

**OPTIMIZACIÓN Y AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA
FERMENTACIÓN ACETONA-BUTANOL-ETANOL (ABE) A PARTIR DE
JARABES DE ALMIDÓN DE YUCA EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum*
ATCC 824**

REYNEL MARTÍNEZ CASTELLANOS

MARTHA LILIANA PRADA BLANCO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTADER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

**OPTIMIZACIÓN Y AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA
FERMENTACIÓN ACETONA-BUTANOL-ETANOL (ABE) A PARTIR DE
JARABES DE ALMIDÓN DE YUCA EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum*
ATCC 824**

**REYNEL MARTÍNEZ CASTELLANOS
MARTHA LILIANA PRADA BLANCO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Ingeniero Químico**

Director

Ph.D. Luis Javier López Giraldo

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTADER
FACULTAD FÍSICOQUÍMICA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2013**

AGRADECIMIENTOS

Al director del proyecto, Doctor Luis Javier López Giraldo por su constante guía, consejos y apoyo incondicional durante la elaboración del trabajo.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión.

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) y a su grupo de trabajo quienes nos permitieron realizar la mayor parte de nuestro trabajo en su laboratorio.

A los laboratorios de la escuela de Ingeniería Química y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander por permitirnos el ingreso a sus instalaciones y el uso de sus equipos.

A la estudiante de microbiología Daniela Espinosa, quien nos ayudó en gran parte del proyecto y nos enseñó aspectos relacionados con el seguimiento microbiano los cuales hicieron del presente trabajo una experiencia agradable y enriquecedora.

A los profesores Jose Andrés Pérez y Carolina Guzmán quienes nos aportaron su conocimiento en las diferentes etapas del proyecto, y al ingeniero Victor Lizcano cuya ayuda fue fundamental en el desarrollo del mismo.

Y finalmente a nuestros compañeros y amigos quienes nos apoyaron en todo momento y nos motivaron a seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
1. METODOLOGÍA.....	21
1.1 ELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DE INTERVALOS DE LAS VARIABLES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO FERMENTATIVO	21
1.2 DISEÑO DE EXPERIMENTOS	22
1.3 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO EXPERIMENTAL	22
1.3.1 Medios de cultivo.....	23
1.3.2 Preparación del inóculo.....	24
1.3.3 Seguimiento del crecimiento microbiano.....	24
1.3.3 Proceso fermentativo.....	25
1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
1.5 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS	26
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	29
2.1 INFLUENCIA DEL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO EN EL PROCESO FERMENTATIVO	29
2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
2.3. AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS A UN MODELO NO ESTRUCTURADO, NO SEGREGADO	36
3. CONCLUSIONES.....	41
4. RECOMENDACIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica de la cepa <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 en la fermentación ABE, con glucosa como fuente de carbono	17
Figura 2. Etapas empleadas en el desarrollo del proyecto	21
Figura 3. Comportamiento cinético de los solventes en función del pH y la concentración inicial de sustrato	29
Figura 4. Comportamiento cinético de los ácidos en función del pH y la concentración inicial de sustrato.	29
Figura 5. Comportamiento cinético del sustrato en función del tiempo.....	29
Figura 6. Comportamiento cinético de la biomasa en función del tiempo.....	29
Figura 7. Superficie de respuesta estimada para la productividad	35
Figura 8. Velocidad específica de crecimiento Vs. Concentración de jarabe de almidón de yuca a condiciones óptimas.....	37
Figura 9. Modelo de Monod ajustado para la velocidad de crecimiento	38
Figura 10. Perfiles de concentración de a. n-butanol, b. biomasa y c. sustrato, para el modelo cinético optimizado	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores y niveles del diseño experimental	22
Tabla 2. Composición del medio de crecimiento empleado para la fermentación ABE	23
Tabla 3. Composición del medio de fermentación ABE	23
Tabla 4. Modelos cinéticos de crecimiento celular.....	28
Tabla 5. Rendimientos observados de solventes y biomasa	31
Tabla 6. Productividades volumétricas de n-butanol a diferentes condiciones	32
Tabla 7. Resultados del análisis de varianza ANOVA	33
Tabla 8. Condiciones óptimas que maximizan la productividad de n-butanol	33
Tabla 9. Valores de los parámetros cinéticos calculados.....	38

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Resultados del diseño factorial 2^2 compuesto central rotatable + puntos centrales.....	49
Anexo B. Protocolo de preparación del medio de crecimiento	50
Anexo C. Curva de calibración para la cuantificación de biomasa – método del peso seco	52
Anexo D. Cromatograma para un experimento a las 31 horas de fermentación. ...	53
Anexo E. Curvas de calibración de los metabolitos presentes en la fermentación ABE	54
Anexo F. Imágenes del montaje de las pruebas experimentales	56
Anexo G. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados.....	57

RESUMEN

TÍTULO: OPTIMIZACIÓN Y AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA FERMENTACIÓN ACETONA-BUTANOL-ETANOL (ABE) A PARTIR DE JARABES DE ALMIDÓN DE YUCA EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824*

AUTORES: Martha Liliana Prada Blanco y Reynel Martínez Castellanos**

PALABRAS CLAVE: Fermentación Acetona – Butanol – Etanol (ABE), almidón de yuca, optimización, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, modelo cinético.

DESCRIPCIÓN:

El presente trabajo describe los resultados obtenidos de la optimización y el ajuste de parámetros cinéticos de la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) utilizando hidrolizados concentrados de almidón de yuca empleando el microorganismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Para ello se adoptó la metodología de superficie de respuesta aplicada a los datos experimentales y se seleccionaron dos de las variables que la literatura reporta como influyentes en el proceso fermentativo: pH y concentración de sustrato. Inicialmente, se realizó un diseño de experimentos con el propósito de analizar la influencia directa de las variables seleccionadas sobre la productividad volumétrica de n-butanol. Realizando el análisis de varianza ANOVA, y empleando la metodología de superficie de respuesta se obtuvo una productividad máxima de n-butanol de 61,975 mg/L*h para las condiciones de operación: pH 4,29 y concentración de sustrato 22,07g equivalentes de glucosa/L. El análisis ANOVA aplicado a los datos experimentales mostró que el pH es la variable con mayor influencia sobre la productividad, mientras que la concentración de sustrato no tiene una influencia considerablemente significativa. En promedio se obtuvo una concentración máxima de n-butanol de 1,8 g/L. Finalmente, la cinética del proceso fue ajustada a un modelo no estructurado no segregado con un error absoluto relativo promedio de 13,79%.

* Proyecto de Grado. Modalidad: Trabajo de investigación.

** Facultad de Ingenierías Físico - Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Luis Javier López Giraldo.

ABSTRACT

TITLE: OPTIMIZATION AND KINETIC PARAMETERS SETTING FOR FERMENTATION ACETONE-BUTANOL-ETHANOL FROM CASSAVA STARCH SYRUP USING *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824*

AUTHORS: Martha Liliana Prada Blanco and Reynel Martínez Castellanos**

KEYWORDS: Acetone – Butanol – Ethanol Fermentation, cassava starch, optimization, *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824, kinetic model.

DESCRIPTION:

This study describes the results of the optimization and kinetic parameters setting for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using hydrolyzed cassava starch concentrates using the microorganism *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. To this was adopted response surface methodology applied to the experimental data and selected two of the variables that the literature reports as influencing the fermentation process: pH and substrate concentration. Initially, we carried out design experiments in order to analyze the direct influence of selected variables on the volumetric productivity of n-butanol. Performing the ANOVA, and using the response surface methodology yielded a maximum output of n-butanol from 61,975 mg/L*h for operating conditions: pH 4,29 and substrate concentration 22,07g equivalent glucose/L. ANOVA applied to the experimental data showed that the pH is the variable with the most influence on the productivity, while the substrate concentration does not influence considerably significant. On average there was maximum concentration of n-butanol to 1,8 g/L. Finally, the kinetics of the process was setting to a non-segregated unstructured model a mean absolute error relative of 13,79%.

*Degree Work. Research Mode.

** Faculty of Physics and Chemical Engineering. Chemical engineering school. Director: Ph.D. Luis Javier López Giraldo.

INTRODUCCIÓN

La producción de acetona-butanol-etanol (ABE) a partir de un microorganismo aislado fue uno de los primeros procesos microbianos industriales a gran escala para la producción de sustancias químicas, así como uno de los más importantes para el posterior desarrollo de las modernas tecnologías de los bioprocesos [1]. En la última década se ha producido un creciente interés por parte de la investigación encaminada a obtener una mayor comprensión de esta fermentación compleja e interesante, con el objetivo de desarrollar un proceso de fermentación más eficiente y competitivo [2].

Ante la inminente escasez de los combustibles fósiles, se ha incrementado el interés a nivel mundial por encontrar fuentes alternativas de energía que no agraven el problema ambiental asociado con la emisión de gases de efecto invernadero. En ese sentido, la producción de biocombustibles como el n-butanol se perfila como una solución promisoría para el suministro de energía en una sociedad cada día más exigente en lo que se refiere a las emisiones de gases contaminantes a la atmósfera [3].

En el caso de Suramérica, Colombia es el tercer productor de biocombustibles después de Brasil y Argentina, y existe un notable incremento en la producción de estos, básicamente etanol y biodiesel [4].

El n-butanol es un combustible superior al etanol en muchos aspectos ya que presenta baja volatilidad (la presión de vapor del n-butanol es 7.5 veces menor que la del etanol), mayor contenido energético (similar al de la gasolina), es menos higroscópico y corrosivo [5], y además de las aplicaciones que ofrece como combustible se puede utilizar en la fabricación de plásticos, y la extracción de sabores de alimentos.

Otra ventaja es que el n-butanol se puede obtener a partir de recursos renovables agrícolas tales como la melaza de la caña de azúcar y materiales hidrolizados provenientes del maíz, el trigo, el arroz, la yuca entre otros [1, 6]. No obstante, a lo mejor de nuestro conocimiento, ningún trabajo se ha centrado en el estudio de las fermentaciones de hidrolizados obtenidos a partir de almidón de yuca, la cual representa una buena alternativa económica como fuente de carbono para la obtención de bio alcoholes debido a su bajo costo.

