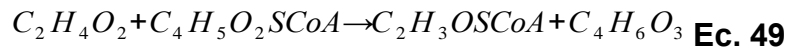


Acetaldehído

Etanol

$$\Delta G^{\circ} = -25.4 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 21. Reasimilación de Acetato vía Acetoacetil-CoA acetato CoA-transferasa



Acetato

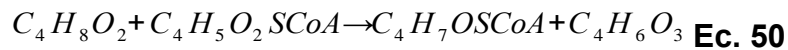
Acetoacetil-CoA

Acetil-CoA

Acetoacetato

$$\Delta G^{\circ} = -8.2 \text{ JK/mol}$$

Reacción 22. Reasimilación de Butírateo vía Acetoacetil-CoA butírateo CoA-transferasa



Butírateo

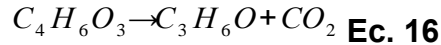
Acetoacetil-CoA

Butíril-CoA

Acetoacetato

$$\Delta G^{\circ} = 0.0 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 23. Síntesis de acetona

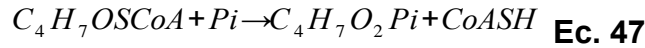


Acetoacetato

Acetona

$$\Delta G'^{\circ} = -27.3 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 24. Conversión de Butiril-CoA a partir de Butirilfosfato

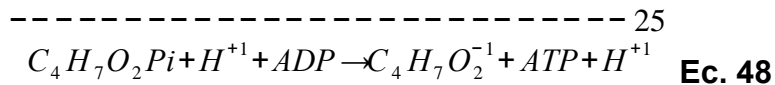
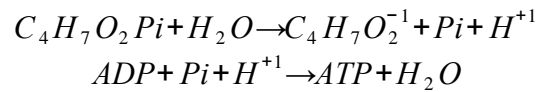


Butiril-CoA

Butirilfosfato

$$\Delta G'^{\circ} = 12.4 \text{ KJ/mol}$$

Reacción 25. Formación de Butirato a partir de Butirilfosfato

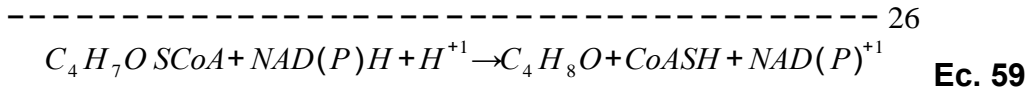
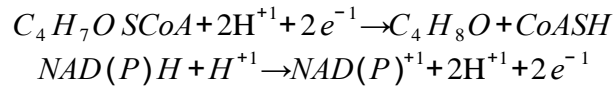


Butirilfosfato

Butirato

$$\Delta G'^{\circ} = -8.2 \text{ JK/mol}$$

Reacción 26. Reducción de Butiril-CoA a Butiraldehído

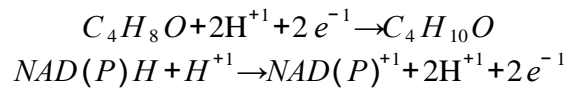


Butiril-CoA

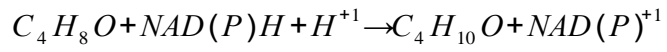
Butiraldehído

$$\Delta G'^{\circ} = 15.7 \text{ JK/mol}$$

Reacción 27. Reducción de Butiraldehído a n-Butanol



----- 20



Ec. 60

Butiraldehído

n-Butanol

$\Delta G'^{\circ} = -24.7 \text{ KJ/mol}$

Anexo B. Balance de electrones

Balance de electrones: los electrones disponibles se refieren a los electrones disponibles para transferir en la combustión completa de una sustancia a CO₂, H₂O y otros productos (42,78); o transformarla a una o más sustancias de referencia, por medio de una semirreacción de oxidación-reducción. (42)

Sustancias de referencia: CO₂, H₂O, H⁺, HCO₃⁻¹, SO₄⁻², NO₃⁻¹, Fe⁺³, PO₄⁻³, RdFd⁻¹, RdFd⁻², NAD(P)⁺¹, etc.

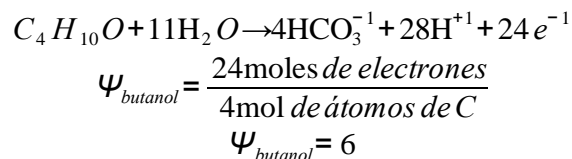
Grado de reducción ψ_i : es el número de electrones disponibles en aquella cantidad de materia por mol de sustancia referida o mol de átomos de carbono, para los compuestos que contienen carbono. El ψ_i es la herramienta que se utiliza para contabilizar los electrones en el balance de electrones. (42,78)

$$\psi_i = \frac{\text{mol de electrones disponibles}}{\text{mol de sustancia } i \text{ o mol de átomos de C}} \quad \text{Ec. B1}$$

El grado de reducción de las sustancias de referencia es nulo $\psi_i=0$.

Cálculo del grado de reducción utilizando el concepto de semirreacción de oxidación-reducción

Ejemplo 1. Determinación del grado de reducción del 1-butanol (C₄H₁₀O)



Cálculo del grado de reducción de una sustancia utilizando el grado de reducción de sus elementos

Tabla B1. Grado de reducción de los elementos

Elemento	Grado de reducción
C	4
H	1
O	-2
N/NH ₃	-3
N/NO ₃ ⁻¹	5
N/N ₂	0
S	6
P	5
n+	-n
n-	+n

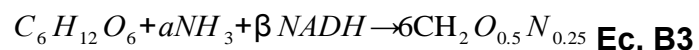
Ejemplo 2. Determinación del grado de reducción del 1-butanol (C₄H₁₀O)

$$\psi_{butanol} = \frac{4 \square \psi_c + 10 \square \psi_H - 1 \square \psi_O}{4}$$

$$\psi_{butanol} = \frac{16 + 10 - 2}{4} = 6$$

Ec. B1

Ejemplo 3. Aplicación del balance de electrones en la construcción de la ecuación de síntesis de biomasa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824



Aplicando el balance de electrones a la ecuación B3 se obtiene la ecuación B4

$$6 \Psi_{glucosa} + \beta \Psi_{NADH} - 6 \Psi_{biomasa} = 0$$

$$\Psi_{glucosa} = 6; \Psi_{biomasa} = 4.25$$

$$\beta = \frac{0.75 \text{ moles de NADH}}{\text{mol de glucosa}} \quad \text{Ec. B4}$$

ANEXO C

CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES DE PRODUCCIÓN DE ETANOL Y, REASIMILACIÓN DE ACETATO Y BUTÍRATO

Con la finalidad de estimar los límites de acetato, butírateo y etanol se alimentó el correspondiente subespacio sea I, II, III ó IV a las ecuaciones 63, 64, 65 y 66. Después se procedió a resolver dichas ecuaciones no lineales utilizando la versión de prueba del software Mathematica 8. En la figura C1 se presenta la solución obtenida para un subespacio IV.

