

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

*Escola Técnica Superior de Enxeñaría*

Departamento de Enxeñaría Química



Escola  
Técnica  
Superior  
de Enxeñaría

## **TRABALLO FIN DE MÁSTER**

Optimización de la producción de biobutanol mediante fermentación ABE utilizando bagazo de manzana como sustrato

**Autor:**

Javier Bravo Venegas

**Tutores:**

Gemma Eibes González

Thelmo Lú-Chau

Santiago de Compostela, junio de 2021



# Índice

Nomenclatura.....	9
Resumen.....	11
Resumo.....	13
Abstract .....	15
1. Introducción.....	17
1.1. Contexto.....	17
1.2. Biorrefinería .....	18
1.3. Biocombustible .....	30
1.4. Fermentación ABE.....	36
2. Objetivos.....	44
3. Materiales y métodos .....	45
3.1. Reactantes, sustrato y microorganismo .....	45
3.2. Metodología de trabajo .....	46
3.3. Métodos analíticos.....	53
3.4. Análisis estadístico .....	58
4. Resultados y discusiones .....	59
4.1. Modelo matemático .....	59
4.2. Superficie de respuesta .....	63
4.3. Validación del modelo .....	68
4.4. Ruta del máximo ascenso .....	78
5. Conclusión.....	80
6. Referencias .....	81
Anexos .....	87
Anexo A. Fotografías de cultivos en placa.....	87
Anexo B. Fotografías de cultivos en medio de reactivación.....	88
Anexo C. Script utilizado en RStudio para la verificación del modelo matemático .....	89



## Índice de figuras

Figura 1. Preferencias en la encuesta realizada en octubre de 2019 por el Parlamento Europeo. Adaptado de (6). ....	18
Figura 2. Comparación entre una refinería de petróleo y una biorrefinería. Adaptado de (12). ....	20
Figura 3. Diferentes líneas de producción posibles a partir de la separación de los principales componentes de las materias primas lignocelulósicas en el pretratamiento. Adaptado de (13). ....	20
Figura 4. Esquema de la biorrefinería multi-producto, destacados en verde, a partir de bagazo de manzana que se desea formular en el proyecto ULTREIA. Adaptado de (14). ....	23
Figura 5. Composición fisicoquímica aproximada del bagazo de manzana seco, indicada en % másico. Adaptado de (18). ....	25
Figura 6. Clasificación y ejemplos de biocombustibles según el tipo de materia prima utilizada. Adaptado de (22). ....	32
Figura 7.A. Perfiles de crecimiento celular, formación de productos y diferenciación celular de <i>Clostridium acetobutylicum</i> durante el desarrollo de un cultivo batch de ABE (31). B. Ciclo celular de las bacterias productoras de solvente del género <i>Clostridia</i> (29). ....	38
Figura 8. Esquema de las vías catabólicas presentes en el metabolismo de las bacterias productoras de solvente del género <i>Clostridia</i> . Se diferencia con código de colores el flujo de carbono con flechas negras y el flujo de electrones con flechas azules. Las enzimas etiquetadas por número corresponden a: 1. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, 2. Piruvato-ferrodoxina oxidorreductasa, 3. NADH-ferrodoxina oxidorreductasa, 4. NADPH-ferrodoxina oxidorreductasa, 5. Hidrogenasa, 6. Lactato deshidrogenasa, 7. Fosfato acetiltransferasa, 8. Acetato quinasa, 9. Tiolasa, 10. 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, 11. Crotonasa, 12. Butiril-CoA deshidrogenasa, 13. Fosfato butiltransferasa, 14. Butirato quinasa, 15. Acetaldehído deshidrogenasa, 16. Etanol deshidrogenasa, 17. Butiraldehído deshidrogenasa, 18. Butanol deshidrogenasa, 19. Acetoacetil-Coa:acetato/butirato:CoA transferasa; 20. Acetoacetato descarboxilasa (29). ....	39
Figura 9. Representación de la metodología llevada a cabo en el laboratorio, se diferencia en flechas color negro los inóculos empleados en cada cultivo y en color verde el flujo de información y datos relacionados con el modelo. Nomenclatura: DBB, diseño Box-Behnken; RSM, metodología de superficie de respuesta. ....	46
Figura 10. Representación del procedimiento para llevar a cabo cada una de las fermentaciones ABE en el laboratorio. Nomenclatura: DDB, diseño Box-Behnken; HBM, hidrolizado de bagazo de manzana; Cond. Óp., Condiciones óptimas; Compl., Complementarias. ....	47
Figura 11. Recta de calibrado para concentración de azúcares reductores totales mediante el método DNS. ....	54
Figura 12. Cromatograma obtenido donde se aprecian los picos característicos para una solución 10 g/L de ácido butírico, 10 g/L de ácido acético, 10 g/L de butanol, 4 g/L de etanol, 4 g/L de isopropanol y 10 g/L de acetona. ....	56
Figura 13. Rectas de calibrado para ácido butírico (●) y ácido acético (■). ....	56
Figura 14. Rectas de calibrado para butanol (●), etanol (Δ), acetona (■) e isopropanol (x). ....	56
Figura 15. Rectas de calibrado para la densidad óptica a 600 nm. Para medio HBM (■) y para medio P2 (●). ....	57
Figura 16. Recta de calibrado para el transductor de presión. ....	58
Figura 17. Comparación entre los valores experimentales obtenidos y su valor predicho por cada modelo para la producción de butanol. ....	63
Figura 18. Superficie de respuesta y gráfico de contornos para la concentración de butanol (g/L) considerando los efectos del pH ( $x_1$ ) y la $[CaCO_3]$ ( $x_2$ ) cuando la temperatura ( $x_3$ ) se fija a 30 °C. Leyenda: . ....	63
Figura 19. Superficie de respuesta y gráfico de contornos para la concentración de butanol (g/L) considerando los efectos del pH ( $x_1$ ) y la temperatura ( $x_3$ ) cuando la $[CaCO_3]$ ( $x_2$ ) se fija a 8 g/L. Leyenda: . ....	64
Figura 20. Superficie de respuesta y gráfico de contornos para la concentración de butanol (g/L) considerando los efectos de la $[CaCO_3]$ ( $x_2$ ) y la temperatura ( $x_3$ ) cuando el pH ( $x_1$ ) se fija a 8. Leyenda: . ....	64
Figura 21. Perfil del pH durante el cultivo de <i>C. beijerinckii</i> en medio HBM (●) y medio P2 (Δ). [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	69
Figura 22. Perfil de OD <sub>600</sub> durante el cultivo de <i>C. beijerinckii</i> en medio HBM (●) y medio P2 (Δ). [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	69
Figura 23. Perfil de RTS (A) y glucosa (B) durante el cultivo de <i>C. beijerinckii</i> en medio HBM (●) y medio P2 (Δ). [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	71
Figura 24. Perfil de los productos del cultivo de <i>C. beijerinckii</i> en medio HBM (A) y medio P2 (B). Ácido butírico (■), ácido acético (Δ), butanol (●), etanol (Ж), acetona (X) e isopropanol (◊). [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	72
Figura 25. Perfil de lactato durante el cultivo de <i>C. beijerinckii</i> en medio HBM (●) y medio P2 (Δ). [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	75
Figura 26. Perfil de la presión acumulada durante el cultivo de <i>C. beijerinckii</i> en medio HBM (●) y medio P2 (Δ). [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	76



## Índice de tablas

Tabla 1. Potencial de biomasa en la Unión Europea. Adaptado de (12). .....	19
Tabla 2. Bioprocesos basados en el bagazo de manzana para la producción de enzimas. ....	26
Tabla 3. Bioprocesos basados en el bagazo de manzana para la producción de compuestos con valor añadido. ....	27
Tabla 4. Lista completa de los compuestos polifenólicos encontrados en el bagazo de manzana. Adaptado de (18, 21). .....	30
Tabla 5. Isómeros estructurales del butanol: características generales y principales aplicaciones. Adaptado de (26). .	34
Tabla 6. Propiedades físicas y químicas de algunos alcoholes y combustibles fósiles tradicionales. Adaptado de (26).	35
Tabla 7. Comparación de la producción de biobutanol mediante fermentación a partir de materias primas lignocelulósicas en las que se emplearon diferentes tipos de pretratamiento. Adaptado de (29). ....	41
Tabla 8. Comparación de la producción de biobutanol mediante fermentación ABE donde se utiliza bagazo de manzana como sustrato y diferentes técnicas de pretratamiento para la liberación de azúcares reductores. Adaptado de (36). .....	43
Tabla 9. Compuestos químicos utilizados, fórmula química, pureza y suministrador. ....	45
Tabla 10. Composición del medio de reactivación ATCC 2107. ....	47
Tabla 11. Composición de la disolución principal que forma parte del medio P2. ....	49
Tabla 12. Composición de la disolución concentrada de vitaminas. ....	49
Tabla 13. Composición de la disolución de vitaminas diluidas para el medio P2. ....	50
Tabla 14. Composición del medio de cultivo P2. ....	50
Tabla 15. Diseño experimental Box-Behnken realizado para la optimización del pH, [CaCO <sub>3</sub> ] y temperatura para la fermentación ABE. ....	51
Tabla 16. Composición de la disolución principal del medio HBM. ....	51
Tabla 17. Composición de la disolución de vitaminas diluidas para el medio HBM. ....	52
Tabla 18. Composición del medio HBM. ....	52
Tabla 19. Variables fijas, dependientes e independientes con sus respectivos valores evaluados. ....	60
Tabla 20. Concentración de butanol de acuerdo con el diseño experimental factorial 3 <sup>3</sup> . [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	60
Tabla 21. pH y concentración (g/L) de los sustratos y productos al comienzo y al final las fermentaciones de acuerdo con el diseño experimental factorial 3 <sup>3</sup> . [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	61
Tabla 22. Coeficientes de las ecuaciones de modelización, R, R <sup>2</sup> , F de Fisher y nivel de significancia. ....	62
Tabla 23. Rendimientos y productividades obtenidas para la fermentación HBM y control en condiciones óptimas. [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	77
Tabla 24. Experimentos realizados que fueron propuestos por la metodología <i>steepest ascent</i> . ....	78
Tabla 25. Comparación de la concentración de butanol obtenida para los experimentos complementarios. [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	79
Tabla 26. pH y concentración (g/L) de los sustratos y productos al comienzo y al final la fermentación óptima y complementarias. [Valores medios] ± [SD] por triplicado. ....	79

## Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Productividad de un compuesto .....	53
Ecuación 2. Rendimiento de un compuesto .....	53
Ecuación 3. Reacción química en que se fundamenta la medición de TRS .....	53
Ecuación 4. Reacciones enzimáticas en que fundamenta la medición de glucosa .....	54
Ecuación 5. Concentración de glucosa en una muestra .....	54
Ecuación 6. Reacciones enzimáticas en que se fundamenta la medición de lactato .....	55
Ecuación 7. Concentración de lactato en una muestra .....	55
Ecuación 8. Ecuación de los gases ideales .....	58
Ecuación 9. Modelo matemático polinómico para Y obtenido por regresión lineal .....	62



# Nomenclatura

% v/w	Porcentaje volumen/masa	LC	Lignocelulosa
% w/w	Porcentaje en masa	LCF	Materias primas lignocelulósicas
[ButOH]	Concentración de butanol	LO	Lactato oxidasa
[CaCO <sub>3</sub> ]	Concentración de carbonato de calcio	Mg	Magnesio
4-AF	4-aminofenazona	Mn	Manganeso
4-C	4-clorofenol	MON	Número de octano del motor
ABE	Acetona-Butanol-Etanol	MTBE	Metil <i>tert</i> -butil éter
Abs <sub>muestra</sub>	Absorbancia de la muestra	n	Cantidad de materia
Abs <sub>patrón</sub>	Absorbancia del patrón	N <sub>2</sub>	Nitrógeno molecular
ACHS	Pretratamiento con ácidos	N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
ALHS	Pretratamiento con álcalis	NADH/NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotico reducida/oxidada
ANOVA	Análisis de varianza	NaOH	Hidróxido de sodio
AP	Apple pomace	NO <sub>x</sub>	Óxidos de nitrógeno
APS	Residuos sólidos de bagazo de manzana	O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
APUS	Lodo de ultrafiltración de pulpa de manzana	OD <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm
ATP	Adenosín trifosfato	P	Fósforo
BLW	Residuos líquidos de la industria cervecera	P	Presión absoluta
BM	Bagazo de manzana	pH	Potencial de hidrógeno
BSG	Grano gastado de cervecería	POD	Peroxidasa
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH	<i>n</i> -butanol	R	Coefficiente de correlación
Ca	Calcio	R	Constante de los gases ideales
Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de calcio	R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación al cuadrado
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de calcio	RON	Número de octano de investigación
CaO	Óxido de calcio	ROS	Especies reactivas de oxígeno
C <sub>azúcares, 0 h</sub>	Concentración de azúcares al final de la fermentación	rpm	Revoluciones por minuto
C <sub>azúcares, 168 h</sub>	Concentración de azúcares al comienzo de la fermentación	RSM	Metodología de superficie de respuesta
Ce	Variables fijas	RT	Reactivo de trabajo
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo	RTS	Azúcares reductores totales
C <sub>glu</sub>	Concentración de glucosa	SIW	Aguas residuales de la industria del almidón
CH <sub>4</sub>	Metano	SmF	Fermentación sumergida
C <sub>i, 0 h</sub>	Concentración del compuesto i al comienzo de la fermentación	SSF	Fermentación en estado sólido
C <sub>i, t1</sub>	Concentración del compuesto i para el instante 1	T	Temperatura absoluta
C <sub>i, t2</sub>	Concentración del compuesto i para el instante 2	t <sub>1</sub>	instante de tiempo 2
C <sub>i, 168 h</sub>	Concentración del compuesto i al final de la fermentación	t <sub>2</sub>	instante de tiempo 1
C <sub>lac</sub>	Concentración de lactato	TBHP	<i>tert</i> -butil hidroxiperóxido
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	TFM	Trabajo de Fín de Máster
CoA	Coenzima A	UE	Unión Europea
Cu	Cobre	URRS	Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas
DBB	Diseño experimental Box-Behnken	USC	Universidade de Santiago de Compostela
DME	Dimetil éter	V	Volumen
DNA	Ácido desoxirribonucleico	Vit C	Vitamina C
DnaK	Proteína chaperona Hsp70	Vit E	Vitamina E
DNS	Ácido dinitrosalicílico	WWS	Extracción de azúcares con agua caliente
EMP	Vía Embden-Meyerhof-Parnas	x <sub>1</sub>	Factor pH en valores reales
ETBE	Etil <i>tert</i> -butil éter	x <sub>1</sub> *	Factor pH en valores codificados
f <sub>d</sub>	Factor de dilución	x <sub>2</sub>	Factor concentración de CaCO <sub>3</sub> en valores reales
Fe	Hierro	x <sub>2</sub> *	Factor concentración de CaCO <sub>3</sub> en valores codificados
FPU	Actividad enzimática en <i>Filter Paper Unit</i>	x <sub>3</sub>	Factor temperatura en valores reales
GAE	Ácido gálico equivalente	x <sub>3</sub> *	Factor temperatura en valores codificados
GHG	Gases de efecto invernadero	Y	Concentración de butanol
GOD	Glucosa oxidasa	Y <sub>A/S</sub>	Rendimiento de sustrato en acetona
GrpE	Factor de intercambio de nucleótidos	Y <sub>ABE/S</sub>	Rendimiento de sustrato en ABE
H <sub>2</sub>	Hidrógeno molecular	Y <sub>B/S</sub>	Rendimiento de sustrato en butanol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno	Y <sub>E/S</sub>	Rendimiento de sustrato en etanol
HBM	Hidrolizado de bagazo de manzana	Y <sub>G/S</sub>	Rendimiento de sustrato en gases de fermentación
HCl	Ácido clorhídrico	Y <sub>X/S</sub>	Rendimiento de sustrato en biomasa
HOAc/NaOA	Acetato de sodio	Zn	Cinc
K	Potasio		



## Resumen

Debido al posible agotamiento de los recursos fósiles y la contaminación que se genera al ser empleados como fuente de energía se ha incrementado el interés en producir combustibles alternativos, como el biobutanol, a partir de fuentes renovables como la biomasa. El bagazo de manzana (BM) corresponde a un residuo lignocelulósico de la industria de zumos y sidra que puede revalorizarse en una biorrefinería multiproducto para generar compuestos nutracéuticos, enzimas y butanol, este último mediante la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) debido a su alta concentración de azúcares aprovechables por bacterias del género *Clostridium*. Diversos factores ambientales influyen en la cantidad de butanol producida y sólo a ciertas condiciones se logra evitar el indeseable *acid crash*, caracterizado por un detenimiento total del crecimiento celular y la producción de solventes. El propósito de este estudio es optimizar la concentración de butanol empleando hidrolizado de BM como sustrato, para ello se llevó a cabo un diseño experimental Box-Behnken (DBB) considerando las variables pH (5-7), concentración de  $\text{CaCO}_3$  (2-8 g/L) y temperatura (30-40 °C) para los cultivos de *C. beijerinckii* CECT 508. Mediante regresión lineal se obtuvo un modelo matemático de la fermentación que se representó mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM) obteniendo las condiciones óptimas de pH 7, 8 g/L de  $\text{CaCO}_3$  y 30 °C que estimaron 12,06 g/L de butanol. El experimento de verificación a condiciones óptimas alcanzó 11,46 g/L de butanol lo que validó el modelo. Experimentos complementarios demostraron que fuera de la región de estudio no se produjeron incrementos en la variable respuesta lo que comprobó el óptimo obtenido. La concentración de butanol alcanzada fue cercana al límite máximo de inhibición, esto demostró que el BM es un sustrato apropiado para la producción de ABE.

Palabras clave: Butanol, bagazo de manzana (BM), fermentación ABE, *Clostridium beijerinckii*, diseño Box-Behnken (DBB), metodología de superficie de respuesta (RSM).



## Resumo

Debido ao posible esgotamento dos recursos fósiles e a contaminación xerada do seu uso como fonte de enerxía, incrementouse o interese en producir combustibles alternativos, como é o biobutanol, a partir de fontes renovables como a biomasa. O bagazo de mazá (BM) corresponde a un residuo lignocelulósico da industria de zumes e sidra que pode revalorizarse nunha biorrefinería multiproducto para xerar compostos nutracéuticos, encimas e butanol, este último a través da fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) debido á súa alta concentración de azucres aproveitables por bacterias do xénero *Clostridium*. Diversos factores ambientais inflúen na cantidade de butanol producida e só a certas condicións lógrase evitar o indesexable *acid crash*, caracterizado por unha detención total do crecemento celular e a produción de solventes. O propósito deste estudo é optimizar a concentración de butanol empregando hidrolizado de BM como substrato, para iso levouse a cabo un deseño experimental Box-Behnken (DBB) considerando as variables pH (5-7), concentración de  $\text{CaCO}_3$  (2-8 g/L) e temperatura (30-40 °C) para os cultivos de *C. beijerinckii* CECT 508. Mediante regresión lineal obtívose un modelo matemático da fermentación que se representou mediante a metodoloxía de superficie de resposta (RSM) obtendo as condicións óptimas de pH 7, 8 g/L de  $\text{CaCO}_3$  e 30 °C que estimaron 12,06 g/L de butanol. O experimento de verificación alcanzou, a condicións óptimas, 11,46 g/L de butanol, o que validou o modelo. Experimentos complementarios demostraron que fóra da rexión de estudo non se produciron incrementos na variable resposta, o que ratificou o óptimo obtido. A concentración de butanol alcanzada foi próxima ao límite máximo de inhibición, isto demostrou que o BM é un substrato apropiado para a produción de ABE.

Palabras chave: Butanol, bagazo de mazá (BM), fermentación ABE, *Clostridium beijerinckii*, deseño Box-Behnken (DBB), metodoloxía de superficie de resposta (RSM).