La yuca ocupa un lugar destacado entre las materias primas renovables que podrían ser utilizadas para la producción de n-butanol. Ésta posee alto contenido de almidón en sus raíces el cual se transforma para obtener compuestos como la glucosa, el ácido cítrico y jarabes de glucosa [6, 7]. Además de esto, la yuca es capaz de crecer en tierras marginales con cantidades mínimas de fertilizantes, pesticidas y agua. En procesos fermentativos, se podrían emplear hidrolizados obtenidos de la yuca amarga, ya que este cultivo no compite con la canasta agroalimentaria. El denominativo de yuca amarga se debe al alto contenido de ácido cianhídrico y de cianoglucósidos presentes [7].

Colombia y en especial Santander, con su gran potencial agrícola puede hacer mejor uso de sus recursos renovables y aprovechar las ventajas que presenta, particularmente la yuca amarga para la producción de hidrolizados, y de esta manera mejorar la economía de la región.

Para la producción a escala industrial de n-butanol, principalmente por fermentación, es decisivo el tipo de microorganismo a utilizar y las condiciones de su cultivo, dado que diversos factores o variables pueden afectar el proceso. Entre estos factores se destacan principalmente el pH, la temperatura, la concentración de sustrato y la concentración de productos [8].

En general, la fermentación es un proceso biológico originado por la acción de microorganismos los cuales procesan los azúcares para obtener como productos finales alcoholes y dióxido de carbono. En el caso de la fermentación ABE, la cual

recibe este nombre dado que sus productos son acetona, butanol y etanol, la fuente de carbono suele ser glucosa y los microorganismos empleados para dicho fin son principalmente bacterias del género *Clostridium* [2,9, 42].

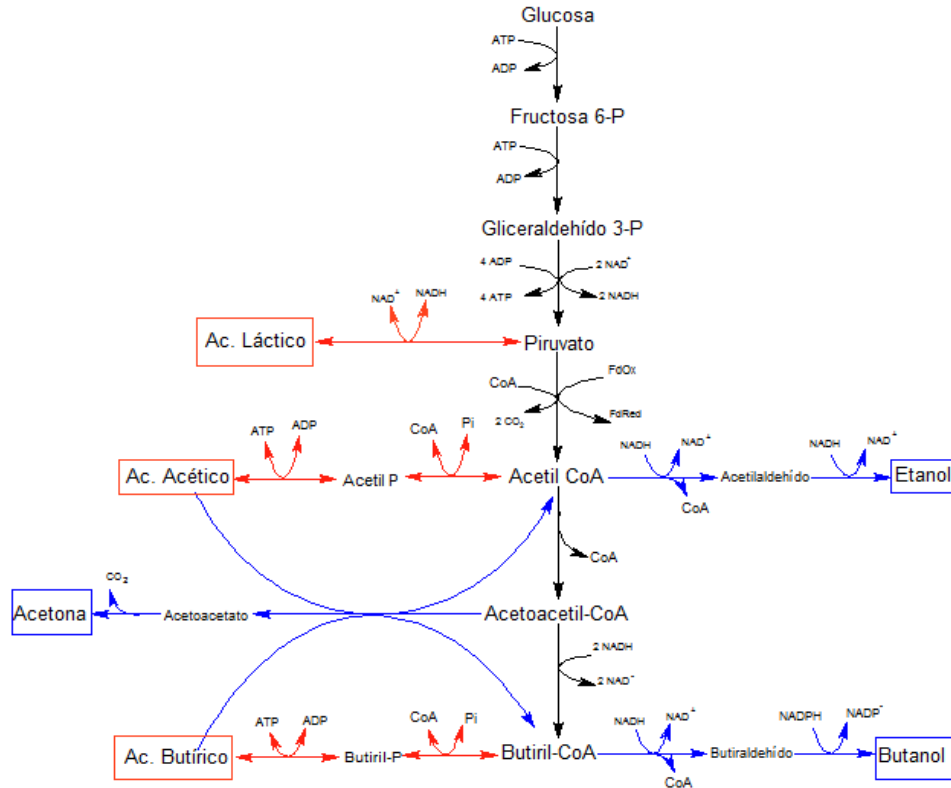
El proceso de fermentación ABE fue desarrollado por Fernbach y Strange en 1911 y rápidamente se extendió por todo el mundo durante el siglo XX. Sin embargo, este proceso desapareció a mediados del mismo siglo ya que su costo de producción dejó de ser competitivo en comparación con los procesos petroquímicos [10]. Sin embargo, los procesos de fermentación ABE utilizando cepas de *Clostridium* comienzan a recuperar la popularidad a medida que la demanda de combustibles y productos químicos de base biológica aumentan.

La ventaja de este tipo de fermentaciones microbianas es que las bacterias anaerobias tales como las del género *Clostridium* pueden fermentar una amplia gama de fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa, galactosa, celubiosa, manosa, xilosa, y arabinosa) para producir ácidos carboxílicos (acético y butírico) y disolventes tales como acetona, butanol y etanol (ABE) [9]. Las cepas más utilizadas para la producción de acetona, butanol y etanol se clasifican generalmente como *Clostridium acetobutylicum*, aunque un número de diferentes especies de *Clostridium* se reconocen actualmente, basándose principalmente en las diferencias en el tipo y la proporción de los disolventes producidos. Así *Clostridium beijerinckii* produce solventes en aproximadamente la misma proporción a la especie *acetobutylicum*, pero se produce isopropanol en lugar de acetona, mientras que *Clostridium aurantibutyricum* produce tanto acetona e isopropanol, en lugar de butanol[2].

Las bacterias del género *Clostridium* son estrictamente anaerobias [19,20], aunque debido a que estos microorganismos crecen de manera exponencial, se ha encontrado que pueden tolerar la exposición a concentraciones de oxígeno inferiores al 5% [21,22].

En la Figura 1 se muestra la ruta metabólica seguida por *Clostridium acetobutylicum* para la producción de acetona, butanol etanol.

Figura 1. Ruta metabólica de la cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 en la fermentación ABE, con glucosa como fuente de carbono



Fuente: Shinto et al., 2007 [13] Modificado por los autores

En la Figura 1 se distinguen dos fases características de este tipo de fermentación: la acidogénesis (color rojo) y la solventogénesis (color azul) [14]. Durante la acidogénesis, las células crecen exponencialmente, se producen los ácidos acético, láctico y ácido butírico y hay formación de ATP con una disminución en el pH del medio [2,13 -15]. Por otra parte, en la fase de solventogénesis, el crecimiento de las células alcanza una fase estacionaria, lo cual ocasiona que el metabolismo de los microorganismos cambie, las células son

más activas en este momento y la producción de gas alcanza su punto máximo. Los carbohidratos y los ácidos orgánicos previamente generados son reasimilados y se convierten en solventes orgánicos (acetona, butanol y etanol), con un poco de ácido acético y ácido butírico restantes como productos de menor importancia. La producción de solventes en esta etapa está generalmente acompañada por un aumento de pH en el medio de cultivo. **[2, 13- 15].**

El paso de la fase acidogénica a la solventogénica depende fuertemente del pH del medio de fermentación. Se ha sugerido que la absorción de los ácidos, normalmente acompañada por el incremento en el pH durante la producción de solventes es un proceso de desintoxicación en respuesta a la acumulación de los ácidos, lo cual resulta en condiciones desfavorables para el crecimiento del microorganismo **[12, 14].**

Como se mencionó anteriormente, la influencia del pH se reconoce como un factor clave en la determinación de los resultados obtenidos en la fermentación ABE **[1].** Por lo general, el rango de pH en el cual se presenta la formación de solventes varía dependiendo de la cepa de microorganismo y las condiciones del medio elegidas en cada caso. Se ha reportado que la cepa *C. acetobutylicum* ATCC 824 presenta buenos niveles de producción de solventes con valores de pH entre 4,2 y 5,6 **[1, 12, 16, 39].**

Por otro lado la temperatura juega un papel muy importante en la respuesta biológica del microorganismo **[17]**, y dependiendo del tipo de cepa esta puede variar su metabolismo hacia la producción de solventes. En el caso específico de la cepa *C. acetobutylicum*, se han encontrado rendimientos favorables de solventes en torno a 0,44 g/g cuando la temperatura es 37°C **[1, 14, 17- 19].**

Si bien la cepa *C. acetobutylicum* presenta la ventaja de metabolizar diferentes tipos de sustratos como glucosa, galactosa, celubiosa, manosa, xilosa y arabinosa para obtener solventes **[2, 14]**, es necesario fijar la concentración de sustrato a

alimentar puesto que la fermentación ABE presenta inhibición por sustrato lo cual conduce a baja productividad y rendimiento de solventes [13, 14, 23, 24, 31]. Estudios realizados [25] demuestran que concentraciones entre 5 y 20 g/L de glucosa sólo producen los ácidos (acético y butírico), mientras que concentraciones de glucosa entre 60 y 80 g/L posibilitan la formación de solventes [5, 14, 38]. Se reporta que para estas concentraciones de sustrato la conversión de glucosa a solventes es de un 31% aproximadamente [2, 25].

También es interesante mencionar que se han realizado fermentaciones que emplean hidrolizados de almidones provenientes de diferentes fuentes vegetales. Así por ejemplo cuando se reemplaza la fuente de carbono por hidrolizados de almidón de maíz, a una concentración equivalente en glucosa (EG) de 55 – 60 g/L, se alcanzan concentraciones de solventes hasta de 14,28 g/L [42] operando en modo continuo y empleando *C. beijerinckii*. Otro sustrato empleado es la melaza de caña de azúcar a una concentración de 77 g EG/L obteniéndose una concentración de 15,5 g/L de solventes totales [43].

El nivel inhibitorio de concentración de solventes es 20 g/L [1, 5, 11, 20], límite por encima del cual el metabolismo celular se detiene. De los tres solventes producidos, el butanol es el más tóxico, y es el único obtenido en cantidades inhibitorias durante la fermentación. Se ha reportado que la producción de solventes termina cuando la concentración de butanol alcanza alrededor de 13 g/L [2, 8, 14, 27, 28].

Básicamente, los inconvenientes se concentran en los modelos que se han propuesto para simular la cinética de conversión de sustrato, crecimiento celular y producción de butanol [2, 13]. Aunque actualmente, los rendimientos y productividades obtenidos de n-butanol son bajos, su obtención mediante microorganismos y el estudio de la ruta metabólica significa un proceso prometedor a mediano plazo [29].