Figura C1. Solución obtenida para el acetato, butírateo y etanol en el subespacio IV

```

File Edit Insert Format Cell Graphics Evaluation Palettes Window Help

1) Reasimilación de Acetato via fosfotransferasa
FindRoot[0.44*(0.358 - m) (2.45 - m) (2 - m) == m^3, {m, 0.358}]
{m -> 0.333983}

2) Reasimilación de Butírateo via fosfotransferasa
FindRoot[5.3*(0.821 - n) (2.45 n) (2 - n) == n^3, {n, 0.821}]
{n -> 0.782296}

7) Equilibrios simultáneos de reasimilación de ácidos via fosfotransferasa y CoA -
transferasa y la reacción hipotética de formación de Acetona a partir de Acetato e incluyendo el efecto del Acetil -
CoA utilizado en la síntesis de Acetona
FindRoot[(0.44*(0.358 - m - 2 j) (2.45 - m - n - j) (2 - m - n + j + k) == (m - j - 2 k) (m + n + j)^2,
11*(0.358 - m - 2 j)^2 (2.45 - m - n - j) == (j + k) (2 + j + k) (j + m + n)^2,
5.3*(0.821 - n - k) (2.45 - m - n - j) (2 - m - n + j + k) == (n + k) (n + m + j)^2, k == 0.315 j], {m, 0.1},
{n, 0.9}, {j, 0.05}, {k, 0.015}]
{m -> 0.163089, n -> 0.732208, j -> 0.0530988, k -> 0.0167261}

8) Formación de etanol
FindRoot[(0.074*(0.321 - r - e) (0.247 - 2 r - e)^2 == (1.02 + r + e) (r + e) r,
0.013*(0.321 - r - e) (0.247 - 2 r - e) == (1.02 + r + e) (r + e) e], {r, 0.1}, {e, 0.1}]
{r -> 0.0193566, e -> 0.0178569}

```

En la tabla C1 se muestra detalladamente la solución obtenida para cada uno de

los modelos subespaciados incluyendo el utilizado en la validación.

Tabla C1. Límites estimados para el acetato, butírate y etanol para los modelos subespaciados

	Modelo subespaciado I	Modelo subespaciado II	Modelo subespaciado III	Modelo subespaciado IV	Validación
Acetato máximo vía FTQ	$m_{\text{máx}}=0.100$	$m_{\text{máx}}=0.440$	$m_{\text{máx}}=0.544$	$m_{\text{máx}}=0.334$	$m_{\text{máx}}=0.505$
Butírate máximo vía FTQ	$n_{\text{máx}}=0.891$	$n_{\text{máx}}=0.720$	$n_{\text{máx}}=0.645$	$n_{\text{máx}}=0.782$	$n_{\text{máx}}=0.675$
Acetato mínimo vía CoAT	$j_{\text{mín}}=0.090$	$j_{\text{mín}}=0.080$	$j_{\text{mín}}=0.113$	$j_{\text{mín}}=0.053$	$j_{\text{mín}}=0.100$
Butírate mínimo vía CoAT	$k_{\text{mín}}=0.028$	$k_{\text{mín}}=0.025$	$k_{\text{mín}}=0.036$	$k_{\text{mín}}=0.017$	$k_{\text{mín}}=0.031$
Etanol mínimo	$e_{\text{mín}}=0.000$	$e_{\text{mín}}=0.029$	$e_{\text{mín}}=0.038$	$e_{\text{mín}}=0.019$	$e_{\text{mín}}=0.024$

**Anexo C. Código de optimización para la solución de los diferentes
modelos estequiométricos**

***MODELO SIMPLIFICADO CASO IA**

*FUNCIÓN OBJETIVO: maximización del n-butanol

Positive Variables g,f,e,a,c,d,b,t,r,w,l;

Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8,R9,FOBJ;

Variable Z;

*Restricciones

*Balance de masa de Piruvato

$$R1. 2 \cdot g - f - l = E = 0;$$

*Balance de masa de Acetil-CoA

$$R2.. f - a - e - 2 \cdot d - 2 \cdot r = E = 0;$$

*Balance de masa de Butiril.CoA

$$R3.. r - c - b = E = 0;$$

*Balance de masa de NADH

$$R4.. 2 \cdot g + t - 2 \cdot e - 2 \cdot r - 2 \cdot b - l - 0.0375 = E = 0;$$

*Balance de masa de carbono

$$R5.. 6 \cdot g - f - 4 \cdot d - 2 \cdot a - 2 \cdot e - 4 \cdot c - 4 \cdot b - 3 \cdot l = E = 0;$$

*Glucosa

$$R6.. g = E = 1;$$

*Balance de masa Ferredoxina OxFd. Una parte de RdFd (piruvato-acetilcoa) se emplea en la síntesis de NADH

$$R7.. w + t - f - 0.0375 = E = 0;$$

*ATP producido

$$R8.. 2 \cdot g + a + c + d - 0.73 = G = 0;$$

*n-butanol

$$b \cdot UP = 1.0;$$

*Balance de electrones

$$R9.. 24 \cdot g - 8 \cdot a - 20 \cdot c - 16 \cdot d - 12 \cdot e - 24 \cdot b - 12 \cdot l - 2 \cdot w = E = 0;$$

*Optimización de la n-butanol
 FOBJ.. Z=E=b;
 MODEL JAPMGN /ALL/;
 Option LP=BARON;
 Solve JAPMGN MAXIMIZE Z USING DNLP;