## Abstract

The possible depletion of fossil fuels and the contamination generated during their usage as an energy source have led to growth the interest in the production of alternative fuels, like biobutanol, from renewable sources, like biomass. The apple pomace (AP) corresponds to a lignocellulosic residue originating from the juice and cider industries. It can be valorized in a multi-product biorefinery to generate nutraceutical compounds, enzymes and butanol. Butanol may be obtained through acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation due to its high concentration of sugars that can be metabolized by the bacteria of genus *Clostridium*. Various environmental factors influence the amount of butanol produced and only under certain conditions the undesirable acid crash, characterized by a total arrest of cell growth and solvent production, can be avoided. The purpose of the current study is to optimize the concentration of butanol using AP hydrolyzate as substrate. In order to do this, a Box-Behnken experimental design (DBB) was used, considering the variables pH (5-7), CaCO<sub>3</sub> concentration (2-8 g/L) and temperature (30-40 °C) for *C. beijerinckii* CECT 508 cultures. Through linear regression, a mathematical model of fermentation was obtained, which was represented by the response surface methodology (RSM) obtaining the optimal conditions of pH 7, 8 g / L of CaCO<sub>3</sub> and 30 ° C which estimated 12.06 g / L of butanol. The verification experiment at optimal conditions reached 11.46 g / L of butanol, which validated the model. Complementary experiments showed that outside the study region there were no increases in the response variable, which confirmed the optimum obtained. The reached butanol concentration was close to the maximum inhibition limit. This showed that AP is an appropriate substrate for the production of ABE.

Keywords: Butanol, apple pomace (AP), ABE fermentation, *Clostridium beijerinckii*, Box-Behnken design (DBB), response surface methodology (RSM).



# 1. Introducción

## 1.1. Contexto

La sociedad actual es altamente dependiente del petróleo, ya que de este recurso fósil no solamente se extraen los combustibles que de forma cotidiana se utilizan para el transporte, la calefacción y la generación eléctrica, sino que también es fuente de diversos compuestos químicos que componen la ropa, aparatos electrónicos, muebles, envases y un largo sinfín de objetos que se utilizan en prácticamente todos los ámbitos del quehacer humano. Esto se evidencia en que la demanda mundial de petróleo ha alcanzado en 2018 cerca de 4.700 millones de toneladas con una tasa de crecimiento del 1,2% respecto al año anterior, manteniéndose como la fuente de energía más utilizada y, además se estima que los presentes depósitos mundiales de crudo contienen 244.100 millones de toneladas de este material (1).

Este es un número bastante significativo, sin embargo, si se considera el crecimiento anual en su consumo, y se elaboran modelos que contemplen aspectos poblacionales, económicos, energéticos y tecnológicos, entre otros, como son el crecimiento poblacional, el crecimiento del PIB, la demanda energética, la utilización de energías renovables o el cambio en el uso de suelos, es posible conjeturar diversos escenarios en donde se produce un eventual agotamiento de los recursos fósiles (2, 3). Esto se debe a que existe una velocidad de consumo que aumenta año a año, pero ninguna tasa de regeneración, lo que permite clasificar al petróleo como recurso no renovable.

A lo anterior se debe agregar una segunda consideración, que los combustibles fósiles son los principales responsables de la emisión de contaminantes a la atmósfera, los que han alcanzado niveles sin parangón en los últimos 800.000 años de historia terrestre. La combustión de dichos materiales representa el 80,3 % de la energía primaria que se consume en el mundo, y el 57,7 % de este valor corresponde solamente al sector de transportes, que incluye su uso en vehículos terrestres, barcos y aviones (4). Entre los contaminantes liberados se encuentran los llamados Gases de Efecto Invernadero, conocidos como GHG por sus siglas en inglés, como son el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), los cuales han sufrido un incremento en su concentración atmosférica de aproximadamente un 40%, un 150% y un 20% respectivamente desde la época previa a la revolución industrial (5).

Se ha identificado que la emisión de GHG antropogénicos corresponde a la principal causa del cambio climático, debido a que de la mano del efecto invernadero provocan una alteración del balance energético del planeta, promoviendo un calentamiento de su superficie, que ha generado un incremento de 0,85 °C en la temperatura media terrestre y oceánica a nivel global entre los años 1880 y 2012. La influencia humana es clara, la alteración del sistema climático de la Tierra no solamente se manifiesta en el aumento promedio de la temperatura planetaria, sino que también en el derretimiento de los glaciales y hielos polares, en el aumento del nivel del mar, la acidificación de los océanos, la pérdida de biodiversidad, entre otras terribles consecuencias (5).

La situación es de tal nivel de gravedad que los ciudadanos europeos consideran que la lucha contra el cambio climático debe ser la primera prioridad del Parlamento Europeo, incluso

por encima de problemas de índole social o política (6). A su vez, como se presenta en la Figura 1, dentro del ámbito ambiental, las preferencias indican que los principales desafíos en los que trabajar son aquellos que se relacionan directamente con la emisión de GHG y, por tanto, con el uso de combustibles fósiles. De hecho, recientemente el Parlamento Europeo ha aprobado medidas para disminuir la cantidad de GHG que producen los vehículos y el sector transportes en general (7), una clara evidencia de que las instituciones exigen cada día objetivos más ambiciosos respecto de las emisiones de CO<sub>2</sub>, uno de los principales GHG.



Figura 1. Preferencias en la encuesta realizada en octubre de 2019 por el Parlamento Europeo. Adaptado de (6).

Los mayores ejemplos de este tipo de política pública corresponden a los acuerdos multilaterales del Protocolo de Kyoto (1997) y más tarde, el Acuerdo de París (2015) cuyo principal objetivo corresponde a la reducción en las emisiones de GHG y además, propiciaron el desarrollo del mercado de los bonos de carbono. Dichas instancias son un claro ejemplo del cambio de paradigma que debe experimentar nuestra sociedad, en el que se debe pasar de un modelo lineal, de extracción, utilización y eliminación; a un modelo circular que optimice los stocks y flujos de materiales, energía y residuos, considere los impactos económicos, sociales y ambientales, e integre valores como la sostenibilidad y responsabilidad en la utilización de los recursos. Como se observará a continuación, en este segundo tipo de modelo, la biotecnología tiene significativos aportes que realizar.

## 1.2. Biorrefinería

Si bien existen diferentes estrategias que permiten afrontar los problemas del agotamiento de los recursos fósiles y la contaminación que se genera al ser utilizados como fuente de energía, las que más se relacionan con el presente trabajo provienen de la amplia disciplina conocida como biotecnología. El Convenio sobre la Diversidad Biológica de las Naciones Unidas define biotecnología como “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos” (8). Más recientemente se ha adoptado un patrón de colores que permite clasificar sus diversas áreas de aplicación (9), donde destaca la denominada biotecnología blanca, que se caracteriza por la utilización de microorganismos, extractos celulares o enzimas en procesos industriales con el fin de generar diversos productos como polímeros, biocombustibles, textiles, aditivos alimentarios, ente otros (10).

Se estima que la biotecnología blanca jugará un rol fundamental en la economía industrial en el presente y futuro cercano, debido a que permitirá desarrollar procesos industriales

ambientalmente más sostenibles al utilizar materias primas de origen renovable, para generar productos de valor agregado de manera energéticamente eficiente y con bajos niveles de emisiones de CO<sub>2</sub>. De esta forma, ofrece una alternativa a la utilización de recursos fósiles, sustituyendo esta materia prima no renovable por biomasa, es decir, materiales biológicos de tipo lignocelulósico de origen vegetal, que constituyen el más abundante depósito de carbono en el planeta Tierra (11). Este tipo de recursos se clasifica como renovable, ya que constantemente se está regenerando, el dióxido de carbono se transfiere desde el aire a la biomasa al ser fijado mediante fotosíntesis, y luego vuelve a la atmósfera cuando el material final se degrada o combustiona para generar energía, fluyendo en un circuito cerrado.

En general existen cuatro tipos de sustancias orgánicas que son agrupadas bajo el concepto de biomasa, incluye los productos de la industria forestal como la madera, los cultivos de granos y cereales como el trigo, el maíz y el arroz, los residuos, tanto industriales como también municipales y animales, como pueden ser los desechos alimenticios y el estiércol, y finalmente, diversas especies de algas. Es más, se estima que solamente el 3% de los 170 millones de toneladas de biomasa que se producen cada año en el mundo son aprovechadas en forma de cultivo, cosecha y aplicación tanto alimentaria como no alimentaria (12), por lo tanto, existe una cantidad significativa de recursos ambientalmente sostenibles que pueden ser explotados de forma responsable por la sociedad, esta situación se refleja de forma clara en la Tabla 1, en donde se indica y proyecta el potencial que posee la biomasa a nivel europeo.

Tabla 1. Potencial de biomasa en la Unión Europea. Adaptado de (12).

	Potencial de biomasa (Mton de petróleo)		
	2010	2020	2030
Residuos orgánicos	100	100	102
Cultivos energéticos	43-46	76-94	102-142
Productos forestales	43	39-45	39-72
<b>Total</b>	<b>186</b>	<b>215-239</b>	<b>243-316</b>

Una forma de procesar la biomasa y otorgarle valor añadido se realiza mediante las instalaciones denominadas biorrefinerías. En este tipo de establecimiento o red de establecimientos se convierte la biomasa en una variedad de productos químicos, materiales y energía, de manera análoga a como opera una refinería de petróleo que a partir de recursos fósiles permite obtener combustibles y sustancias químicas, situación que se ilustra en la Figura 2. Los tipos de productos generados en una biorrefinería pueden ser de diverso tipo, esto incluye compuestos de bajo valor añadido y alto volumen de producción como combustibles (biodiesel, bioetanol, biogás, etc) y químicos *commodities* o *bulk* (acetona, butanol, furfural, etc) pero también compuestos de alto valor añadido y bajo volumen de producción de tipo cosmético, nutracéutico o farmacéutico (12). Se estima que los productos industriales de base biológica sólo podrán ser competitivos con los productos de origen petroquímico si las materias primas implicadas son explotadas de forma óptima desarrollando un conjunto de cadenas de valor.