Una reacción biológica real debería ser representada por un modelo segregado estructurado; sin embargo, los modelos no segregados no estructurados son usados por su simplicidad matemática y por su capacidad de representar adecuadamente un amplio conjunto de reacciones biológicas de interés. Por ello, los modelos del tipo no estructurado y no segregado son una opción empleada para describir diferentes tipos de sistemas fermentativos con un alto grado de ajuste a partir de poca información, además de ser matemáticamente más sencillos.

Considerando lo expuesto en los párrafos anteriores se concluye que para el caso específico de la fermentación ABE empleando como fuente de carbono los hidrolizados de almidón de yuca no existen precedentes en los que se determinen las condiciones que favorezcan este proceso ni lo describen desde el punto de vista cinético, por lo cual resulta interesante realizar un estudio empleando este hidrolizado como fuente de sustrato.

El presente trabajo de investigación comprende dos actividades principales, la primera consiste en determinar las condiciones óptimas de pH y concentración de sustrato para la fermentación ABE. Una vez identificados los factores e interacciones relevantes se procede a realizar el ajuste de los resultados obtenidos con las mejores condiciones, obteniendo un polinomio el cual será la función objetivo empleada para maximizar la productividad de n-butanol a partir de los hidrolizados de almidón de yuca y representar su comportamiento mediante el análisis de superficie de respuesta.

La segunda actividad, una vez encontradas las mejores condiciones, es proponer y ajustar los parámetros cinéticos ($y_{x/s}$, $y_{x/p}$, m_s , m_p , $\mu_{m\acute{a}x}$ y k_p) de un modelo matemático no segregado y no estructurado para dicha fermentación, utilizando el software Matlab versión 7.12.0 y empleando la desviación absoluta relativa para validar la capacidad de predicción de los datos experimentales.

1. METODOLOGÍA

En la Figura 2 se muestra un esquema general de cada una de las etapas comprendidas en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Figura 2. Etapas empleadas en el desarrollo del proyecto



1.1 ELECCIÓN Y DELIMITACIÓN DE INTERVALOS DE LAS VARIABLES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO FERMENTATIVO

En este trabajo se consideran para el diseño de experimentos sólo las variables pH y concentración de sustrato. La temperatura se mantiene constante e igual a 37°C ya que se ha demostrado que es la más favorable para la fermentación ABE empleando *Clostridium acetobutylicum* [1, 14,17, 19, 38,40]. La cantidad de oxígeno disuelto es controlado mediante burbujeo de nitrógeno y se mantiene constante en valores inferiores al 5%, las cuales son tolerables por el microorganismo [19, 21,22].

El intervalo de trabajo de las variables evaluadas fue fijado con base en estudios previos [1, 2, 7, 25, 28], sin embargo, el intervalo se amplió (ver tabla 1) porque en el caso específico de este trabajo se emplearon hidrolizados de almidón de yuca.

1.2 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Para establecer las condiciones óptimas que maximicen la fermentación ABE empleando hidrolizados de almidón de yuca, se realizó un diseño factorial 2^2 compuesto central rotatable + puntos centrales, empleando para su análisis la metodología de superficie de respuesta. El software utilizado fue STATGRAPHICS CENTURION 16.1 versión prueba para Windows. Los factores e intervalos estudiados fueron: pH (4,5 – 5,5) y concentración de jarabe (10–20 g equivalentes de glucosa/L). Para abreviar, se resume equivalentes de glucosa como EG. Finalmente, la variable de respuesta empleada para maximizar la fermentación de n-butanol fue la productividad volumétrica la cual se calcula empleando la ecuación 1.

$$Q_v = \frac{\text{masa de producto}}{\text{Volumen} * \text{tiempo de fermentación}} \quad \text{Ecuación 1}$$

En la Tabla 1 se muestran las variables independientes y los niveles empleados.

Tabla 1. Factores y niveles del diseño experimental

Variable	Niveles de los factores	
pH	4,5 (-1)	5,5 (+1)
Concentración de jarabe [g EG/L]	10 (-1)	20 (+1)

El diseño experimental (10 experimentos) completo se puede consultar en el anexo 1.

1.3 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO EXPERIMENTAL

A continuación se describen las etapas experimentales desarrolladas durante la ejecución de este trabajo.

1.3.1 Medios de cultivo

En las tablas 2 y 3 se muestran respectivamente las composiciones de los medios de crecimiento y fermentación. Estos medios fueron seleccionados con base en la revisión bibliográfica anteriormente realizada [6, 14, 25, 26].

Tabla 2. Composición del medio de crecimiento empleado para la fermentación ABE

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN [g/L]
Glucosa	5
Peptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	10
NaCl	10
Almidón soluble	1
Acetato de sodio	3
L-Cisteína	0,5
Resarsurina	1×10^{-3}

Tabla 3. Composición del medio de fermentación ABE - Fuente: Xiaoping, 1990 [14]

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN [g/L]
Extracto de levadura	5
KH_2PO_4	0,75
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,75
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
NaCl	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01
L-Cisteína	0,5
Hidrolizados	10-20

Los jarabes de almidón de yuca empleados como fuente de carbono agregados al medio de fermentación fueron obtenidos de la empresa santandereana Promitec.

1.3.2 Preparación del inóculo

Con el fin de asegurar la fase exponencial en el momento de inocular el microorganismo al biorreactor, se preparó un preinóculo, empleando el medio de cultivo presentado en la tabla 2. Brevemente, se prepararon 300 mL del medio de cultivo y se inoculó con 30 mL del microorganismo que se encontraba preservado en esporas a 4°C, y se llevó a una incubadora a 37°C por 24 horas. Una vez alcanzado este tiempo se tomaron 30 mL y se inoculó nuevamente en un medio de fermentación fresco de 300 mL y se dejó durante 12 horas a 37°C. El protocolo de preparación del medio de crecimiento se encuentra en el anexo 2.

1.3.3 Seguimiento del crecimiento microbiano

Cuantificación de biomasa

El método empleado para cuantificar el crecimiento microbiano (biomasa) fue el peso seco [37]. La cuantificación se hace de manera indirecta a través de la relación lineal existente entre la concentración expresada en peso seco de la biomasa y la densidad óptica medida a 600 nm (ver anexo 3). Una vez determinada dicha relación lineal se procede a cuantificar el crecimiento microbiano realizando las lecturas de densidad óptica.

Cuantificación de azúcares presentes

Inicialmente, se elimina la biomasa presente en cada una de las muestras mediante centrifugado (3500 rpm por 15 minutos a una temperatura de 5°C). Se recupera el sobrenadante y se valora la cantidad de glucosa equivalente empleando la prueba enzimática de la glucosa oxidasa (**BioSystems**) [42,43].

Brevemente, se disponen en un tubo de ensayo 2 mL del kit de glucosa oxidasa y 20 µL de la muestra analizar y/o patrón. Se espera 10 minutos y se lee la absorbancia a 500 nm. Finalmente, la concentración de glucosa en la muestra se calcula según la ecuación 2.

$$\text{Concentración de glucosa} = \frac{A.\text{muestra}}{A.\text{patrón}} * 1000$$

Ecuación 2

Donde A indica la absorbancia y las unidades de la concentración están dadas en [mg/L].

Cuantificación de metabolitos

La cuantificación de n-butanol, etanol, y acetona se realizó por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (ver anexo 4), siguiendo el procedimiento descrito por Pajuelo y colaboradores [37]. Inicialmente, se elimina la biomasa del medio mediante centrifugación siguiendo el procedimiento descrito en el numeral anterior. Seguidamente el sobrenadante obtenido es filtrado a través de un micro filtro PVDF de 0,45 µm y se guarda en viales ambar a 4°C hasta su análisis. El equipo de HPLC empleado está equipado con una columna Coregel 107H acoplada a un equipo UFLC LC 20AD, seguida de un detector de índice de refracción RID-10A. Para el análisis, la fase móvil (ácido sulfúrico 0,8 mM) es bombeada isocráticamente durante 45 minutos por cada muestra a una velocidad de flujo de 0,6mL/min y una temperatura de 80°C. A cada uno de los metabolitos se le realizó su respectiva curva de calibración (anexo 5).

1.3.3 Proceso fermentativo

Se preparan 900 ml de medio de fermentación (ver Tabla 3) y se esteriliza por 15 minutos a 121°C y 1 atmósfera. Una vez esterilizado y enfriado hasta 37 °C se procede a inocular el microorganismo en una proporción 10% (v/v). Durante el transcurso de la fermentación (48 h) la temperatura se mantuvo en 37°C con

ayuda de una manta de calentamiento y se garantizaron condiciones de anaerobiosis con burbujeo constante de nitrógeno grado 5. El control de pH se realizó utilizando hidróxido de potasio y ácido sulfúrico, ambos a una concentración de 1,5 N [15].

Las pruebas se llevaron a cabo en un biorreactor BioFlo 110 (New Brunswick Scientific Co.) de 1,3 litros, el volumen de reacción fue de 900 mL, la velocidad de agitación se estableció en 200 rpm y el modo de operación fue discontinuo. Las imágenes del montaje de las pruebas experimentales se observan en el anexo 6. El seguimiento de la fermentación fue hecho tomando muestras de 5 mL cada 3 horas. Cada una de las muestras fue refrigerada a 4°C hasta su posterior análisis en biomasa, productos y sustrato (ver sección 1.3.3).

1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A partir de los resultados de los 10 experimentos se evalúa el efecto de las variables y su interacción, aplicando el análisis de varianza ANOVA. Con este análisis se infiere si las variables tienen incidencia significativa sobre la variable de respuesta, en este caso, la productividad de n-butanol.

Una vez identificados los factores e interacciones relevantes se procede a realizar el ajuste de los resultados obtenidos con el mejor experimento, obteniéndose un polinomio el cual será la función objetivo empleada para maximizar la productividad de n-butanol a partir de jarabes de glucosa mediante el análisis de superficie de respuesta.

1.5 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Para analizar la cinética de la fermentación ABE es necesario considerar diferentes aspectos como *i)* crecimiento del microorganismo, *ii)* consumo de sustrato y *iii)* generación de productos. Dichos aspectos se representan en los modelos no estructurados y no segregados mediante las siguientes expresiones:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\frac{ds}{dt} = -q_s \cdot X \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\frac{dP}{dt} = q_P \cdot X \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde X es la concentración celular, S es la concentración de sustrato, P es la concentración de producto, y μ es la velocidad específica de crecimiento en unidades de (tiempo⁻¹) [32] q_s y q_P representan respectivamente las velocidades específicas de consumo de sustrato y formación de producto. Las expresiones matemáticas para estas últimas están dadas a continuación.

$$q_s = \frac{\mu}{y_{x/s}} + \frac{q_P}{y_{P/x}} + m_s \quad \text{Ecuación 6}$$

$$q_P = \mu \cdot y_{P/x} + m_P \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde $y_{x/s}$ y $y_{P/x}$ son los rendimientos teóricos biomasa-sustrato y producto-biomasa respectivamente, ambos en unidades de (masa/masa). Los parámetros m_P y m_S son las constantes de mantenimiento celular y la constante específica de formación de producto debido a la actividad celular, respectivamente [46].