***MODELO SIMPLIFICADO CASO DE ESTUDIO IB**

*Función Objetivo: minimización del ATP
 Positive Variables g,f,e,a,c,d,b,t,r,w,l;
 Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,F OBJ;
 Variable Z;
 *Restricciones
 *Balance de masa de Piruvato
 R1.. $2 \cdot g - f - l = E = 0$;
 *Balance de masa de Acetil-CoA
 R2.. $f - a - e - 2 \cdot d - 2 \cdot r = E = 0$;
 *Balance de masa de NADH
 R3.. $2 \cdot g + t - 2 \cdot e - 2 \cdot r - 2 \cdot b - l - 0.0375 = E = 0$;
 *Balance de masa de carbono
 R4.. $6 \cdot g - f - 4 \cdot d - 2 \cdot a - 2 \cdot e - 4 \cdot c - 4 \cdot b - 3 \cdot l = E = 0$;
 *Glucosa
 R5.. $g = E = 1$;
 *Balance de masa Ferredoxina
 R6.. $w + t - f - 0.0375 = E = 0$;
 *Balance de electrones
 R7.. $24 \cdot g - 8 \cdot a - 20 \cdot c - 16 \cdot d - 12 \cdot e - 12 \cdot l - 24 \cdot b - 2 \cdot w = E = 0$;
 *n-butanol
 b.UP=1.0;
 *ATP producido
 F OBJ.. $Z = E = 2 \cdot g + a + c + d - 0.73$;

MODEL JAPMGN /ALL/;
Option NLP=BARON;
Solve JAPMGN MINIMIZE Z USING DNLP;

***MODELO SIMPLIFICADO CASO DE ESTUDIO IC**

*Función objetivo: minimización de la energía de Gibbs

Positive Variables g,f,e,a,c,d,b,t,r,w,l;

Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8,R9,FOBJ;

Variable Z;

*Restricciones

*Balance de masa de Piruvato

R1.. $2*g-f-l=E=0$;

*Balance de masa de Acetil-CoA

R2.. $f-a-e-2*d-2*r=E=0$;

*Balance de masa de Butiril-CoA

R3.. $r-c-b=E=0$;

*Balance de masa de NADH

R4.. $2*g+t-2*e-2*r-2*b-l-0.0375=E=0$;

*Balance de masa de carbono

R5.. $6*g-f-4*d-2*a-2*e-4*c-4*b-3*l=E=0$;

*Glucosa

R6.. $g=E=1$;

*Balance de masa Ferredoxina

R7.. $w+t-f-0.0375=E=0$;

*Balance de electrones

R8.. $24*g-8*a-20*c-16*d-12*e-24*b-12*l-2*w=E=0$;

*ATP producido

R9.. $2*g+a+c+d-0.73=G=0$;

*n-butanol

b.UP=1.0;

*Minimización de la energía de Gibbs

FOBJ.. $Z=E=227.5*b+58*e-547.4*f+97.5*w+75.2*g-157.3*r-272.6*d-54.6*a+121.8*c-312.6*l-142.277;$

MODEL JAPMGN /ALL/;

Option NLP=BARON;

Solve JAPMGN MINIMIZE Z USING DNLP;

*MODELO GENERALIZADO

*CASO DE ESTUDIO II OPTIMIZACIÓN DEL n-butanol

Positive Variables g,f,t,w,c,a,b,j,k,r,q,i,e,l,h,m,n;

Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8,R9,R10,R12,FOBJ;

Variable Z;

*Restricciones

*Balance de masa de Piruvato

R1.. $2*g-f-l=E=0;$

*Balance de masa de Acetil-CoA

R2.. $f-h-2*i-j-2*k-2*r-e+m=E=0;$

*Balance de masa de Butiril-CoA

R3.. $k+n+r-b=E=0;$

*Balance de masa de NADH

R4.. $2*g+t-2*i-2*r-2*e-2*b-l-0.125*q=E=0;$

*Balance de masa de ATP

R5.. $2*g+h+i-m-n-(73/30)*q=G=0;$

*Balance de masa de Ferredoxina

R6.. $w+t-f-0.125*q=E=0;$

*Balance de masa de Carbono

R7.. $6*g+2*m+4*n-2*h-2*j-2*e-4*b-4*i-f=E=0;$

*Balance de electrones

R8.. $24*g+8*m+20*n+4*k-8*j-8*h-20*i-12*e-12*l-24*b-2*w=E=0;$

*Relación cinética de reasimilación de ácidos

R9.. $k-0.315*j=E=0$;
 *Asignaciones
 *Glucosa
 R10.. $g=E=1$;
 *Biomasa
 R12.. $q=E=0.3$;
 *n-Butanol
 b.UP=1;
 FOBJ.. $Z=E=b$;
 Model JAPMG1 /ALL/;
 Option LP = BARON;
 Solve JAPMG1 MAXIMIZE Z USING DNLP;

***MODELO ESTEQUIOMÉTRICO TEÓRICO DE LA OPTIMIZACIÓN DE LA ACIDOGÉNESIS DE LA FERMENTACIÓN ABE**

***MODELO NADH ABIERTO**

*Función Objetivo: maximización del ATP
 Positive Variables g,f,i,h,w,s,l;
 Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,FOBJ;
 Variable Z;
 *Restricciones
 *Balance de masa de Piruvato
 R1.. $2*g-f-l=E=0$;
 *Balance de masa de NADH
 R2.. $2*g-2*i=G=0$;
 *Balance de masa de carbono
 R3.. $6*g-f-2*h-4*i-3*l=E=0$;
 *Glucosa
 R4.. $g=E=1$;
 *Balance de masa Ferredoxina OxFd

R5.. $w-f=E=0$;

*Restricción de butírate mayor a acetato

R6.. $i-h=G=0$;

*Restricción de eficiencia

R7.. $(2+i+h)*(s-1)+4.044*s=E=0$;

s.LO=0.43;

*ATP producido

FOBJ.. $Z=E=2*g+0.1*i+0.1*h-0.73$;

*p1=Factor de peso del butírate=0.1

*p2=Factor de peso del acetato, puede tomar los siguientes valores=0.1, 0.05 y 0.01

MODEL JAPMGN /ALL/;

Option NLP=BARON;

Solve JAPMGN MAXIMIZE Z USING DNLP;