Los modelos no segregados y no estructurados consideran la velocidad específica de crecimiento μ como función de las condiciones del microorganismo (sólo variables externas a la célula). Algunos de estos modelos se pueden ver en la tabla 4.

Tabla 4. Modelos cinéticos de crecimiento celular.

Autor	Modelo
Monod, 1949	$\mu_x = \mu_{x_{max}} \cdot \frac{S}{K_S + S}$
Moser, 1957	$\mu_x = \mu_{x_{max}} \cdot \frac{S^n}{K_S + S^n}$
Contois, 1959	$\mu_x = \mu_{x_{max}} \cdot \frac{S^n}{K_C \cdot X + S} = \mu_{max} \cdot \frac{1}{\frac{K_C \cdot X}{S} + 1}$
Powell, 1967	$\mu_x = \mu_{x_{max}} \cdot \frac{(K + L + S)}{2 \cdot L} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4 \cdot L \cdot S}{(K + L + S)^2}} \right]$
Chen & Hashimoto, 1978	$\mu_x = \mu_{x_{max}} \cdot \frac{S/S_1}{K + \frac{(1-K) \cdot S}{S_1}}$
Bergter, 1983	$\mu_x = \mu_{x_{max}} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot [1 - \exp(-t/T)]$
Misdörffer, 1991	$\mu_x = \mu_{x_{max}} \cdot \frac{S^n}{S^n \cdot (1 + K_b \cdot G_s \cdot S^n)}$

Fuente: Cadavid. K., Medina, R. [47]

En esta etapa se analizan los perfiles de biomasa, sustrato y producto con el fin de proponer un modelo que describa el proceso fermentativo. Seguidamente se ajustan los parámetros $y_{x/s}$, m_s , $y_{x/p}$ y m_p mediante linealización de las ecuaciones 4 y 5. Luego, el modelo ajustado se integra empleando la herramienta ODE45 del software MATLAB (MathWorks) versión 7.12.0. Finalmente, los parámetros $Y_{x/s}$, k_s y μ_m , se optimizan empleando la función `fmincon` [44].

El error de ajuste se calcula empleando la ecuación 8.

$$Error = \sum_{i=1}^n \left| \frac{valor\ experimental - valor\ teórico}{valor\ experimental} \right| * 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.1 INFLUENCIA DEL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO EN EL PROCESO FERMENTATIVO

En las figuras 3 a 6 se observa el comportamiento típico de la evolución de la concentración de metabolitos, sustrato y biomasa en el proceso fermentativo.

Figura 3. Comportamiento cinético de los solventes en función del pH y la concentración inicial de sustrato

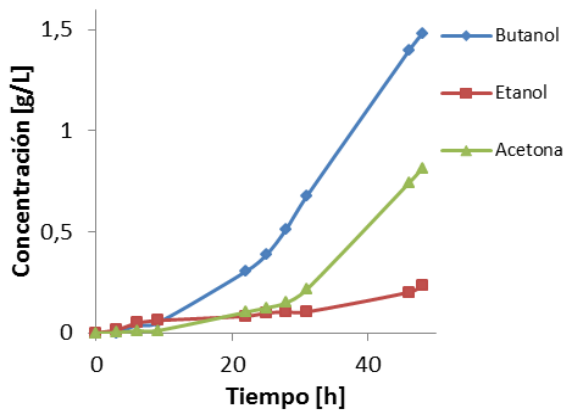


Figura 4. Comportamiento cinético de los ácidos en función del pH y la concentración inicial de sustrato

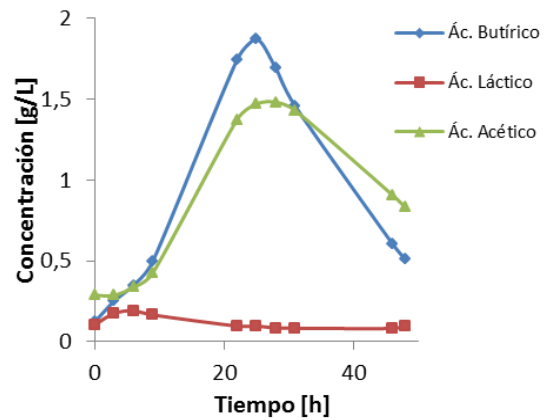


Figura 5. Comportamiento cinético del sustrato en función del tiempo

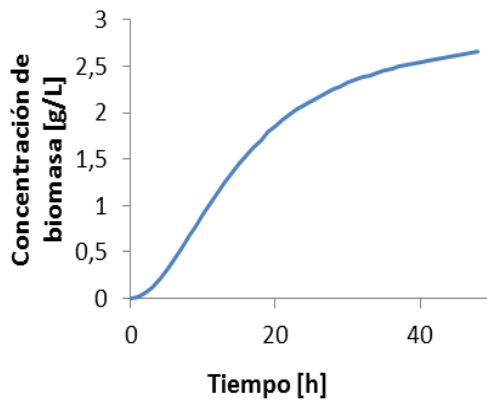
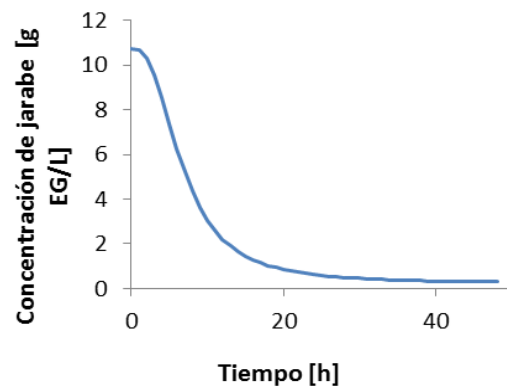


Figura 6. Comportamiento cinético de la biomasa en función del tiempo



Las figuras mostradas, son una representación de la tendencia típica observada en los 10 experimentos. En las Figuras 3 y 4 se puede ver como el metabolito de interés (n-butanol) se produce tan pronto se alcanza una concentración de ácido butírico de aproximadamente 1,8 g/L. Después, la concentración de ácido butírico disminuye a medida que la de n-butanol aumenta. Esta observación concuerda con lo reportado por varios autores quienes explican que la ruta metabólica pasa primero por una etapa acidogénica (formación de ácidos) y finalmente la célula reasimila los ácidos para formar los solventes [2, 13 -15].

En la Figura 5 se observa un marcado descenso en la concentración de sustrato a medida que transcurre el tiempo de la fermentación, esto debido a la asimilación del mismo por parte del microorganismo. Cabe anotar que en la mayoría de los experimentos se alcanza una estabilidad en un tiempo cercano a las 22 horas, momento en el cual, aproximadamente el 92% del sustrato se ha consumido.

La figura 6 muestra un comportamiento característico del crecimiento de una cepa microbiana. La cual se caracteriza por tener una prolongada fase de crecimiento exponencial, aproximadamente de 16 horas, lo que provoca un mayor consumo de sustrato como se explicó anteriormente.

Los resultados de cada uno de los experimentos se resumen en la tabla 5. Para la construcción de la tabla se consideró como información relevante los rendimientos experimentales observados para los solventes y la biomasa al final de las 48 horas.

Tabla 5. Rendimientos observados de solventes y biomasa

pH	Concentración de jarabe [g EG /L]	Y _{But/sustrato}	Y _{Et/sustrato}	Y _{Ace/sustrato}	Y _{Biomasa/sustrato}	Y _{ABE/sustrato}
4,5	10	0,107	0,011	0,053	0,185	0,178
4,5	20	0,081	0,012	0,041	0,134	0,136
5,5	10	0,073	0,024	0,066	0,172	0,263
5,5	20	0,017	0,021	0,003	0,094	0,041
5,0	15	0,082	0,017	0,032	0,099	0,131
5,0	15	0,086	0,021	0,026	0,111	0,133
4,29	15	0,096	0,010	0,063	0,094	0,169
5,7	15	0,031	0,029	0,004	0,139	0,063
5,0	7,93	0,109	0,035	0,042	0,183	0,187
5,0	22,07	0,011	0,015	0,005	0,064	0,031

Desafortunadamente, la comparación de los rendimientos experimentales con resultados anteriores no es posible ya que, a lo mejor de nuestro conocimiento, no hay trabajos en los que se emplee hidrolizados de almidón de yuca como fuente de carbono. No obstante, al comparar con fermentaciones ABE que emplean como fuente de carbono (i) hidrolizados de maíz ($y_{ABE/S} = 0,41$), (ii) melaza de caña ($y_{ABE/S}=0,42$) y (iii) glucosa ($y_{ABE/S} = 0,44$), los rendimientos de solventes totales son aproximadamente 3 veces menores que los reportados para las fuentes de carbono mencionadas con anterioridad [42, 43, 48]. Estos bajos rendimientos pueden estar asociados con el hecho que los hidrolizados de almidón de yuca son una mezcla maltodextrinas y de azúcares de 5 y 6 átomos de carbono. Así mismo, se ha reportado que *C. acetobutylicum* tiene preferencia por los azúcares de 6 carbonos y en consecuencia no todo el hidrolizado de almidón de yuca está disponible para su asimilación. En consecuencia, los cálculos de rendimiento pueden estar subestimados.

Conociendo las concentraciones de n-butanol se procedió a calcular las productividades volumétricas para cada experimento, obteniendo así los máximos locales de productividad en cada caso. Tales productividades se observan en la Tabla 6.

Tabla 6. Productividades volumétricas de n-butanol a diferentes condiciones

pH	Concentración de jarabe [g EG /L]	Productividad volumétrica Q_v [g/L*h] $\times 10^{-3}$
4,5	10	23,9
4,5	20	31,8
5,5	10	23,1
5,5	20	7,6
5,0	15	8,1
5,0	15	8,6
4,29	15	29,1
5,7	15	11,6
5,0	7,93	19,9
5,0	22,07	10,8

Una vez analizado el comportamiento dinámico de la fermentación, es conveniente determinar las condiciones de la fermentación que favorezcan la producción de n-butanol. A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza (ANOVA) empleado para determinar dichas condiciones.

2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez calculadas las productividades de n-butanol se evaluó el efecto de las variables pH y concentración de sustrato y su interacción, aplicando el análisis de varianza ANOVA (ver Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza ANOVA

<i>Factores</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	309,367	1	309,367	39,00	0,0034
B:Concentración	52,3727	1	52,3727	6,60	0,0620
AA	220,017	1	220,017	27,74	0,0062
AB	136,89	1	136,89	17,26	0,0142
BB	90,0187	1	90,0187	11,35	0,0281
Error total	31,7289	4	7,93222		
Total (corr.)	762,385	9			

De acuerdo con el valor P se infiere que la variable pH, y las interacciones pH-pH, pH-concentración y concentración-concentración tienen incidencia significativa sobre la productividad de n-butanol con un nivel de confianza del 95%. Por otro lado, la variable concentración por sí sola no presenta incidencia significativa. Este resultado puede explicarse considerando que las concentraciones de jarabe empleadas en este trabajo son 6 veces menores a las empleadas en trabajos similares (esta situación no pudo corregirse debido a que no se disponía de hidrolizados de almidón con concentraciones superiores a 25 g EG/l). En el anexo 7 se aprecia el diagrama de Pareto que confirma lo anteriormente dicho.

Empleando el software Statgraphics Centurion 16.1 se determinaron las condiciones más favorables que maximizan la productividad volumétrica de n-butanol (ver Tabla 8)

Tabla 8. Condiciones óptimas que maximizan la productividad de n-butanol

<i>meta</i>	<i>Maximizar productividad volumétrica [mg/L*h]</i>		
<i>Valor óptimo</i>	61,9759		
<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
pH	4,29289	5,70711	4,29289
Concentración de sustrato [gEG/L]	7,93	22,07	22,07

El análisis anterior indica que las mejores condiciones para maximizar la productividad de n-butanol están dadas para valores de pH de 4,29 y concentraciones de jarabe de 22,07gEG/L. Una posible hipótesis de este comportamiento obedece a que a valores bajos de pH se ve favorecida la fase acidogénica y por ende hay mayor producción de ácidos, los cuales más adelante se reasimilan para producir los solventes y en consecuencia la productividad tiende a tomar valores más altos.

Una vez identificadas las mejores condiciones y los factores e interacciones relevantes se procedió a realizar el ajuste de los resultados experimentales empleando un polinomio (ecuación 9).

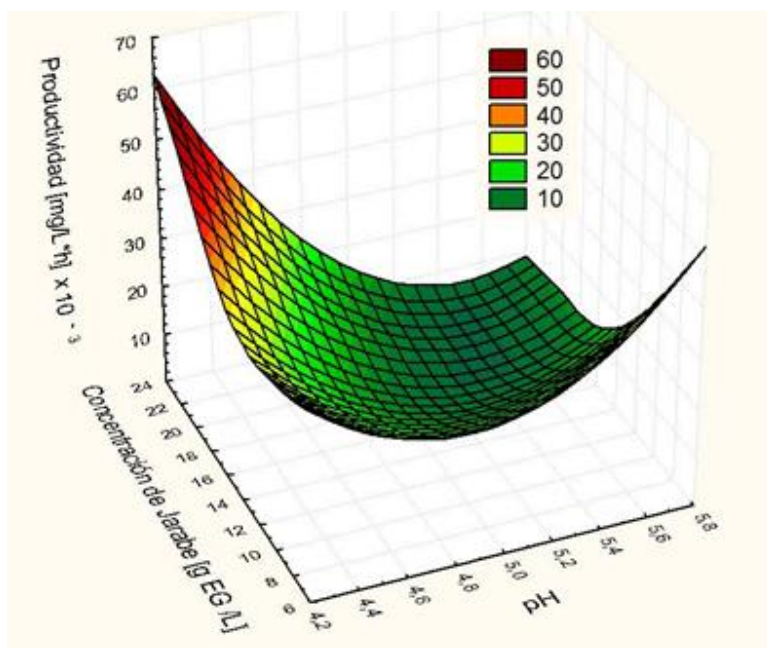
$$Q_v = 636,393 - 254,835 * pH + 27,7497 * pH^2 - 0,00234 * pH * Concentración + 1,7749 \times 10^{-7} * Concentración^2$$

Ecuación 9

El ajuste polinómico (ecuación 9) tiene un R² del 95,84%, lo que indica que el modelo es capaz de explicar la variación de la productividad con ese porcentaje de exactitud.

Haciendo uso de la función objetivo (Ecuación 9) se pudo representar el comportamiento de la productividad través de una gráfica de superficie de respuesta (Figura 7) la cual muestra la influencia de los factores (pH y concentración de sustrato) y sus niveles sobre la productividad.

Figura 7. Superficie de respuesta estimada para la productividad



En la figura 7 se aprecia que los valores de productividad para las condiciones encontradas siguen en aumento (con respecto a la concentración inicial de sustrato) y no se alcanza un máximo global, esto debido a que las concentraciones de sustrato empleadas fueron menores a 60 g EG/L, valor reportado como favorable para maximizar esta variable. Por otro lado, también se aprecia que los valores de pH comprendidos entre 4,5 – 5,2 conducen a un mínimo de productividad de n-butanol.

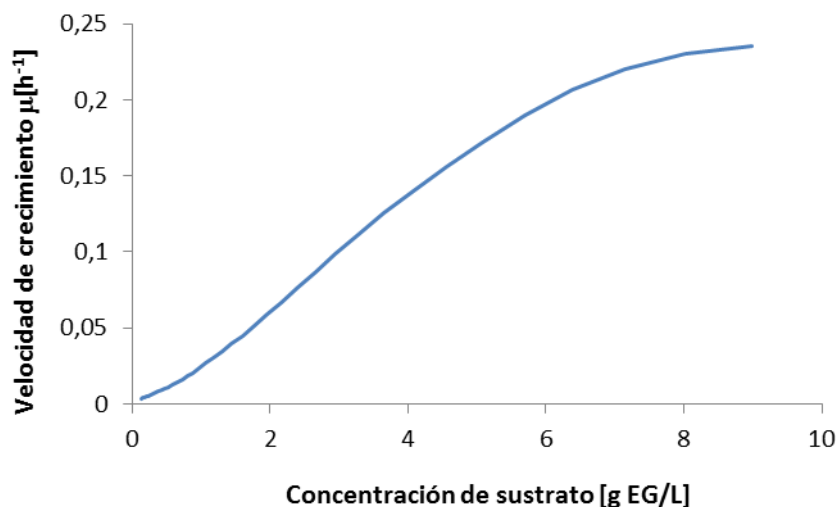
Los valores de productividad encontrados en la literatura para el mismo proceso, empleando hidrolizados de maíz y melaza de caña están en un intervalo de 0,35 a 0,42 [g/L·h]. Comparando estas cifras con la productividad obtenida a las mejores condiciones en este trabajo(0,0619 [g/L·h]) se observa que este valor es aproximadamente 6 veces menor que el obtenido con otros hidrolizados. No obstante, esta situación podría superarse ampliando el rango de la concentración inicial de sustrato.

Fue interesante comparar los resultados con un estudio previo realizado al interior nuestro grupo de investigación que utilizó la misma cepa pero con glucosa como fuente de carbono [48]. En dicho estudio empleando 40 g/L de glucosa se obtuvo una productividad volumétrica de n-butanol de 0,133 [g/L*h]. Al comparar los valores se observa que el cociente entre la productividad empleando glucosa y empleando hidrolizados de almidón de yuca es de 2,14. Sobresale que la relación obtenida coincide con la relación existente entre las cantidades de sustrato inicial empleadas en cada estudio (40 [g/L]/20 [gEG/L]). Este resultado sustenta la afirmación hecha con anterioridad en la cual se plantea que al aumentar la concentración de hidrolizados se puede aumentar la productividad.

2.3. AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS A UN MODELO NO ESTRUCTURADO, NO SEGREGADO

Una vez encontradas las condiciones que maximizan la productividad volumétrica de n-butanol se procedió según lo descrito en la metodología (ver sección 1.5). Primero se determinó el tipo de modelo que relaciona la velocidad específica de crecimiento celular (μ) con la concentración de sustrato. La velocidad de crecimiento punto a punto se calculó utilizando la ecuación 3.

Figura 8. Velocidad específica de crecimiento Vs. Concentración de jarabe de almidón de yuca a condiciones óptimas

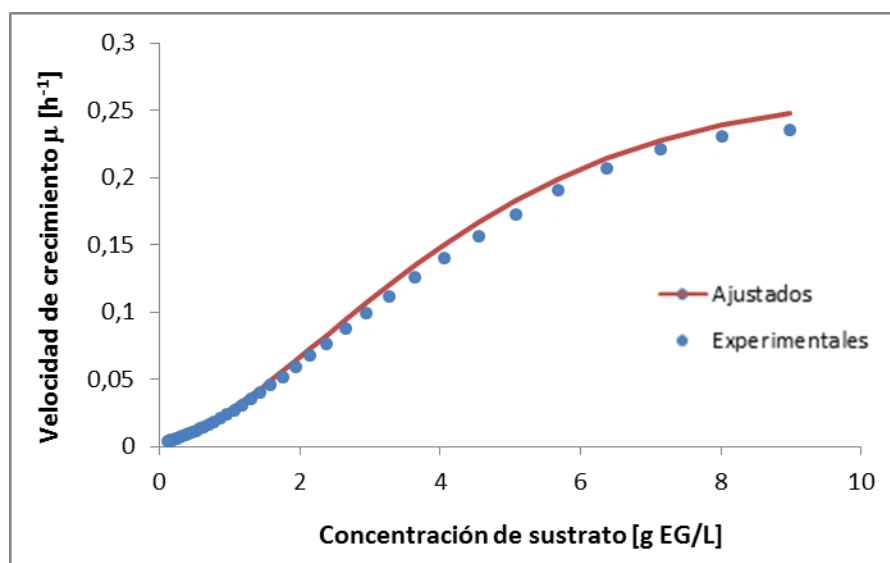


En la Figura 8 se observa claramente que el crecimiento microbiano sigue un comportamiento que puede ser descrito por el modelo de Monod. En la tabla 4 se observa la ecuación que representa dicho modelo, donde μ_m indica la velocidad específica de crecimiento máxima [h^{-1}], K_S es la constante cinética de sustrato o constante de Monod [g/L] y S es la concentración de sustrato [g EG/L].