***MODELO ESTEQUIOMÉTRICO TEÓRICO DE LA OPTIMIZACIÓN DE LA ACIDOGÉNESIS DE LA FERMENTACIÓN ABE**

***MODELO NADH CERRADO**

*Función Objetivo: maximización del ATP

Positive Variables g,f,i,h,w,s,t,l;

Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8,R9,FOBJ;

Variable Z;

*Restricciones

*Balance de masa de Piruvato

R1.. $2*g-f-l=E=0$;

*Balance de masa de NADH

R2.. $2*g-2*i-0.0375-t=E=0$;

*Balance de masa de carbono

R3.. $6*g-f-2*h-4*i-3*l=E=0$;

*Glucosa

R4.. $g=E=1$;

*Balance de masa Ferredoxina

R5.. $w-f-t-0.0375=E=0$;

*Restricción de butirato mayor a acetato

R6.. $i-h=G=0$;

*Restricción de eficiencia

R7.. $(2+i+h)*(s-1)+4.044*s=E=0$;

*Balance de electrones

R8.. $24-20*i-8*h-2*w-12*l=E=0$;

*Lactato

R9.. $l=E=0$;

s.LO=0.43;

*ATP producido

FOBJ.. $Z=E=2*g+0.1*i+0.1*h-0.73$;

* p_1 =Factor de peso del butirato=0.1

* p_2 =Factor de peso del acetato, puede tomar los siguientes valores=0.1, 0.05 y 0.01

MODEL JAPMGN /ALL/;

Option NLP=BARON;

Solve JAPMGN MAXIMIZE Z USING DNLP;

***MODELO SUBESPACIADO I**

*Función objetivo: maximización de la n-butanol

Positive Variables $g,f,t,w,c,a,b,j,k,r,q,i,e,l,h,m,n$;

Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8,R9,R10,R12,R13,R14,R15,R16,FOBJ;

Variable Z;

*Restricciones

*Balance de masa de Piruvato

R1.. $2*g-f-l=E=0$;

*Balance de masa de Acetil-CoA

$$R2.. f-h-2*i-j-2*k-2*r-e+m=E=0;$$

*Balance de masa de Butiril-CoA

$$R3.. k+n+r-b=E=0;$$

*Balance de masa de NADH

$$R4.. 2*g+t-2*i-2*r-2*e-2*b-l-0.125*q=E=0;$$

*Balance de masa de ATP

$$R5.. 2*g+h+i-m-n-(73/30)*q=G=0;$$

*Balance de masa de Ferredoxina

$$R6.. w+t-f-0.125*q=E=0;$$

*Balance de masa de Carbono

$$R7.. 6*g+2*m+4*n-2*h-2*j-2*e-4*b-4*i-f=E=0;$$

*Balance de electrones

$$R8.. 24*g+8*m+20*n+4*k-8*j-8*h-20*i-12*e-12*l-24*b-2*w=E=0;$$

*Relación cinética de reasimilación de ácidos

$$R9.. k-0.315*j=E=0;$$

*Asignaciones

*Glucosa

$$R10.. g=E=1;$$

*Biomasa

$$R12.. q=E=0.3;$$

*Acetato/butirato Subespacio I

$$R13.. h=E=0.101;$$

$$R14.. i=E=0.949;$$

*Acetato/butírate residual mayor a cero

$$R15.. h-j-m=G=0.0;$$

$$R16.. i-k-n=G=0.058;$$

*n-Butanol

$$b.UP=1;$$

*Reasimilación de acetato vía CoA-Transferasa

j.LO=0.090;

*Conversión de Acetil-CoA a Butiril-CoA por reasimilación del acetato vía CoA-Transferasa

r.LO=0.0;

*Etanol mínimo

e.LO=0.0;

FOBJ.. Z=E=b;

Model JAPMG1 /ALL/;

Option LP = BARON;

Solve JAPMG1 MAXIMIZE Z USING DNLP;

***MODELO SUBESPACIADO II**

*Función objetivo: maximización de la n-butanol

Positive Variables g,f,t,w,c,a,b,j,k,r,q,i,e,l,h,m,n;

Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8,R9,R10,R12,R13,R14,R15,R16,FOBJ;

Variable Z;

*Restricciones

*Balance de masa de Piruvato

R1.. $2 \cdot g - f - l = E = 0$;

*Balance de masa de Acetil-CoA

R2.. $f - h - 2 \cdot i - j - 2 \cdot k - 2 \cdot r - e + m = E = 0$;

*Balance de masa de Butiril-CoA

R3.. $k + n + r - b = E = 0$;

*Balance de masa de NADH

R4.. $2 \cdot g + t - 2 \cdot i - 2 \cdot r - 2 \cdot e - 2 \cdot b - l - 0.125 \cdot q = E = 0$;

*Balance de masa de ATP

R5.. $2 \cdot g + h + i - m - n - (73/30) \cdot q = G = 0$;

*Balance de masa de Ferredoxina

R6.. $w + t - f - 0.125 \cdot q = E = 0$;

*Balance de masa de Carbono

R7.. $6*g+2*m+4*n-2*h-2*j-2*e-4*b-4*i-f=E=0;$

*Balance de electrones

R8.. $24*g+8*m+20*n+4*k-8*j-8*h-20*i-12*e-12*l-24*b-2*w=E=0;$

*Relación cinética de reasimilación de ácidos

R9.. $k-0.315*j=E=0;$

*Asignaciones

*Glucosa

R10.. $g=E=1;$

*Biomasa

R12.. $q=E=0.3;$

*Acetato/butirato Subespacio II

R13.. $h=E=0.5;$

R14.. $i=E=0.75;$

*Acetato/butírate residual mayor a cero

R15.. $h-j-m=G=0.06;$

R16.. $i-k-n=G=0.03;$

*n-Butanol

b.UP=1;

*Reasimilación de acetato vía CoA-Transferasa

j.LO=0.080;

*Conversión de Acetil-CoA a Butiril-CoA por reasimilación del acetato vía CoA-Transferasa

r.LO=0.029;

*Etanol mínimo

e.LO=0.022;

FOBJ.. $Z=E=b;$

Model JAPMG1 /ALL/;

Option LP = BARON;

Solve JAPMG1 MAXIMIZE Z USING DNLP;

***MODELO SUBESPACIADO III**

*Función objetivo: maximización de la n-butanol

Positive Variables g,f,t,w,c,a,b,j,k,r,q,i,e,l,h,m,n;

Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8,R9,R10,R12,R13,R14,R15,R16,FOBJ;

Variable Z;

*Restricciones

*Balance de masa de Piruvato

$$R1.. 2*g-f-l=E=0;$$

*Balance de masa de Acetil-CoA

$$R2.. f-h-2*i-j-2*k-2*r-e+m=E=0;$$

*Balance de masa de Butiril-CoA

$$R3.. k+n+r-b=E=0;$$

*Balance de masa de NADH

$$R4.. 2*g+t-2*i-2*r-2*e-2*b-l-0.125*q=E=0;$$

*Balance de masa de ATP

$$R5.. 2*g+h+i-m-n-(73/30)*q=G=0;$$

*Balance de masa de Ferredoxina

$$R6.. w+t-f-0.125*q=E=0;$$

*Balance de masa de Carbono

$$R7.. 6*g+2*m+4*n-2*h-2*j-2*e-4*b-4*i-f=E=0;$$

*Balance de electrones

$$R8.. 24*g+8*m+20*n+4*k-8*j-8*h-20*i-12*e-12*l-24*b-2*w=E=0;$$

*Relación cinética de reasimilación de ácidos

$$R9.. k-0.315*j=E=0;$$

*Asignaciones

*Glucosa

$$R10.. g=E=1;$$

*Biomasa

$$R12.. q=E=0.3;$$

*Acetato/butirato Caso I

R13.. $h=E=0.667$;

R14.. $i=E=0.667$;

*Acetato/butírate residual mayor a cero

R15.. $h-j-m=G=0.123$;

R16.. $i-k-n=G=0.022$;

*n-Butanol

b.UP=1;

*Reasimilación de acetato vía CoA-Transferasa

j.LO=0.113;

*Conversión de Acetil-CoA a Butiril-CoA por reasimilación del acetato vía CoA-Transferasa

r.LO=0.038;

*Etanol mínimo

e.LO=0.026;

FOBJ.. $Z=E=b$;

Model JAPMG1 /ALL/;

Option LP = BARON;

Solve JAPMG1 MAXIMIZE Z USING DNLP;

***MODELO SUBESPACIADO IV**

*Función objetivo: maximización de la n-butanol

Positive Variables g,f,t,w,c,a,b,j,k,r,q,i,e,l,h,m,n;

Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8,R9,R10,R12,R13,R14,R15,R16,FOBJ;

Variable Z;

*Restricciones

*Balance de masa de Piruvato

R1.. $2*g-f-l=E=0$;

*Balance de masa de Acetil-CoA

R2.. $f-h-2*i-j-2*k-2*r-e+m=E=0$;

*Balance de masa de Butiril-CoA

$$R3.. k+n+r-b=E=0;$$

*Balance de masa de NADH

$$R4.. 2*g+t-2*i-2*r-2*e-2*b-l-0.125*q=E=0;$$

*Balance de masa de ATP

$$R5.. 2*g+h+i-m-n-(73/30)*q=G=0;$$

*Balance de masa de Ferredoxina

$$R6.. w+t-f-0.125*q=E=0;$$

*Balance de masa de Carbono

$$R7.. 6*g+2*m+4*n-2*h-2*j-2*e-4*b-4*i-f=E=0;$$

*Balance de electrones

$$R8.. 24*g+8*m+20*n+4*k-8*j-8*h-20*i-12*e-12*l-24*b-2*w=E=0;$$

*Relación cinética de reasimilación de ácidos

$$R9.. k-0.315*j=E=0;$$

*Asignaciones

*Glucosa

$$R10.. g=E=1;$$

*Biomasa

$$R12.. q=E=0.3;$$

*Acetato/butirato Caso I

$$R13.. h=E=0.358;$$

$$R14.. i=E=0.821;$$

*Acetato/butírate residual mayor a cero

$$R15.. h-j-m=G=0.024;$$

$$R16.. i-k-n=G=0.039;$$

*n-Butanol

$$b.UP=1;$$

*Reasimilación de acetato vía CoA-Transferasa

$$j.LO=0.053;$$

*Conversión de Acetil-CoA a Butiril-CoA por reasimilación del acetato vía CoA-Transferasa

r.LO=0.019;
 *Etanol mínimo
 e.LO=0.018;
 FOBJ.. Z=E=b;
 Model JAPMG1 /ALL/;
 Option LP = BARON;
 Solve JAPMG1 MAXIMIZE Z USING DNLP;

***MODELO SUBESPACIADO**

***VALIDACIÓN**

*Función objetivo: maximización de la n-butanol
 Positive Variables g,f,t,w,c,a,b,j,k,r,q,i,e,l,h,m,n;
 Equations R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8,R9,R10,R12,R13,R14,R15,R16,F OBJ;
 Variable Z;
 *Restricciones
 *Balance de masa de Piruvato
 R1.. $2 \cdot g - f - l = E = 0$;
 *Balance de masa de Acetil-CoA
 R2.. $f - h - 2 \cdot i - j - 2 \cdot k - 2 \cdot r - e + m = E = 0$;
 *Balance de masa de Butiril-CoA
 R3.. $k + n + r - b = E = 0$;
 *Balance de masa de NADH
 R4.. $2 \cdot g + t - 2 \cdot i - 2 \cdot r - 2 \cdot e - 2 \cdot b - l - 0.125 \cdot q = E = 0$;
 *Balance de masa de ATP
 R5.. $2 \cdot g + h + i - m - n - (73/30) \cdot q = G = 0$;
 *Balance de masa de Ferredoxina
 R6.. $w + t - f - 0.125 \cdot q = E = 0$;
 *Balance de masa de Carbono
 R7.. $6 \cdot g + 2 \cdot m + 4 \cdot n - 2 \cdot h - 2 \cdot j - 2 \cdot e - 4 \cdot b - 4 \cdot i - f = E = 0$;
 *Balance de electrones