Los valores calculados de los parámetros μ_m y K_S para el modelo empleado se resumen en la tabla 9.

Una vez calculados los parámetros se procedió a graficar el modelo ajustado con la velocidad específica de crecimiento (μ) versus la concentración de sustrato (S) para así analizar el grado de ajuste del mismo (figura 9). El modelo ajustado tiene un error relativo de $3,51E-5$, lo que indica que el modelo predice muy bien los datos experimentales y reafirma que la tendencia puede ser descrita por el modelo de Monod.

Figura 9. Modelo de Monod ajustado para la velocidad de crecimiento



Se planteó un sistema de ecuaciones diferenciales que describe la variación de biomasa, sustrato y n-butanol (Ecuaciones 3 – 7)

Los valores cinéticos ajustados se resumen en la tabla 9.

Parámetros cinéticos ajustados						
$y_{X/S}$	$y_{\text{butanol}/X}$	$m_S[\text{g/g}\cdot\text{h}]$	$m_P[\text{g/g}\cdot\text{h}]$	$\mu_m[\text{h}^{-1}]$	$K_S[\text{g/L}]$	% Error promedio relativo
0,1887	0,4907	0,0006	0,0304	0,6517	0,0257	13,79

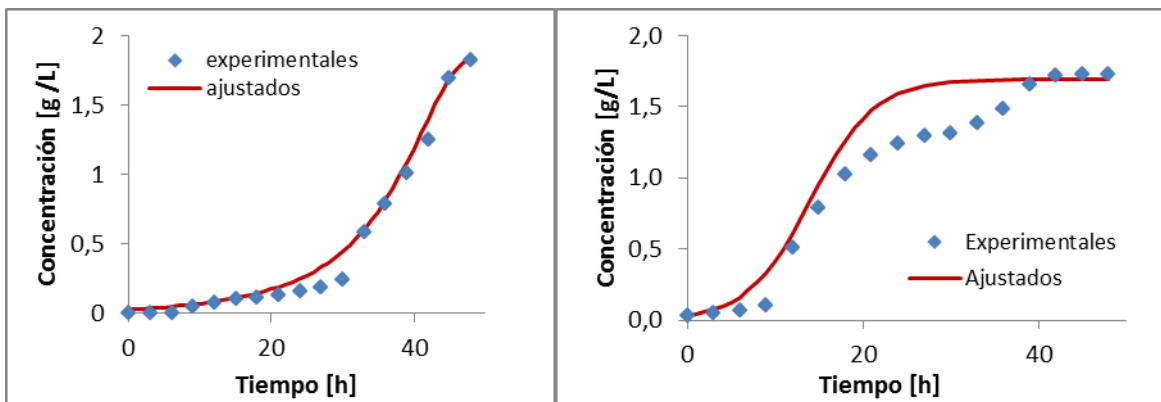
Tabla 9. Valores de los parámetros cinéticos calculados

Con el fin de evaluar el desempeño del proceso, se calcularon los rendimientos alcanzados experimentalmente a condiciones óptimas y se compararon con los rendimientos teóricos presentados en la tabla 9. Los valores experimentales de $y_{X/S}$ y $y_{\text{butanol}/X}$ son respectivamente 0,083 y 0,093. Al comparar estos rendimientos con los ajustados por el modelo se observa que los experimentales son menores, como era de esperarse ya que el sustrato alimentado se emplea tanto para

mantenimiento celular (como lo indica el parámetro m_s) como para la formación de producto (m_p).

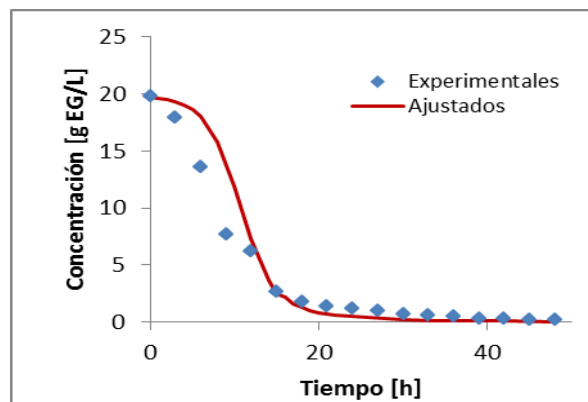
Finalmente, una vez ajustados los parámetros, se integran las ecuaciones diferenciales (ecuaciones 3-7), empleando el modelo de crecimiento celular de Monod. En la figura 10 se muestran los perfiles de concentración de n-butanol, biomasa y sustrato ajustados por el modelo cinético.

Figura 10. Perfiles de concentración de **a)** n-butanol, **b)** biomasa y **c)** sustrato, para el modelo cinético optimizado.



a.

b.



c.

En la figura 10, se puede observar que el perfil de a) n-butanol, b) biomasa y c) consumo de sustrato, obtenidos a partir del modelo cinético ajustado, describen la tendencia de los datos experimentales y además error relativo promedio del modelo es de 13,79% (ver Tabla 9). Se evidencia en el perfil de biomasa una tendencia típica de crecimiento celular, en el perfil de sustrato la concentración decrece continuamente con el tiempo y en el perfil de n-butanol se muestra una tendencia creciente con el tiempo, común en este tipo de procesos fermentativos.

3. CONCLUSIONES

Al emplear hidrolizados de almidón de yuca se confirmó este tipo de materia prima puede ser empleado como sustrato en fermentaciones ABE. Con lo anterior se amplía el espectro de posibilidades de uso para esta materia prima ampliamente cultivada en la región oriental de Colombia.

Se determinó que las condiciones óptimas para llevar a cabo el proceso fermentativo de n-butanol a partir de hidrolizados de almidón de yuca son: pH de 4,29 y concentración de sustrato de 22,07 g EG /L obteniendo un máximo de productividad volumétrica de 61,9759 mg/L*h, cumpliendo de esta manera con el principal objetivo de este proyecto y aportando un estudio preliminar para esta fuente de carbono la cual no se había empleado anteriormente.

Se logró por medio de un modelo no segregado y no estructurado describir la cinética de crecimiento microbiano del proceso fermentativo, ajustando los parámetros y obteniendo un error promedio del ajuste de 13,79%.

4. RECOMENDACIONES

Para futuras experimentaciones se recomienda utilizar hidrolizados con concentraciones mayores de sustrato y analizar si es posible aumentar la productividad de metabolitos.

El modelo ajustado en este estudio fue la mejor aproximación encontrada para los perfiles de concentración en el intervalo de condiciones expuestas. Su ajuste fue realizado a través de un modelo no segregado y no estructurado de mediano nivel de complejidad. Se sugiere realizar un escalado del proceso de producción de n-butanol a partir de jarabes de almidón de yuca empleando este modelo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ANAYA, F. “Obtención de Jarabes de Glucosa a Partir de Almidón de Yuca Mediante Hidrólisis Ácida Asistida por Microondas”. Bucaramanga, 2004. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de química.
- [2] BAER, S., BLASCHEK, H., SMITH, T. “Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*”. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987. Vol. 53, No. 12, p. 2854 – 2861.
- [3] BAHL, H., ANDERSCH, W., KONSTANTIN B., GOTTSCHALK, G. “Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture”. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1982. Vol. 14, No. 1, p. 17–20.
- [4] BEREZINA, O., SINEOKY, S., VELIKODVORSKAYA, G., SCHWARZ W., ZVERLOV, V. “Extracellular glycosyl hydrolase activity of the *Clostridium* strains producing acetone, butanol and ethanol”. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008. Vol. 44, No. 1, p. 41–47.
- [5] CADAVID, K., MEDINA, R. “Selección y ajuste de un modelo cinético para la fermentación alcohólica de hidrolizados de residuos deslignificados de caña de azúcar utilizando un microorganismo nativo”. Tesis de pregrado. Universidad del Valle. Facultad de ingeniería. Escuela de ingeniería química.
- [6] DORAN, P., *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Acribia S.A. 1998. Capítulo 4.

- [7] Energy Information Administration. International Energy Statistics. Documento electrónico [<http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/IEDIndex3.cfm?tid=79&pid=79&aid=1>]. Última consulta: 27/04/2013.
- [8] EZEJI, T., BLASCHEK, H., QURESHI, N. "Industrially Relevant Fermentations". Handbook on Clostridia. *Chapter 36*. CRC, Press 2005.
- [9] EZEJI, T., MILNE, C., PRICE, N. "Achievements and Perspectives to Overcome the Poor Solvent Resistance in Acetone and Butanol–Producing Microorganisms". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. Vol. 85, No. 6, p. 1697 – 1712.
- [10] EZEJI, T., QURESHI, N., BLASCHEK, H. "Bioproduction of Butanol from Biomass: from Genes to Bioreactors". *Current Opinion in Biotechnology*. 2007. Vol. 18, No. 3, p. 220 -227.
- [11] EZEJI, T., QURESHI, N., BLASCHEK, H. "Continuous Butanol Fermentation and Feed Starch Retrogradation: Butanol Fermentation Sustainability Using *Clostridium beijerinckii* BA101". *Journal of Biotechnology*. 2005. Vol. 115, No. 2, p. 179 – 187.
- [12] EZEJI, T., QURESHI, N., BLASCHEK, H. "Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and *Clostridium beijerinckii*". *Process biochemistry*. 2007. Vol. 42, No. 2, p. 34 – 39.
- [13] FUCIÑOS, V., PALLARES, A. "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". Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de ingenierías físico – químicas. Escuela de ingeniería química.
- [14] GARCÍA, V. et al. "Challenges in Biobutanol Production: How to Improve the Efficiency?" *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2011. Vol. 15, No.2, p. 964 – 980.