R8.. $24*g+8*m+20*n+4*k-8*j-8*h-20*i-12*e-12*l-24*b-2*w=E=0;$

*Relación cinética de reasimilación de ácidos

R9.. $k-0.315*j=E=0;$

*Asignaciones

*Glucosa

R10.. $g=E=1;$

*Biomasa

R12.. $q=E=0.3;$

*Acetato/butirato Caso Validación

R13.. $h=E=0.6;$

R14.. $i=E=0.7;$

*Acetato/butítrato residual mayor a cero

R15.. $h-j-m=G=0.095;$

R16.. $i-k-n=G=0.025;$

*n-Butanol

b.UP=1;

*Reasimilación de acetato vía CoA-Transferasa

j.LO=0.1;

*Conversión de Acetil-CoA a Butiril-CoA por reasimilación del acetato vía CoA-Transferasa

r.LO=0.034;

*Etanol mínimo

e.LO=0.024;

FOBJ.. $Z=E=b;$

Model JAPMG1 /ALL/;

Option LP = BARON;

Solve JAPMG1 MAXIMIZE Z USING DNLP;

Anexo D. Curva de calibración de biomasa y de medición de solventes por HPLC

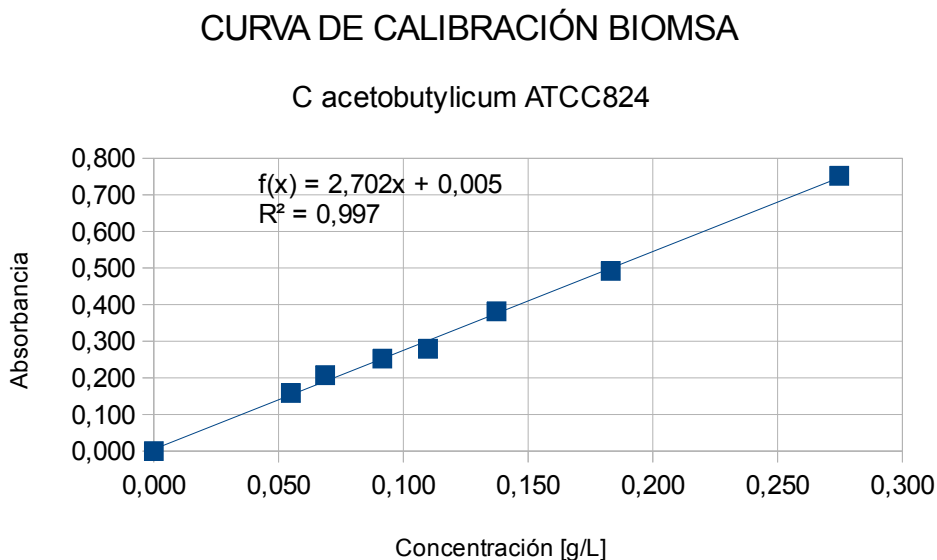
Curva de calibración de biomasa

Tabla E1. Datos de la curva de calibración de biomasa

	Masa (g)	Masa total (g)	Masa Biomasa (g)	Biomasa (g/L)
Caja01	0,269	0,282	0,013	2,680
Caja02	0,259	0,273	0,014	2,800
Caja03	0,278	0,292	0,014	2,760
Volumen	5mL		Promedio	2,747

Dilución	Abs1	Abs2	Abs3	Abs Media	Biomasa (g/L)
10	0,751	0,752	0,753	0,752	0,275
15	0,494	0,491	0,492	0,492	0,183
20	0,382	0,382	0,381	0,382	0,137
25	0,282	0,278	0,279	0,280	0,110
30	0,252	0,253	0,253	0,253	0,092
40	0,206	0,208	0,208	0,207	0,069
50	0,159	0,159	0,158	0,159	0,055
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Figura E1. Curva de calibración de biomasa



Curva de calibración de los solventes por HPLC

Figura E2. Curva de calibración de ácido láctico

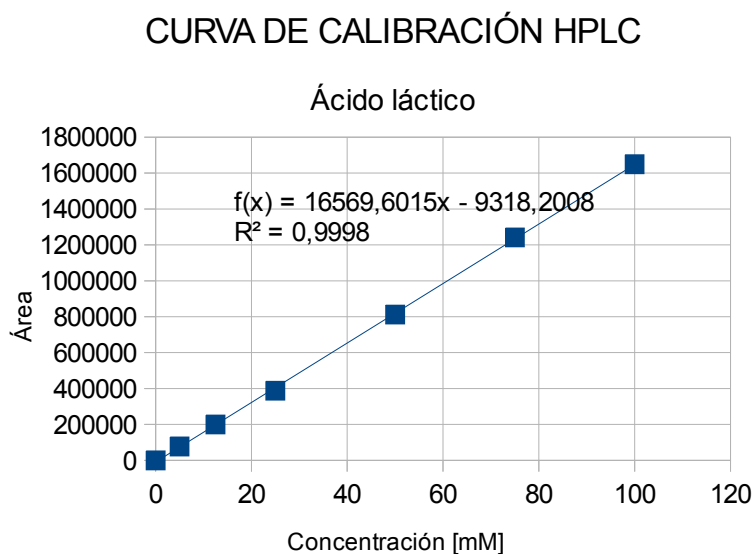


Figura E3. Curva de calibración de ácido acético

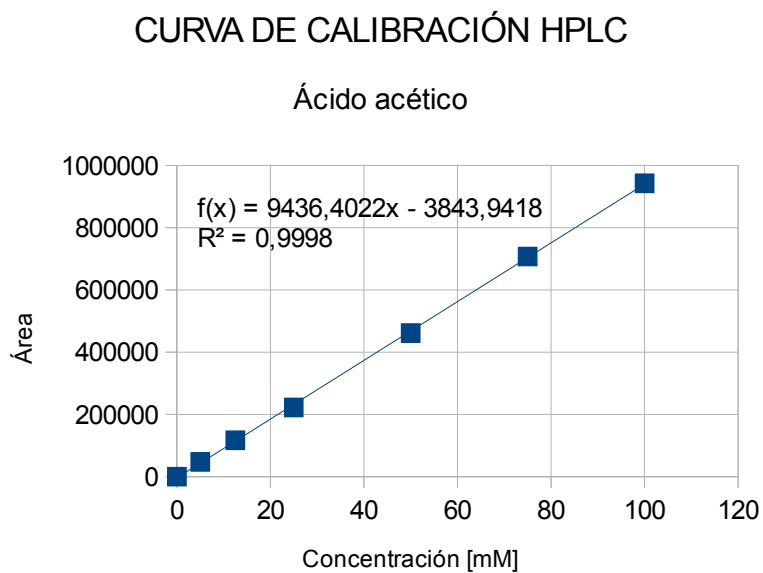


Figura E4. Curva de calibración de ácido butírico

CURVA DE CALIBRACIÓN HPLC

Ácido butírico

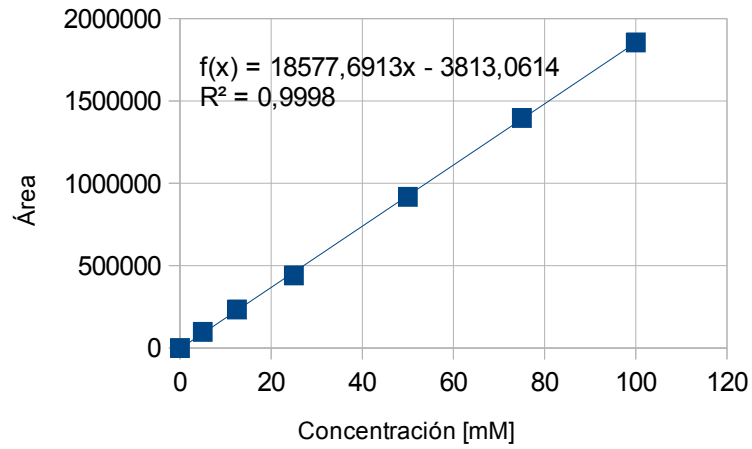


Figura E5. Curva de calibración de acetona

CURVA DE CALIBRACIÓN HPLC

Acetona

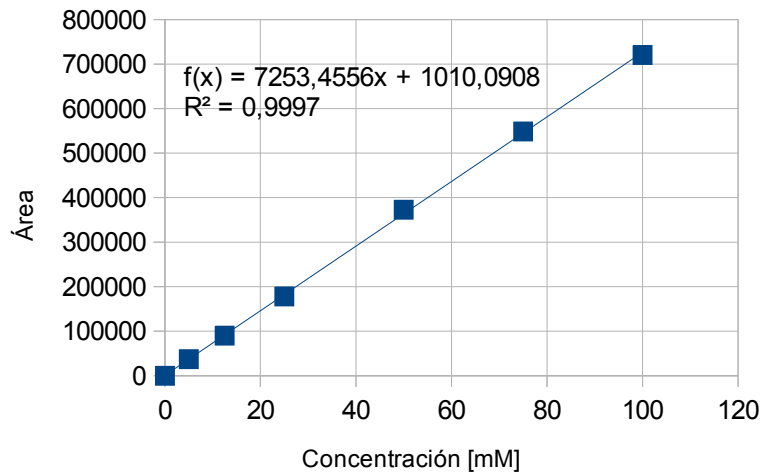


Figura E6. Curva de calibración de etanol

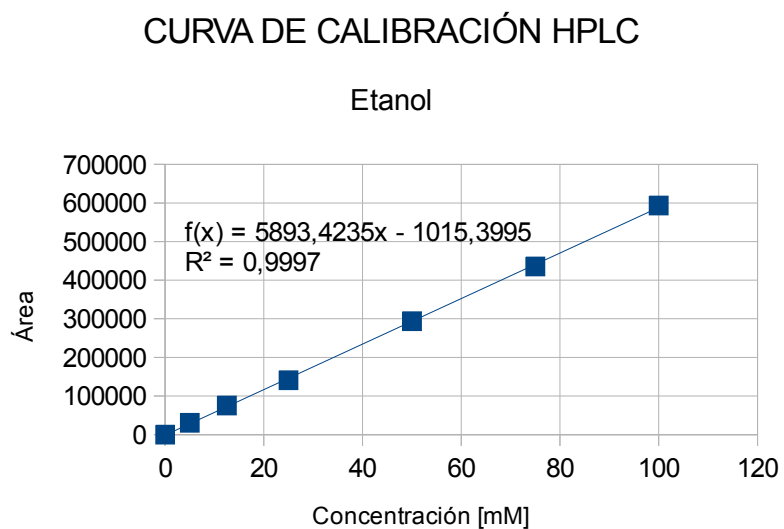
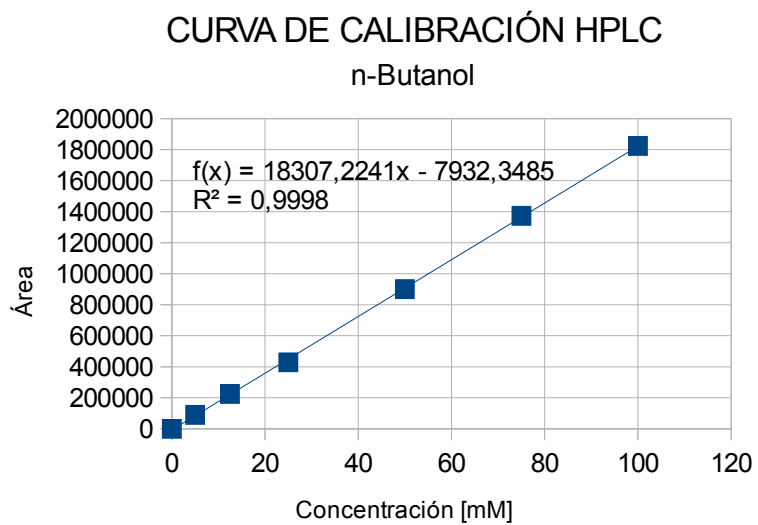