- [15] GHESHLAGHI, R., SCHARER, J., YOUNG, M., CHOU, C. "Metabolic Pathways of Clostridia for Producing Butanol". *Biotechnology Advances*. 2009. Vol. 27, No. 6, p. 764 – 781.
- [16] GREASHAM, R. *Media for Microbial Fermentations*. Biotechnology. 1993. Chapter 7, p. 128-137.
- [17] HOLT, R., STEPHENS, G., MORRIS, G. "Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH". *Applied and Environmental Microbiology*. 1984. Vol. 48, No. 6, p. 1166 – 1170.
- [18] HONG, V., KANDA, K., HOBAYASHI, G. "Production of Acetone- butanol – Ethanol (ABE) in Direct Fermentation of Cassava by *Clostridium saccharoperbutyl acetonicum* N 1-4". *Applied Biochemical and Biotechnology*. 2010. Vol. 161, No.8, p. 157 – 170.
- [19] HUANG, W., RAMEY, D., YANG, S. "Continuous Production of Butanol by *Clostridium acetobutylicum* Immobilized in a Fibrous Bed Bioreactor". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004. Vol. 115, No. 1-3, p. 887 -898.
- [20] JANG, Y., MALAVIYA, A., CHO, C., LEE, J. "Butanol Production from Renewable Biomass by Clostridia". *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 123, No. 11, p. 653 – 663.
- [21] JESSE, T., EZEJI, T., QURESHI, N., BLASCHEK, H. "Production of Butanol from Starch-Based Waste Packing Peanuts and Agricultural Waste". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002. Vol. 29, No. 2, p. 117 – 123.
- [22] JONES, D., WOODS, D. "Acetone–Butanol Fermentation Revisited". *Microbiological Reviews*. 1986. Vol. 50, No. 4, p. 484–524.
- [23] KIM, W., EOM, M., LEE, S. CHOI, J. "Kinetic Study of Metabolic Pathways in *Clostridium acetobutylicum*". *Advanced Control of Chemical Processes*. 2012. Vol. 8, No. 1, p. 958 – 963.

- [24] LEE, J. et al. "Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for Isopropanol-Butanol-Ethanol Fermentation". *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. Vol. 78, No. 5, p. 1416 – 1423.
- [25] LEE, S., PARK, J., JANG, S., NIELSEN, L. KIM, J., JUNG, K. "Fermentative Butanol Production by Clostridia". *Biotechnology and Bioengineering*. 2008. Vol.101, No.2, p. 209-210.
- [26] LEPAGE, C., FAYOLLE, F., HERMANN, M. "Changes in Membrane Lipid Composition of *Clostridium acetobutylicum* during Acetone-Butanol Fermentation: Effects of Solvents, Growth Temperature and pH". *Journal of General Microbiology*. 1987. Vol. 133, No. 12, p. 103 – 110.
- [27] LIZCANO, V., GAMBOA, J. "Estudio de la fermentación del glicerol crudo para la obtención de ácido láctico empleando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: propuesta preliminar de un modelo cinético". Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de ingenierías físico – químicas. Escuela de ingeniería química.
- [28] MAO, S. et al. "Proteome Reference Map and Comparative Proteomic Analysis between a Wild Type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its Mutant with Enhanced Butanol Tolerance and Butanol Yield". *Journal of Proteome Research*. 2010. Vol. 9, No. 6, p. 3046 – 3061.
- [29] MONOT, F., ENGASSER, J., PETITDEMANGE, H. "Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1984. Vol. 19, No. 6, p. 422 – 426.
- [30] MONOT, F., MARTIN, J., PETITDEMANGE, H., GAY, R. "Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium". *Applied and Environmental Microbiology*. 1982. Vol. 44, No. 6, p. 1318 – 1324.

- [31] MONTOYA, D., SIERRA, J., SILVA, E. "Optimización de un medio de cultivo industrial para la fermentación acetobutílica ABE". Revista colombiana de biotecnología. 2005. Vol. 7, No. 1. p. 37 – 42.
- [32] NAIK, S., GOUD, V., ROUT, P. "Production of first and Second Generation Biofuels: a Comprehensive Review". Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010. Vol. 14, No. 2, p.578 – 597.
- [33] NAJAFPOUR, G. Biochemical Engineering and Biotechnology. Amsterdam: Elsevier. 2007. Chapter 5, p. 81 – 130.
- [34] NI, Y., SUN, Z. "Recent Progress on Industrial Fermentative Production of Acetone- Butanol- Ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China". Applied Microbiology and Biotechnology. 2009. Vol. 83, No. 3, p. 415 – 423.
- [35] O'BRIEN, R., MORRIS, J. "Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*". Journal of General Microbiology. 1971. Vol. 68, p. 307– 318.
- [36] PAJUELO, M. et al. "Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the Industrial Production of 1,3-propanediol from Glycerol". Metabolic Engineering. 2005. Vol. 7, No. 5 – 6, p. 329 – 336.
- [37] PÄKKILÄ, J., HILLUKKALA, T., MYLLYKOSKI, L., KEISKI, R. "An Anaerobic Bioreactor System for Biobutanol Production". Energy Research. 2009. p. 17 -20.
- [38] PAPOUTSAKIS, E. "Engineering solventogenic clostridia". Current Opinion in Biotechnology. 2008. Vol. 19, No. 5, p. 420–429.
- [39] QURESHI, N., LOLAS, A., BLASCHEK, H. "Soy Molasses as Fermentation Substrate for Production of Butanol Using *Clostridium beijerinckii* BA101". Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2001. Vol. 26, No. 5, p. 290 – 295.
- [40] QURESHI, N., MADDOX, I. "Continuous Production of Acetone- Butanol- Ethanol Using Immobilized Cells of *Clostridium acetobutylicum* and Integration with

- [41] Product Removal by Liquid-Liquid Extraction”. Journal of Fermentation and Bioengineering. 1995. Vol. 80, No. 2, p. 185 – 189.
- [42] RAJCHENBERG, E., RODRIGUEZ, J., JUÁREZ, K. “Producción microbiológica de Butanol”. Biotecnología. 2009. Vol. 13 No. 3, p. 26-37.
- [43] SCHMIDELL, W., AQUARONE, E. et al. Biotecnología industrial. Brasil: EdagarBlücher. 2001, p. 93-115, 137-147.
- [44] SELMER, T., “Anoxic Testing and Purification of Enzymes”. Handbook on Clostridia. Chapter 5. CRC, Press 2005.
- [45] SHINTO, H., TASHIRO, Y., YAMASHITA, M., KOBAYASHI, G., SEKIGUCHI, T., HANAI, T., KURIYA, Y., OKAMOTO, M., SONOMOTO, K. “Kinetic modeling and sensitivity analysis of Acetone-Butanol-Ethanol production”. Journal of Biotechnology. 2007. Vol. 131, No. 1, p. 45–56.
- [46] SHULER, M., KARGI, F. Brock: Bioprocess Engineering Basic Concepts. Prentice Hall PTR, Segunda Edición. Capítulo 6.
- [47] SOMRUTAI, W., TAKAGI, M., YOSHIDA, T. “Acetone-Butanol Fermentation by *Clostridium aurantibutyricum* ATCC 17777 from a Model Medium for Palm Oil Mill Effluent”. Journal of Fermentation and Bioengineering. 1996. Vol. 81, No. 6, p. 543 – 547.
- [48] SUN, Z., LIU, S. “Production of n-Butanol from Concentrated Sugar Maple Hemicellulosic Hydrolysate by *Clostridia acetobutylicum* ATCC824”. Biomass and Bioenergy. 2012. Vol. 39, No. 4, p. 39 – 47.
- [49] YANG, X. “A Novel Extractive Fermentation for the Production of Acetone – Butanol by *Clostridium acetobutylicum*”. Estados Unidos, 1990. Tesis Doctoral. Purdue University. Graduate School.

ANEXOS

Anexo A. Resultados del diseño factorial 2^2 compuesto central rotatable + puntos centrales

Experimento	pH	Concentración de jarabe [g eg/l]
1	4,5	10
2	4,5	20
3	5,5	10
4	5,5	20
5	5,0	15
6	5,0	15
7	4,29	15
8	5,7	15
9	5,0	7,93
10	5,0	22,07

Anexo B. Protocolo de preparación del medio de crecimiento

Para la preparación del inóculo se requieren las cantidades suministradas en la tabla 1. Teniendo los reactivos necesarios se procede de la siguiente manera:

1. Se pesan todos los reactivos y se adicionan en un vaso de precipitado excepto la L-Cisteína y la resarsurina.
2. Se calienta y se agita agregando agua destilada hasta el volumen deseado.
3. Se prepara la solución de resarsurina pesando 1 mg por litro de solución.
4. Se agrega la resarsurina previamente preparada, 1 mL de solución por 1000 mL de medio.
5. Se espera a que se caliente sin dejar ebullición.



6. Se introduce el vaso, la cisteína previamente pesada, las botellas, corchos, agrafes y agrafadora en la cámara de anaerobiosis.



7. Se hace vacío con ayuda de la bomba y se abre la válvula de nitrógeno.
8. Se burbujea nitrógeno en el medio y se agrega la cisteína.
9. Se agita y se embotella.
10. Se procede a agrafar las botellas y se retiran de la cámara.
11. Se llevan las botellas al autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121°C y 1 atm de presión.

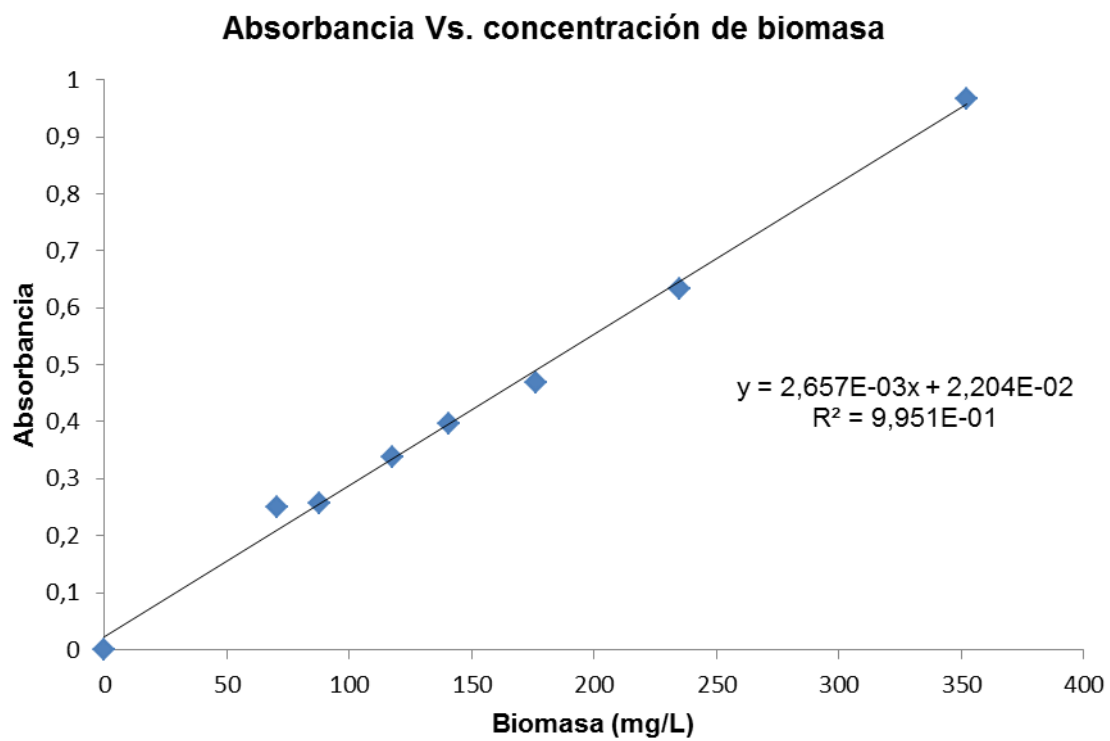


12. Pasado el tiempo de esterilización, se retiran las botellas del autoclave, se dejan atemperar y luego se refrigeran a 4°C.