Figura E7. Curva de calibración de n-butanol

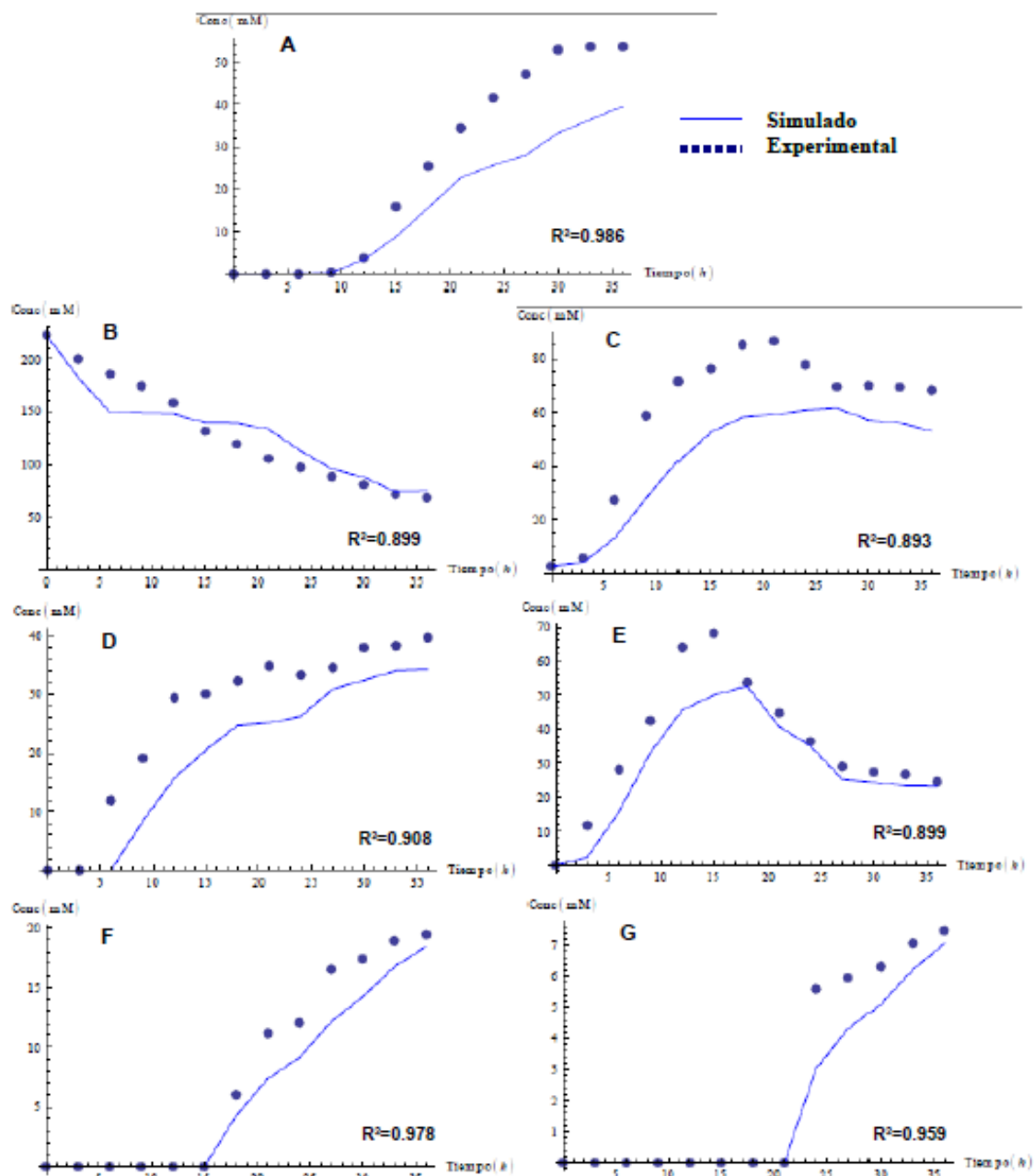


Anexo E. Balance de masa del modelo cinético estructurado y perfil experimental y simulado de la fermentación abe sin control de pH

Balance de masa del modelo cinético estructurado

$$\begin{aligned} & \textit{Glucosa} \\ & \frac{\partial[\textit{Glucosa}]}{\partial t} = -r_1 \\ & \textit{Fructosa-6- fosfato} \\ & \frac{\partial[\textit{F-6P}]}{\partial t} = r_1 - r_2 \\ & \textit{Gliceraldehído-3- fosfato} \\ & \frac{\partial[\textit{G3P}]}{\partial t} = r_2 - r_3 \\ & \textit{Piruvato} \\ & \frac{\partial[\textit{Piruvato}]}{\partial t} = r_3 + r_4 - r_5 - r_6 \\ & \textit{Lactato} \\ & \frac{\partial[\textit{Lactato}]}{\partial t} = r_5 - r_4 \\ & \textit{AcetilCoA} \\ & \frac{\partial[\textit{AcCoA}]}{\partial t} = r_6 + r_7 + r_8 - r_9 - r_{10} - r_{11} - r_{12} \\ & \textit{Biomasa} \\ & \frac{\partial[\textit{biomasa}]}{\partial t} = r_{12} - r_{13} \\ & \textit{Acetato} \\ & \frac{\partial[\textit{Acetato}]}{\partial t} = r_9 - r_7 - r_8 \\ & \textit{Etanol} \\ & \frac{\partial[\textit{Etanol}]}{\partial t} = r_{11} \\ & \textit{Acetoacetil- CoA} \\ & \frac{\partial[\textit{AACoA}]}{\partial t} = r_{10} - r_8 - r_{14} - r_{15} \\ & \textit{Acetoacetato} \\ & \frac{\partial[\textit{Acetoacetato}]}{\partial t} = r_8 + r_{15} - r_{16} \\ & \textit{Butiril- CoA} \\ & \frac{\partial[\textit{BCoA}]}{\partial t} = r_{14} + r_{15} + r_{17} - r_{18} - r_{19} \\ & \textit{Butirato} \\ & \frac{\partial[\textit{Butirato}]}{\partial t} = r_{18} - r_{15} - r_{17} \\ & \textit{Acetona} \\ & \frac{\partial[\textit{Acetona}]}{\partial t} = r_{16} \\ & \textit{CO}_2 \\ & \frac{\partial[\textit{CO}_2]}{\partial t} = r_6 + r_{16} \\ & \textit{Butanol} \\ & \frac{\partial[\textit{Butanol}]}{\partial t} = r_{19} \end{aligned}$$

Figura F1. Perfil experimental y simulado sin control de pH de la producción de ABE a partir de glucosa utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824



A) n-butanol, B) glucosa, C) biomasa, D) acetato, E) butírate, F) acetona y G) etanol.

Fuente: Autor.