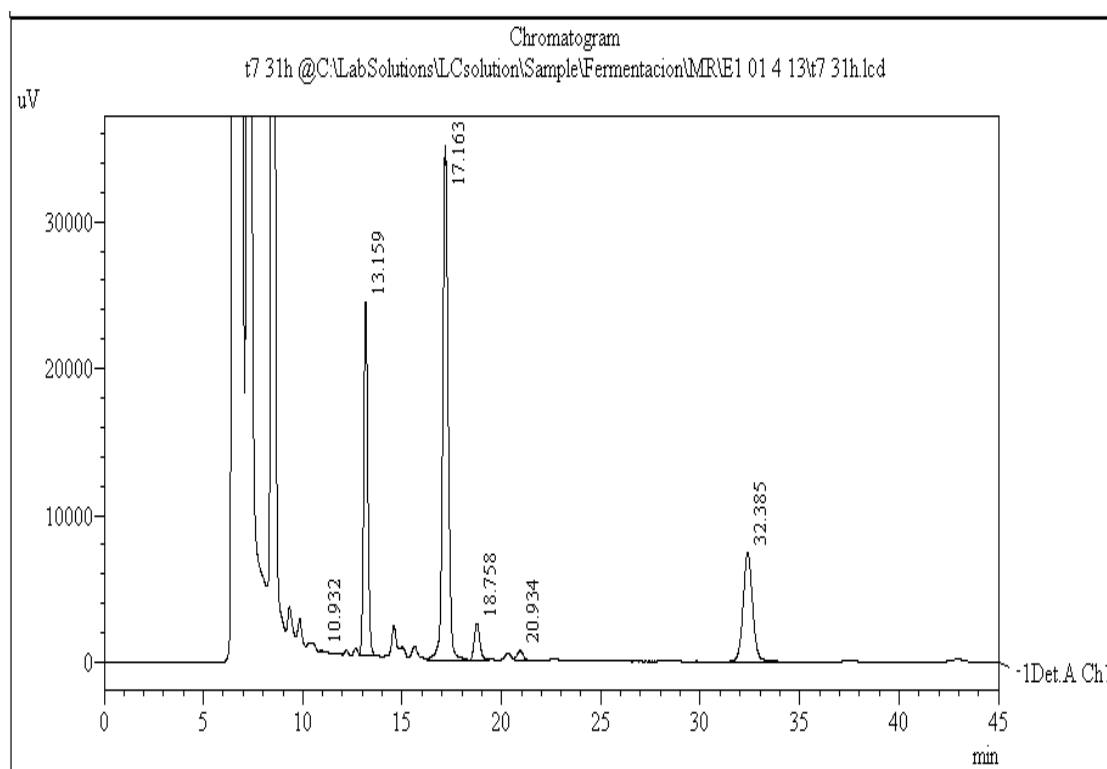


Medio de crecimiento sin microorganismo (izquierda) y con microorganismo (derecha)

Anexo C. Curva de calibración para la cuantificación de biomasa – método del peso seco



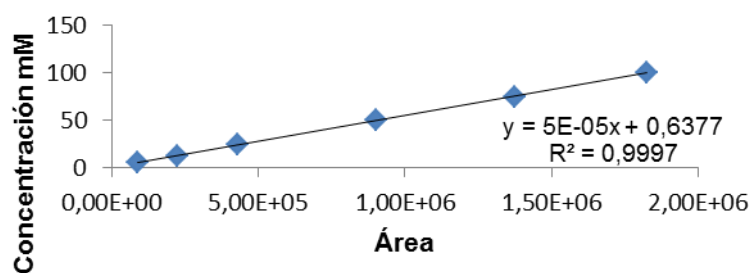
Anexo D. Cromatograma para un experimento a las 31 horas de fermentación.



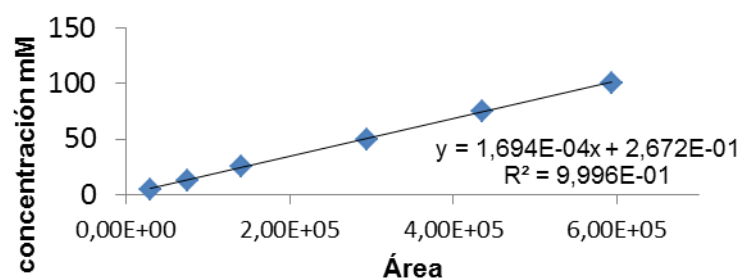
Anexo E. Curvas de calibración de los metabolitos presentes en la fermentación ABE

Sustancia	Tiempo de retención	concentración mM					
		5	12,5	25	50	75	100
		Área	Área	Área	Área	Área	Área
Ácido láctico	11,36	77155	200100	387576	811591	1241489	1649230
Ácido acético	13,317	47087	116774	222361	461313	707386	942409
Ácido butírico	17,317	97930	233286	441154	917444	1397222	1855805
Acetona	18,906	37351	90076	178279	372737	548482	720445
Etanol	21,06	30506	75288	141039	293890	435274	593386
Butanol	32,584	89994	224433	428565	900812	1373543	1824309

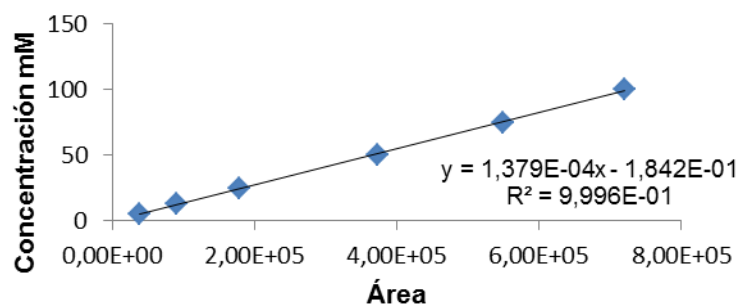
Curva butanol

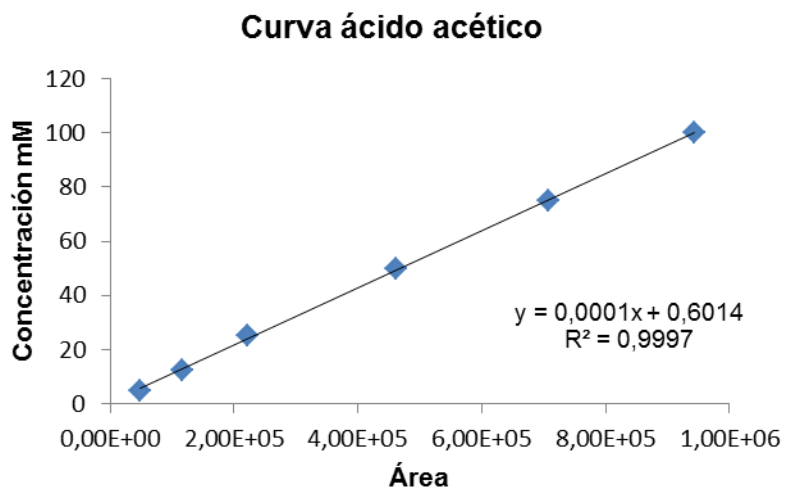
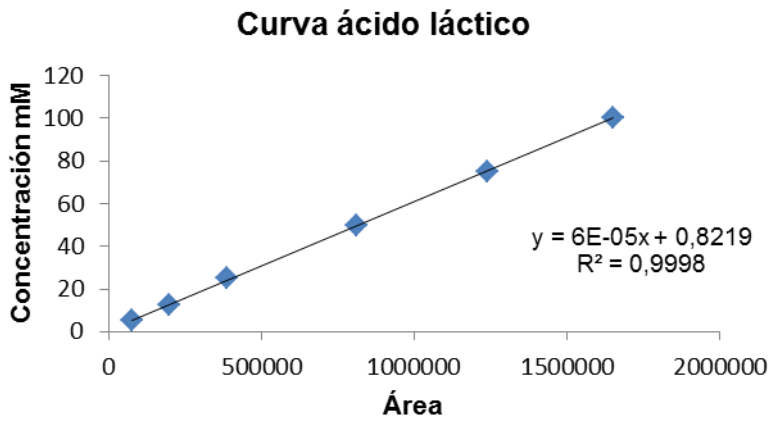
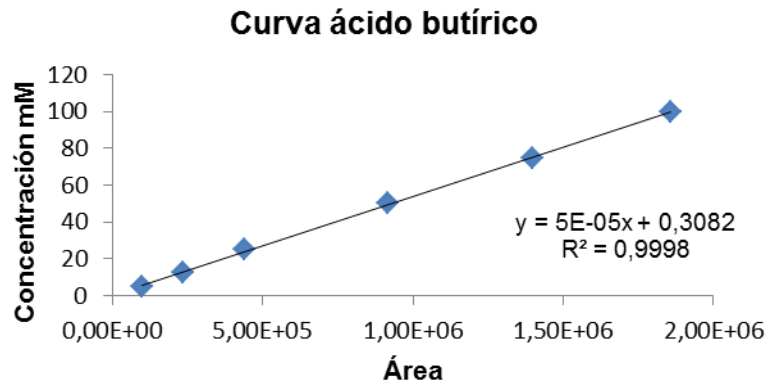


Curva etanol



Curva acetona





Anexo F. Imágenes del montaje de las pruebas experimentales



Medio de fermentación al inicio (izquierda) y al final (derecha)



Anexo G. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados