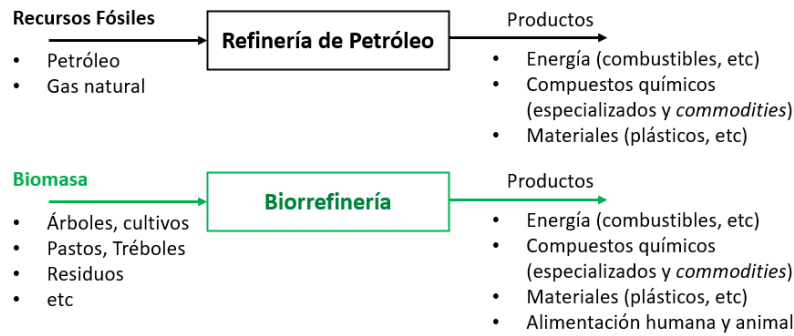


Figura 2. Comparación entre una refinera de petróleo y una biorrefinería. Adaptado de (12).

Si bien existen diferentes tipos de biorrefinería, para efectos del actual trabajo, destaca la biorrefinería de materias primas lignocelulósicas, conocida como biorrefinería-LCF por sus siglas en inglés, en este tipo de instalación, cobra especial relevancia una selectiva separación de los componentes fundamentales de la biomasa, los cuales corresponden a celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa corresponde a un polímero compuesto exclusivamente por moléculas de D-glucosa asociadas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4. Por otro lado, las hemicelulosas son heteropolisacáridos unidos también de forma mayoritaria por enlaces  $\beta$ -1,4 tanto de pentosas como hexosas, entre los que destacan la xilosa y la manosa. Finalmente, la lignina puede definirse como un polímero orgánico de tipo polifenólico, amorfo generado por la copolimerización de 3 monómeros fenil-propánicos denominados alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-cumarílico. Una apropiada separación de dichos compuestos es fundamental para su posterior aprovechamiento, operación denominada pretratamiento, ya que permite desarrollar las diversas líneas productivas que puede contener una biorrefinería, situación que se representa en la Figura 3.

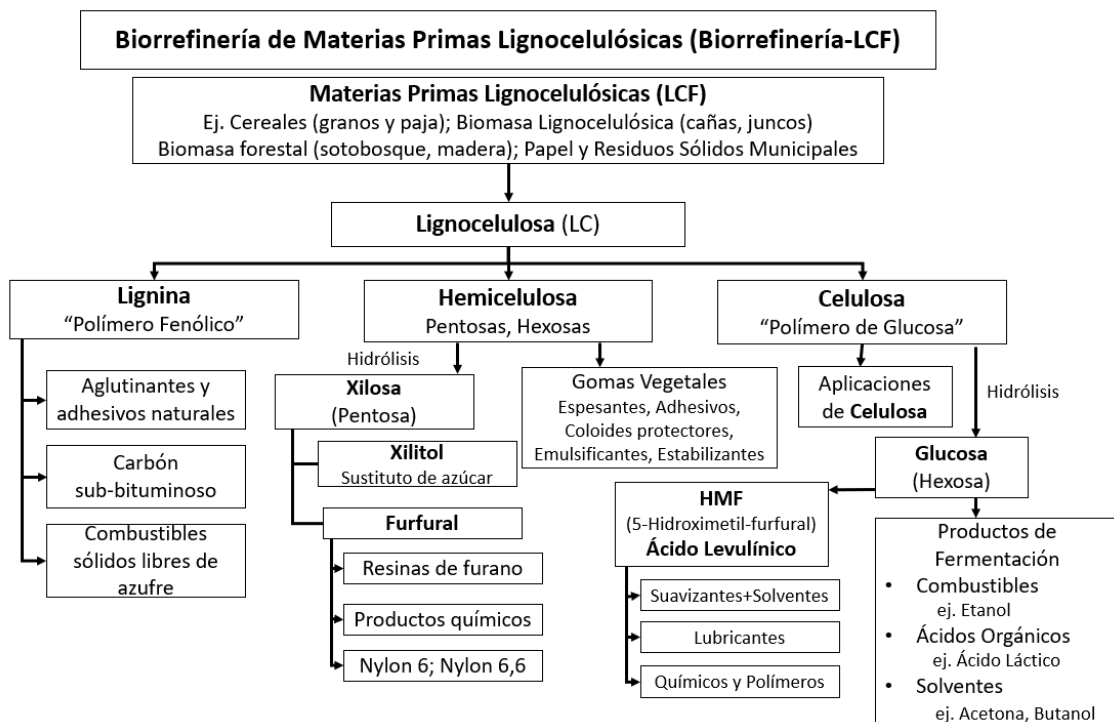


Figura 3. Diferentes líneas de producción posibles a partir de la separación de los principales componentes de las materias primas lignocelulósicas en el pretratamiento. Adaptado de (13).

Las biorrefinerías presentan importantes desafíos a superar, que involucran tanto las características de las materias primas implicadas, como también el estado de desarrollo de los procesos de conversión y las propiedades de los productos obtenidos. En primer lugar, es fundamental considerar la disponibilidad de la materia prima, que a diferencia de los ricos depósitos de petróleo y gas natural, ubicados en zonas geográficas específicas del planeta, la biomasa, se encuentra extensamente distribuida por el globo, en zonas de cultivo, zonas forestales, líneas de costa y múltiples fuentes de residuos orgánicos provenientes de la actividad humana y animal (12).

Si bien la biomasa se ha definido como un recurso renovable, no es ilimitado. Su suministro depende de la actividad forestal y agrícola, la gestión de residuos y el manejo de tierras de cultivo, por ello cobra importancia que la obtención de este recurso no comprometa la capacidad de producir piensos y alimentos para humanos. Se considera que para superar dicha competencia entre el mercado alimentario y no-alimentario, es necesario maximizar la obtención de biomasa forestal y agrícola del terreno cultivado al seleccionar aquellas especies vegetales que sean más atractivas para el proceso productivo asociado a la biorrefinería. Además, se debe aprovechar y explotar de manera apropiada la significativa cantidad de residuos orgánicos que son producidos a nivel industrial y urbano (12).

Un segundo elemento para considerar es que la biomasa se caracteriza por presentar una baja densidad aparente y un alto porcentaje de humedad, lo que se traduce en un incremento en los costes de recolección y transporte. La estrategia más utilizada es pre-procesar la materia orgánica, idealmente en el mismo lugar de recolección, mediante una molienda o una peletización. Esto no solamente incrementa la densidad del material, lo que facilita su transporte, sino que además, lo homogeniza, favoreciendo su procesado en la planta. Por otro lado, debido a la significativa cantidad de agua presente en la biomasa esta se degrada con facilidad, lo que reduce su calidad como materia prima, por lo que se recomienda su estabilización mediante un secado, para reducir el contenido de humedad al menos hasta el 25%. De esta forma, no solo se resuelve su carácter perecible, sino que también, permite almacenarla por largos periodos de tiempo, lo que cobra especial importancia para aquellos cultivos que son de tipo estacional, lo que resulta en un flujo continuo de materia prima (12).

En tercer lugar, las biorrefinerías requieren aún mayor investigación y desarrollo tecnológico para que los procesos de transformación implicados puedan ser competitivos con los bien establecidos procesos petroquímicos, que presentan un alto grado de optimización técnica y económica. Estas mejoras deben incluir todas las fases del ciclo productivo de la biorrefinería. Se deben implementar pre-procesados *in situ* de la biomasa que pueden incluir operaciones de molienda y/o secado, pero en especial, métodos más eficientes y menos severos para fraccionar el material lignocelulósico en sus componentes fundamentales. Por otro lado, las operaciones de transformación asociadas a la biomasa requieren el perfeccionamiento de catalizadores en medio acuoso, en especial biocatalizadores como son células o enzimas, para la química de reducción que requiere esta materia prima caracterizada por un alto grado de oxidación y/o funcionalización (12).

En el caso de las operaciones que impliquen un tratamiento termoquímico, la investigación se debe enfocar en el escalado y adaptación de unidades y procesos que ya existen para que sean capaces de soportar el considerable volumen del material orgánico involucrado. Para las operaciones de *downstream*, se necesita progresar en procesos de separación y purificación más eficientes y económicos, ya que pueden llegar a significar el 60 a 80% del coste global del proceso, esto se debe a que los productos obtenidos se caracterizan por encontrarse diluidos en una

mezcla compleja de compuestos orgánicos, en muchos casos, de similar naturaleza química. Finalmente, es de vital importancia que todas las actividades implicadas en el funcionamiento de la biorrefinería sean ambientalmente amigables, utilizar tecnologías limpias es fundamental para minimizar la huella ecológica asociada y así cumplir con los objetivos propuestos de reducir las emisiones de GHG (12).

En cuarto lugar, existen considerables retos relacionados con los productos generados por la biorrefinería, en especial respecto de reducir los costes de producción, para que de esta forma puedan ser competitivos con los productos derivados del petróleo. Las biorrefinerías deben ser innovadoras y aprovechar las ventajas comparativas de la biomasa con el fin de desarrollar nuevas familias de productos que rompan el tradicional esquema de compuestos químicos *bulk* asociados a la petroquímica, como pueden ser compuestos farmacéuticos, nutracéuticos, cosméticos o alimenticios, aprovechando así cada uno de los diversos componentes de la materia prima utilizada, permitiendo que el proceso global sea rentable. Por otra parte, es fundamental que se estandarice la calidad del producto final, debido a que la biomasa se caracteriza por su variabilidad en el tiempo, de tal manera se puede ofrecer un producto homogéneo en el mercado facilitando sus posteriores aplicaciones y usos (12).

Definir el tamaño óptimo de una biorrefinería es un problema complejo en el que interviene múltiples factores. En general puede ser descrito como una solución de compromiso entre el aumento del coste de transporte de la materia prima pretratada y menores costes de procesado a medida que aumenta el tamaño de la planta. Sin embargo, también es una función de la clase de biomasa utilizada, la ubicación geográfica de la instalación, el tipo de tecnología que se implementará, las presiones ejercidas por la demanda de cada producto, entre otros (12).

El concepto de biorrefinería es esencial para comprender el presente trabajo. Su desarrollo se enmarca en el proyecto ULTREIA (Xunta de Galicia, ED431F 2020/6) en actual ejecución por el Grupo de Biotecnología Ambiental (GI-1613) en la Universidade de Santiago de Compostela. En él se pretende transformar el bagazo de manzana, un residuo de la industria de los zumos y la sidra, en compuestos nutracéuticos, enzimas y biocombustibles, lo que corresponde a una revalorización multi-producto (14). De esta forma, se responde a los principios de la economía circular, los residuos de una determinada industria se convierten en recursos para otra. Transformar residuos en materias primas es una de las claves para responder al cambio de modelo que debe enfrentar la humanidad.

De forma más detallada, como se ilustra en la Figura 4, se pretende desarrollar una plataforma de revalorización en etapas. Se comienza con la extracción de los compuestos polifenólicos, que corresponden a sustancias químicas, típicamente encontradas en plantas, que se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol en su estructura molecular. Existe una cantidad significativa de evidencia que justifica su capacidad antioxidante previniendo el combatir el daño estrés oxidativo, lo que convierte a estos compuestos en una fuente ideal de nutracéuticos, aditivos cosméticos o para el tratamiento de enfermedades crónicas (14). Por ejemplo, se ha observado que estos fitoquímicos actúan por sus propiedades antioxidantes y anti-proliferativas a nivel celular, sobre el DNA, en diferentes fases del cáncer colorrectal, evitando o controlando la enfermedad, un claro indicador del significativo potencial de aplicaciones que presentan los polifenoles (15).

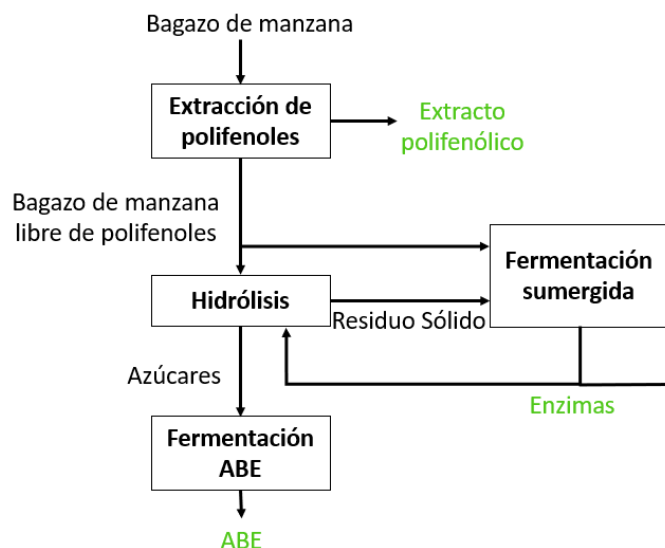


Figura 4. Esquema de la biorrefinería multi-producto, destacados en verde, a partir de bagazo de manzana que se desea formular en el proyecto ULTREIA. Adaptado de (14).

El bagazo libre de polifenoles es posteriormente sometido a una hidrólisis enzimática, en la que mediante la utilización de celulasas y pectinasas se obtiene una solución acuosa con una alta concentración de azúcares fermentables. Se espera que estas enzimas sean generadas en la misma biorrefinería utilizando diferentes corrientes de proceso como el bagazo en bruto, el bagazo libre de polifenoles y el sólido residual de la hidrólisis como sustrato para la realización de fermentaciones sumergidas con hongos filamentosos. Este tipo de cultivo, típico para la síntesis de enzimas hidrolíticas, empleará diferentes cepas de *Penicillium* y *Trichoderma*, y se prevé que al hacer uso de un sustrato similar que para la hidrólisis, el perfil de la mezcla enzimática sintetizada sea óptimo para los requerimientos de actividad celulolítica de la reacción.

Posteriormente, el hidrolizado de bagazo de manzana es utilizado como sustrato para la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE), en ella se transforman los azúcares del hidrolizado en solventes mediante el cultivo de *Clostridia*, un género de bacterias anaerobias estrictas y grampositivas. El principal producto de interés es el butanol, un biocombustible con atractivas propiedades fisicoquímicas como un alto contenido energético, baja miscibilidad en agua e higroscopicidad, además de adaptarse mejor a los motores de combustión interna de los vehículos, si es que es comparado con el bioetanol (16). Además, el biobutanol puede emplearse como solvente, o bien como materia prima (*building block*) para la síntesis de múltiples compuestos químicos derivados con aplicaciones en pinturas, polímeros o plásticos.

La materia prima utilizada en el proyecto ULTREIA es el bagazo proveniente de la manzana, una de las frutas más consumida en el mundo. Se estima que aproximadamente 87 millones de toneladas de manzanas fueron producidas a nivel mundial en el año 2019, encabezando la lista China y los Estados Unidos. De este total, la Unión Europea (UE) aporta cerca de 17 millones de toneladas, lo que representa cerca del 20%, siendo Polonia, Francia, Italia y Alemania los países que más contribuyen a dicho valor (17). La mayor parte de esta cifra representa las denominadas manzanas de mesa, que se emplean para su consumo directo o bien para la elaboración de zumo, y solamente entre el 15 al 45% corresponden a manzanas ricas en taninos que se aprovechan para la producción de sidra (18). Otras aplicaciones corresponden también a la manufactura de mermeladas, vinagre y pulpa de manzana.

Aquellas manzanas que por parámetros organolépticos y/o estéticos no se consideran adecuadas para su consumo *in natura* son procesadas, generando una considerable cantidad de residuos orgánicos (19). El bagazo de manzana justamente corresponde a un desecho industrial proveniente de empresas manufactureras una vez que la fruta es triturada o prensada para separar su zumo. El bagazo de manzana húmedo representa hasta el 25% de la masa total de la fruta fresca, por ejemplo, en el año 2014 se procesaron más de 3 millones de toneladas de manzanas y se generaron cerca de 800.000 toneladas de bagazo (18, 20). Su disposición final como deshecho en el medio ambiente representa un importante desperdicio de biomasa, que se podría utilizar para formular diferentes metabolitos de alto valor agregado (19). Además, dicha disposición presenta importantes desafíos y dificultades debido a su gran volumen y alto contenido de humedad que facilita su rápida putrefacción (20).

De manera general, el bagazo de manzana se encuentra compuesto fundamentalmente por la cáscara y pulpa alcanzando un 95% en masa, por semillas entre el 2 a 4% y por tallos, representando un 1% (15). El bagazo recién obtenido presenta un alto nivel de humedad, que puede encontrarse en el rango de 70-85% en peso. Sin embargo, si se reduce el contenido de agua hasta un valor menor al 10% es posible evitar la contaminación microbiana, manteniendo estable su calidad durante el almacenamiento (18). Si bien la composición exacta del bagazo cambia con la variedad de manzana utilizada (como podría ser *Royal Gala*, *Red Delicious*, *Granny Smith*, *Golden Delicious*, entre otras), éste se encuentra formado principalmente por fibra insoluble de tipo lignocelulósica, pero también por azúcares simples como glucosa, fructosa y sacarosa, y bajos niveles de minerales, proteínas y vitaminas (19).

Como un primer acercamiento, la composición proximal del bagazo de manzana fresco corresponde a 75,6% agua, 5,1% proteínas, 4,2% lípidos, 2,8% cenizas y 12,3% carbohidratos, los cuales pueden subdividirse en 5,7% azúcares reductores, 5,1% fibra y 1,5% pectina; además se ha determinado su pH con un valor de 4,0 (19). Sin embargo, con el fin de disponer una visión más detallada se presenta en la Figura 5 la composición fisicoquímica del bagazo seco, donde se aprecia una considerable presencia de fibra dietaria, de azúcares tanto reductores como glucosa y fructosa, y no reductores como el almidón y la sacarosa (18). La fibra dietaria corresponde a una amplia diversidad de carbohidratos que no pueden ser digeridos por el sistema enzimático humano del tracto digestivo, y dependiendo de su naturaleza pueden clasificarse en soluble e insoluble. En este caso, dos tercios de la fibra dietaria del bagazo de manzana corresponde a la de tipo insoluble, que incluye la celulosa, la hemicelulosa y la lignina; la parte restante corresponde a fibra soluble en la que predomina la pectina, un heteropolisacárido tridimensional de polímeros ácidos y neutros ramificados (18). La composición de la fibra dietaria para esta biomasa corresponde a 16,67% celulosa, 8,44% lignina, 4,69% hemicelulosa y 6,09% pectinas (20).

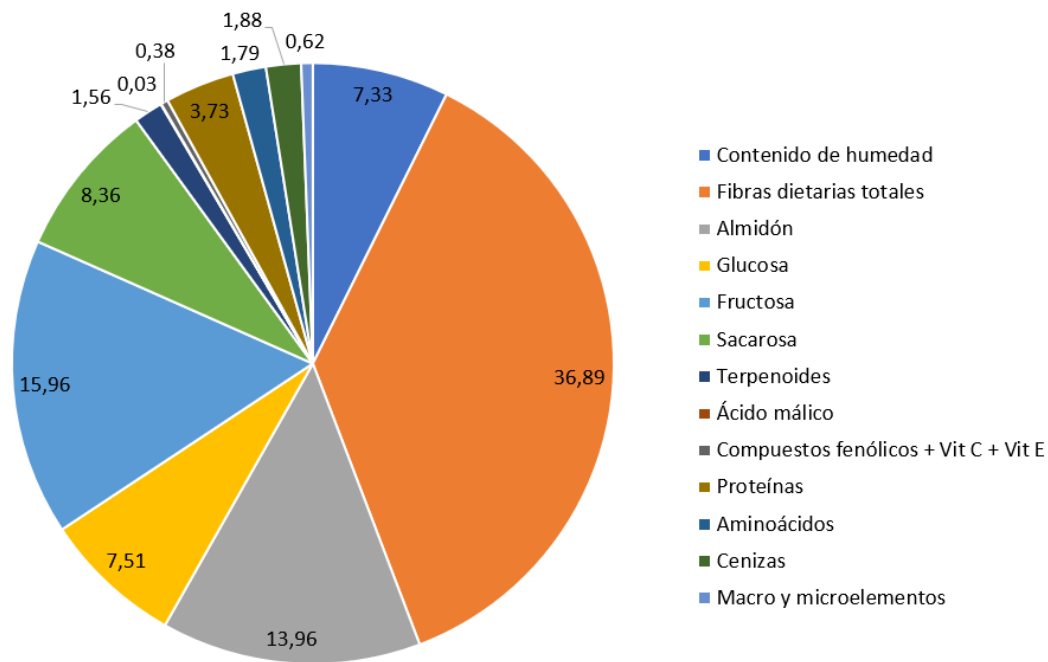


Figura 5. Composición fisicoquímica aproximada del bagazo de manzana seco, indicada en % másico. Adaptado de (18).

A pesar de lo anterior, no existe un consenso único respecto de la composición del bagazo, por ejemplo, de acuerdo con el trabajo de Dhillon *et al.*, es posible identificar azúcares como arabinosa 14-23%, galactosa 6-15% y xilosa 1,1%. Además se reportaron varios minerales pertenecientes a las cenizas y micronutrientes como Ca 0,06-0,1 % w/w, Cu 1,1 mg/Kg, Fe 31,8-38,3 mg/Kg, K 0,4-1,0 % w/w, Mg 0,02-0,36 % w/w, Mn 3,96-9,0 % w/w, P 0,07-0,076 % w/w y Zn 15,0 mg/Kg (21). Como no hay acuerdo en esta materia, es recomendable llevar a cabo una caracterización propia de cada bagazo de manzana que se disponga, debido a que como se ha comentado, cambia según la variedad de manzana utilizada y del proceso del que proviene.

En la actualidad, el bagazo de manzana se trata de forma similar que otros residuos de tipo orgánico, es decir, disposición en vertederos, incineración, compostaje, esparcimiento en tierras y alimentación animal (15, 19–21). Esto presenta varias dificultades, por un lado, en el caso de no revalorizar este desecho, las industrias deben asumir el coste de su tratamiento, transporte y/o disposición final, disminuyendo la rentabilidad del proceso. Por otro lado, su aplicación en compostaje y piensos representan revalorizaciones de bajo valor, pero además, presenta un bajo contenido de proteínas y vitaminas, y adicionalmente un valor energético menos metabolizable que otros ensilados, como el de maíz, lo que genera un alimento para animales de calidad media a baja con un bajo valor nutricional (19, 21). Solamente una pequeña proporción del bagazo de manzana se emplea como forraje o añadida al suelo como fertilizante. La mayor parte de esta biomasa de bajo coste se composta o dispone en vertederos, lo que genera inconvenientes ambientales y sociales, libera GHG y en determinados casos amenaza la salud de las personas (21).

De la mano de la biotecnología ambiental es posible evitar dichas dificultades, transformándolas en una oportunidad para la producción de valiosos bio-productos, principalmente mediante la fermentación con microorganismos se puede convertir la biomasa en ácidos orgánicos, enzimas, biocombustibles o biopolímeros, y mediante diferentes tecnologías de extracción directa, compuestos bioactivos como antioxidantes. Los artículos de revisión de Vendruscolo *et al.* (19), de Dhillon *et al.* (21), de Perussello *et al.* (15) y de Waldbauer *et al.* (18) condensan la multiplicidad de esfuerzos que se han realizado con el fin de revalorizar el bagazo,

a través de bioprocesos, en compuestos de mayor valor agregado. Por ejemplo, en la Tabla 2 se presentan aquellos orientados a sintetizar enzimas, principalmente hidrolasas, que catalizan reacciones de hidrólisis con el fin de degradar algún tipo de compuesto, en este caso polisacáridos, como celulosa en el caso de la  $\beta$ -glucosidasa, xilano para xilanasas, almidón para las amilasas, quitina para quitinasas, quitosano para la quitosanasa y pectina para las pectinasas, pectina-metilesterasa y poligalacturonasas.

Tabla 2. Bioprocesos basados en el bagazo de manzana para la producción de enzimas.

Aplicación	Microorganismo	Proceso	Referencia
<b>Producción de Enzimas</b>			
<b>Celulasas</b>			
$\beta$ -glucosidasa	<i>Aspergillus foetidus</i>	SSF	19
$\beta$ -glucosidasa	<i>A. niger</i> NRRL 567, <i>M. phaseolina</i>	SSF	21
Exoglucanasa	<i>A. niger</i> NRRL 567, <i>M. phaseolina</i> , <i>Candida utilis</i>	SSF	21
Endoglucanasas	<i>A. niger</i> NRRL 567, <i>M. phaseolina</i> , <i>Candida utilis</i>	SSF	21
Enzimas lignocelulolíticas	<i>Candida utilis</i>	SSF	19
<b>Hemicelulasas</b>			
Xilanasa	<i>A. niger</i> NRRL 567, <i>M. phaseolina</i> , <i>Candida utilis</i>	SSF	21
<b>Ligninolítica</b>			
Manganeso peroxidasa	<i>C. utilis</i>	SSF	21
Lignina peroxidasa	<i>P. chrysosporium</i>	SSF	21
Lacasa	<i>P. chrysosporium</i>	SSF	21
<b>Amilasa</b>	<i>M. phaseolina</i>	SSF	21
<b>Quitinasa</b>	<i>A. niger</i> NRRL 567	SSF	21
<b>Quitosanasa</b>	<i>A. niger</i> NRRL 567	SSF	21
<b>Enzimas Pectinasas</b>			
Pectina-metilesterasa	<i>Aspergillus niger</i>	SSF/SmF	19
Pectinasa	<i>Polyporus squamosus</i>	SmF	19
Pectinasa	<i>A. foetidus</i> , <i>C. utilis</i>	SSF, placas petri	21
Enzimas pectinolíticas	<i>A. niger</i>	SSF	19
Poligalacturonasa	<i>A. niger</i>	SSF	19
Poligalacturonasa	<i>Lentinus edodes</i>	SSF	19

Nomenclatura: SSF, Fermentación en estado sólido; SmF, Fermentación sumergida.

De acuerdo con lo expuesto en la Tabla 2, los microorganismos utilizados corresponden a diferentes especies de levaduras y hongos xilófagos tipo *white-rot*, pero en su mayoría son hongos filamentosos como *Aspergillus niger* o *Macrophomina phaseolina*, que se escogen por su capacidad natural de desarrollarse y degradar el material lignocelulósico que compone las plantas y troncos en los que crecen en el medio ambiente. Estos hongos filamentosos se utilizan ampliamente mediante cultivos en estado sólido, SSF por sus siglas en inglés, debido a su alta eficiencia en la degradación de sustratos sólidos complejos y la producción de un amplio rango de enzimas extracelulares hidrolíticas, además, este tipo de cultivo resulta ideal para la elaboración de preparados enzimáticos debido a la nula o muy baja presencia de agua libre, lo que resulta en un preparado más concentrado, y por lo demás, especializado para sus aplicaciones en revalorización de biomasa (21).

Además de enzimas, se ha estudiado la producción de diferentes compuestos con valor añadido como aromas, biocombustibles, biopolímeros, enriquecimiento nutricional y ácidos orgánicos, que se recogen en la Tabla 3. En la industria de los alimentos las características organolépticas como el olor y el sabor juegan un rol fundamental para su éxito en el mercado, por ello las empresas se interesan en añadir aditivos que puedan mejorar dichos atributos. Si bien, se pueden sintetizar compuestos aromáticos de forma artificial o extraerlos directamente de plantas, una de las alternativas que se estudia corresponde a la síntesis microbiana o

bioconversión, que emplea bacterias u hongos especialmente seleccionados como *Rhizopus sp.* o *Ceratocystis fimbriata* para crear, en este caso, aromas frutales.

Tabla 3. Bioprocesos basados en el bagazo de manzana para la producción de compuestos con valor añadido.

Aplicación	Microorganismo	Proceso	Referencia
<b>Producción de Compuestos Aromáticos</b>			
Compuestos aromáticos	<i>Rhizopus sp.</i>	SSF	19
Compuestos aromáticos	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SSF	19
Aroma frutal	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	SSF	19, 21
Compuestos fenólicos	<i>Trichoderma sp.</i>	SSF	19
<b>Enriquecimiento Nutricional</b>			
Proteínas unicelulares	<i>C. utilis</i>	SmF	19
Alimentación animal	<i>Gorgronella butleri</i>	SSF	19
Alimentación animal	<i>C. utilis, Torula utilis, Saccharomyces cerevisiae</i>	SSF	19, 21
Enriquecimiento nutricional	<i>Candida utilis, Klöckera sp.</i>	SSF	19
Enriquecimiento nutricional	<i>C. utilis, Pleurotus ostreatus</i>	SmF	19
Enriquecimiento proteico	<i>Rhizopus oligosporus</i>	SSF	19
Enriquecimiento proteico	<i>Trichoderma viriade, A. niger, S. cerevisiae</i>	SSF/SmF	21
<b>Producción de Heteropolisacáridos</b>			
Quitosano	<i>G. butleri, A. niger</i>	SSF/SmF	19, 21
Heteropolisacáridos	<i>Beijerinckia indica</i>	SmF	19
Goma Xantan	<i>Xanthomonas campestris</i>	SSF	19, 21
<b>Ácidos Orgánicos</b>			
Ácido cítrico	<i>A. niger</i>	SSF	19, 21
Ácido láctico	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	SmF	21
<b>Otros productos</b>			
Bioinoculante	<i>T. vivride, T. harzianum, T. pseudokoningii, Penicillium sp., R. oligosporus, A. niger</i>	SSF	19
Hongos comestibles	<i>L. edodes, P. ostreatus, P. sajor-caju</i>	SSF	19, 21
Etanol	<i>S. cerevisiae</i>	SSF	19, 21
Ácido $\gamma$ -linoleico	<i>Thamnidium elegans, Mortierella isabelina, Cunninghamella elegans, Cunninghamella echinulata</i>	SSF	19
Levadura de panadería	<i>S. cerevisiae</i>	SmF	19, 21
Pigmentos carotenoides	<i>Micrococcus sp., Chromobacter sp., Rhodotorula sp.</i>	SmF	19

Nomenclatura: SSF, Fermentación en estado sólido; SmF, Fermentación sumergida.

Existen varios motivos por los que el bagazo de manzana no es un buen alimento para animales. En primer lugar, el bagazo presenta un bajo nivel de digestibilidad por su alto ratio lignina/celulosa. En segundo lugar, su alto contenido de azúcares libres provoca en los rumiantes, luego de su ingesta y fermentación en el sistema digestivo, alcoholemia animal, un serio problema para industria ganadera. En tercer lugar, el contenido de proteínas, vitaminas y minerales es particularmente bajo para los requerimientos animales, lo que contribuye a su bajo valor nutricional y comercial. Por ello, se han empleado diferentes técnicas de enriquecimiento en la que se emplean hongos filamentosos y/o levaduras, generalmente en cultivos SSF, para reducir el contenido de lignina, favoreciendo la digestibilidad, e incrementando el contenido proteico, grasa e incluso de vitamina C y minerales debido a la presencia de la biomasa fúngica. Esto mejora sus características como pienso, lo que permite sustituir por bagazo tratado entre un 30-60% a la alimentación tradicional de maíz o arroz empleada en la dieta de determinadas especies de ganado (21).

El quitosano es un copolímero estructural de  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-D-glucosa, unidad acetilada, y residuos de  $\beta$ -(1-4)-2-amino-D-glucosamina, unidad desacetilada, con importantes aplicaciones en el sector alimentario, biomedicina, farmacéutico, productos de cuidado personal, agricultura y medioambiental. Convencionalmente se formula a partir del residuo de cáscaras de crustáceos generados en las industrias procesadoras de mariscos, sin embargo, también se

encuentra presente de forma natural en la pared celular de hongos filamentosos como *G. butleri* o *A. niger*. Por ello, se ha reportado que en fermentaciones sumergidas (SmF) empleando estos microorganismos y bagazo de manzana como sustrato, se logra extraer quitosano desde el micelio seco, correspondiendo a un 6,4% de su peso. De esta forma, considerando las múltiples aplicaciones de este biopolímero, se vuelve prometedora su extracción desde el micelio residual de diferentes procesos industriales fermentativos (21).

El empleo de bagazo de manzana como sustrato para la síntesis de ácidos orgánicos, como ácido cítrico o láctico, está bien documentado, en ella se emplean respectivamente SSF de *A. niger*, un hongo filamentoso, y SmF de *Lactobacillus rhamnosus*, una bacteria probiótica. El bagazo se considera una materia prima ideal para la producción de ácido cítrico debido a su pH bajo, ideal para la actividad del hongo, y porque no requiere ningún tipo de pretratamiento o necesidad de suplementar nutrientes, además de su bajo coste. Para la producción de ácido láctico, el bagazo tampoco requiere ser suplementado, además juega a su favor el alto contenido de humedad y la presencia de micronutrientes como iones metálicos de Mg, Mn o Fe. El contenido de azúcares puede incrementarse con la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, lo que favorece la producción del ácido y de forma simultánea incrementa la cantidad de biomasa que puede ser utilizada también como probiótico (21).

La necesidad de combustibles alternativos a los derivados de recursos fósiles ha llevado a estudiar la factibilidad técnica, económica y sostenibilidad ambiental de producir bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos. El potencial del bagazo de manzana como sustrato para la síntesis de etanol se ha estudiado ampliamente (21). Por ejemplo, se han llevado a cabo SFF en los que se inocula la levadura *S. cerevisiae*, como productora de alcohol, y los hongos *A. foetidus* y *F. oxysporum*, como productores de enzimas pectinasas y celulasas respectivamente, de esta forma no solo se aprovecharon los azúcares libres como glucosa y fructosa, sino que también la fibra dietaria, para la producción de etanol, alcanzando un rendimiento de 16,09% v/w. El bagazo de manzana tiene una proporción de lignina menor que otros tipos de biomasa lignocelulósica como granos o pajas, esto es positivo porque la lignina no puede ser convertida en etanol pero además, porque dificulta la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa, convirtiendo al bagazo en una materia prima apropiada para la formulación de biocombustibles. De hecho se estima que en Estados Unidos, según cálculos del 2012, de un total de bagazo de manzana residual de 400.000 toneladas en base seca, se podría producir 80.000 toneladas de bioetanol.

El bagazo de manzana es rico en carbohidratos, pero también contiene fibra dietaria, vitaminas y otros nutrientes vitales para el crecimiento de diversos microorganismos. Por ejemplo, para la producción de levadura de panadería, esencialmente biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, se ha demostrado que utilizar el bagazo como sustrato en cultivos SmF, presenta una mayor eficiencia en el rendimiento celular y baja producción de etanol si se compara con el azúcar de caña o las melazas, los sustratos tradicionalmente empleados, convirtiéndolo en una materia prima prometedora. Además, se ha probado su potencial como nutriente para el cultivo de setas comestibles, por ejemplo especies como *Pleurotus ostreatus*, una seta con alto contenido proteico, logra crecer de forma exitosa sobre el bagazo de manzana por su capacidad desarrollarse en ambientes de pH bajo como es el caso de esta biomasa (21).

Además del olor y el sabor, el color es un atributo fundamental de la apariencia física y calidad de los alimentos, por ello, cada vez existe mayor interés en la obtención de colorantes, en especial, aquellos de origen natural antes que sintético. Se han empleado diferentes especies de bacterias y levaduras como *Micrococcus* sp. o *Chromobacter* sp. para la síntesis de carotenoides, pigmentos orgánicos de tonos anaranjados, rojos y rosados, donde se obtuvo una concentración

final de 9,97 mg/100 g de medio y 46,6 mg/100 mg de medio, un claro indicador que su producción puede ser mejorada mediante una selección adecuada del microorganismo cultivado (19).

Un enfoque diferente a la revalorización del bagazo de manzana es la extracción y aislamiento directo de compuestos desde la biomasa, estos corresponden fundamentalmente a parte de la fibra dietaria y a compuestos antioxidantes. La extracción de pectina cobra importancia debido a que este polisacárido presenta aplicaciones nutricionales y cosméticas, generalmente como aditivo gelificante o espesante. La técnica más utilizada corresponde a la extracción ácida con agua caliente seguida de la adición de etanol que permite precipitar la pectina cruda. Sin embargo, debido a razones medioambientales por la cantidad de residuos químicos generados, ha cobrado interés el uso de técnicas ambientalmente amigables como la extracción con agua caliente comprimida o la extracción asistida por enzimas como celulasas y proteasas, que incrementan los rendimientos de extracción y no requieren la utilización de sustancias ácidas (18).

El bagazo de manzana presenta importantes propiedades antioxidantes que se deben a la presencia de compuestos polifenólicos como ácidos hidroxicinámicos, diversos tipos de flavonoides, como flavanoles, flavonas, flavanonas, flavanoles o antocianinas, entre otros. Los polifenoles influyen en las características organolépticas, como el brillo, color, sabor u olor, y además en la estabilidad oxidativa de los alimentos, debido a que actúan como agentes reductores y evitan el daño celular generado por moléculas inestables como los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) transformándolos en subproductos neutrales y habituales del metabolismo. El efecto de los polifenoles en la salud humana corresponde a una acción protectora contra el envejecimiento, infecciones, hipertensión, cáncer, diabetes, asma, disfunciones cerebrales, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares (15). En el bagazo de manzana seco, la concentración de compuestos fenólicos totales puede variar de 262 a 856 mg/100 g, esto se debe a que su composición varía según la variedad de manzana, pero también porque existe una fracción de los antioxidantes que se transfiere al zumo de la fruta, sin embargo, como su ubicación principal corresponde a la cáscara, la mayor parte de ellos permanece en el bagazo (18).

En el bagazo de manzana fresco, destacan el ácido clorogénico, ácido cafeico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina y glicósidos de quercetina, sin embargo, una vez que el bagazo se ha secado, el polifenol que predomina corresponde a la floridzina (18). El detalle completo de los antioxidantes presentes en el bagazo se presenta en la Tabla 4. Se han logrado identificar tanto antioxidantes solubles en agua, o de naturaleza hidrofílica y ubicados en el citosol, como también solubles en solventes orgánicos, es decir, hidrofóbicos o liposolubles ubicados generalmente en las membranas celulares, de esta forma se sugiere que el residuo de manzana puede ser una buena fuente de ambos tipos de antioxidantes (15). Con el fin de promover la estabilidad de estos compuestos, se recomienda secar de forma inmediata y efectiva el bagazo una vez que se ha obtenido desde el prensado o molienda, debido a que durante estas operaciones, son liberadas enzimas polifenol oxidasas y peroxidasas que promueven la degradación de los antioxidantes, de esta forma, la actividad enzimática es inactivada por temperatura o se detiene por baja actividad de agua (18).

Tabla 4. Lista completa de los compuestos polifenólicos encontrados en el bagazo de manzana. Adaptado de (18, 21).

Clase	Nombre
Dihidrochalconas	floretina, floretina-2- <i>O</i> -glucósido, floretina-2- <i>O</i> -xilósil-glucósido, floretina-pentosil-hexósido, floretina-hexosil-hexósido, 3-hidroxifloretin-2'- <i>O</i> -xilósil-glucósido, 3-hidroxifloretina-2'- <i>O</i> -glucósido, floridzina, 3-hidroxifloridzina
Flavanoles	(+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B1, procianidina B2, procianidina B3, procianidina B5, procianidina C1, ((epi)cat) trímero ((epi)cat) tetrámero
Flavonas	apigenina, crisoeriol, luteolina, luteolina-7- <i>O</i> -galactósido, luteolina-7- <i>O</i> glucósido
Flavanonas	eriodictiol, eriodictiol-hexósido, hesperidina- <i>O</i> -pentósido, naringenina, naringenina-7- <i>O</i> -glucósido, naringenina-7- <i>O</i> -neohesperidósido, naringenina-7- <i>O</i> -rutinósido, naringenina- <i>O</i> -glucurónido, naringenina- <i>O</i> -hexósido
Flavonoles	isoramnetina-3- <i>O</i> -galactósido, isoramnetina-3- <i>O</i> -glucósido, isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinósido, isoramnetina-3- <i>O</i> -arabinopiranosido, isoramnetina-3- <i>O</i> -arabinofuranósido, isoramnetina-3- <i>O</i> -ramnósido, kaempferol- <i>O</i> -glucósido, quercetina, quercetina 3- <i>O</i> -diglucósido quercetina-3- <i>O</i> -arabinofuranósido, quercetina-3- <i>O</i> -arabinopiranosido, quercetina-3- <i>O</i> -galactósido, quercetina-3- <i>O</i> -glucósido, quercetina-3- <i>O</i> -ramnósido, quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido (rutina), quercetina-3- <i>O</i> -xilanósido, quercetina- <i>O</i> -hexósido, quercetina- <i>O</i> -pentosil-hexósido, quercetina- <i>O</i> -pentósido, quercetina- <i>O</i> -xilósil-pentósido, ramnetina, ramnetina-3- <i>O</i> -glucósido
Ácidos hidroxicinámicos	ácido cafeico- <i>O</i> -hexósido ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (ácido clorogénico), ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido <i>x</i> - <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido dicafeoilquínico ácido ferúlico, ácido ferulico- <i>O</i> -hexósido ácido <i>p</i> -cumárico, ácido <i>p</i> -cumárico- <i>O</i> -hexósido, ácido 4- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroilquínico, ácido 5- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroilquínico, ácido <i>p</i> -cumaroilquínico, ácido sinápico- <i>O</i> -glucósido
Antocianinas	cianidina-3- <i>O</i> -galactósido, cianidina-3- <i>O</i> -hexósido
Otros	Ácido protocatéquico, ácido salicílico

La extracción de polifenoles es un campo ampliamente investigado. Debido a su baja concentración en la biomasa de manzana se requiere maximizar los rendimientos de extracción. La recuperación de compuestos fenólicos depende tanto del agente de masa escogido como también de la técnica implicada (18). Los métodos convencionales de extracción corresponden a maceraciones con agitación o extracción Soxhlet con solventes, como agua pura o soluciones acuosas de metanol, etanol, etilacetato, diclorometano y acetona. Entre los factores más significativos durante la extracción se encuentra el solvente utilizado, el tiempo de extracción, la temperatura, la relación sólido-líquido y el tamaño de partícula. Se investiga también la utilización de técnicas no convencionales que permitan mejorar los rendimientos obtenidos en las extracciones convencionales como son la extracción asistida por enzimas, por fluidos presurizados, asistida por microondas, asistida por ultrasonidos, por fluidos supercríticos y la asistida por campos eléctricos (15). Por ejemplo, en una extracción convencional donde se utiliza agua, por 37 min, a 100 °C, con una relación sólido/líquido de 1:100 g/mL se obtiene 834,1 mg GAE/100 g de biomasa seca, expresado como ácido gálico equivalente (GAE), mientras que en una asistida por microondas, utilizando etanol 60%, por 147 s, con 735 W, con una relación sólido líquido de 1:10,3 g/mL, se obtiene 1580 mg GAE/100 g, esta significativa diferencia es claro indicador que se debe escoger adecuadamente las condiciones y la técnica aplicada (18).

En los siguientes apartados se profundizará respecto al enfoque de revalorización que se adopta en el presente trabajo enmarcado en el proyecto ULTREIA, este corresponde a la conversión de bagazo de manzana en biobutanol mediante la fermentación ABE que emplea bacterias anaerobias del género *Clostridium*.

### 1.3. Biocombustible

Como se ha indicado, existe incertidumbre respecto la futura disponibilidad de recursos fósiles frente a una población en crecimiento con cada vez mayores demandas energéticas. Además, la quema de combustibles derivados del petróleo como fuente de energía y calor, es

responsable de la mayor contribución de GHG a la atmósfera, que a su vez ha provocado el cambio climático, el problema medioambiental de escala global más importante al que la sociedad humana se ha enfrentado. Estas dos razones han llevado a la búsqueda de fuentes de energía alternativas, renovables, sustentables, eficientes y económicamente rentables con menos emisiones. Entre estas opciones se encuentran los biocombustibles, el hidrógeno, el gas natural y el gas de síntesis, los cuales destacan como soluciones estratégicas para un futuro sostenible. De estas, los biocombustibles destacan como la fuente de energía más amigable con el medio ambiente, debido a su carácter renovable, biodegradable y que genera gases de escape de calidad aceptable. Además, la producción de biocombustibles de forma local, independiza a las comunidades del suministro, transporte y precios fluctuantes del mercado del petróleo, lo cual también se interpreta como una ventaja (22).

Los biocombustibles se pueden definir como cualquier combustible sólido, líquido o gaseoso producido fundamentalmente a partir de biomasa, entre estos se encuentra el etanol, metanol, butanol, biodiesel, biohidrógeno, metano, entre otros (22). Se caracterizan porque al ser empleados como recurso energético, las emisiones de CO<sub>2</sub> generadas son de tipo biogénico, por lo tanto, no son consideradas como GHG, debido a que el dióxido de carbono se desplaza a través de un ciclo virtuoso, donde se fija desde el aire en la matriz lignocelulósica de la biomasa mediante la fotosíntesis, es convertido en biocombustible mediante diferentes técnicas o procesos y, finalmente, vuelve a la atmósfera una vez que se combustiona para comenzar el ciclo una vez más.

Existe una distinción entre biocombustibles primarios y secundarios, que radica en el nivel de procesamiento al que es sometida la biomasa. Los de tipo primario se encuentran sin tratar o escasamente procesados como es el caso de la leña, los chips de madera o los pellets, corresponde a la combustión directa de la biomasa para generación de calor o electricidad. De forma contraria, los de tipo secundario son preparados mediante la conversión de la biomasa en otro tipo de sustancia mediante algún proceso bioquímico o termoquímico como es el caso del etanol, biodiésel, DME o el biogás. A su vez, los biocombustibles secundarios pueden clasificarse en base al tipo de biomasa que se emplea para su fabricación, como se representa en la Figura 6. Los biocombustibles de primera generación son producidos a partir de cultivos energéticos como diversos tipos de cereales, granos y semillas, ricos en almidón o aceites, entre ellos el trigo, la cebada, el maíz, la colza o girasol, al igual que azúcares provenientes de caña de azúcar, remolacha azucarera o patata. Debido a que, de toda la planta solamente se aprovecha el germen de la semilla, este tipo de proceso deja de lado una significativa cantidad de residuos vegetales que no se aprovechan (22).

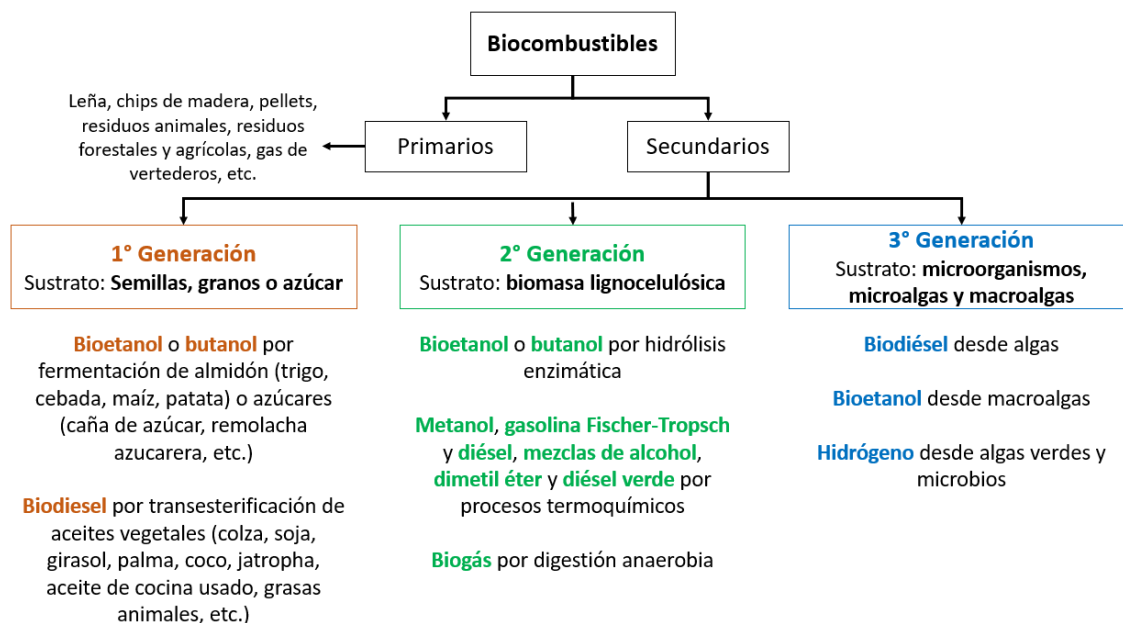


Figura 6. Clasificación y ejemplos de biocombustibles según el tipo de materia prima utilizada. Adaptado de (22).

Los biocombustibles de 1<sup>era</sup> generación, como el bioetanol o biodiésel, ya se producen de forma significativa en una amplia variedad de países, sin embargo, presentan importantes desafíos a superar relacionados fundamentalmente con el uso de suelos y la relación con el mercado alimentario. Dado que se emplea solo una pequeña fracción de la masa vegetal para síntesis del combustible, el rendimiento de la tierra cultivada es particularmente bajo. Debido a que generan un incremento en la demanda de cultivos energéticos, que son la base alimentaria de muchas sociedades, se tiende a elevar sus precios, alterando el comportamiento normal del mercado y afectando negativamente a los consumidores, esto promueve el interés por hacer uso de biomasa no comestible y que utilice la totalidad de la especie vegetal. Siguiendo este principio, los biocombustibles de 2<sup>da</sup> generación son elaborados a partir de biomasa lignocelulósica que corresponden a los restos no comestibles de cultivos energéticos como la paja, tallos y hojas residuales, pero también, plantas completas como pastos y árboles especialmente cultivados para la producción energética (22).

Este tipo de biocombustible presenta diversas ventajas como no competir con el mercado de los alimentos, se incrementa la productividad de los suelos cultivados y aumenta el rendimiento de biomasa que es convertida en biocombustible. Sin embargo, requieren procesos de transformación más sofisticados, por ejemplo, la matriz lignocelulósica debe ser fraccionada mediante un apropiado pretratamiento antes de realizar la conversión en biocombustible, se necesita más inversión por unidad de producción e instalaciones más grandes para poder compensar los costes de capital. Las dos categorías estudiadas promueven el agotamiento de los recursos hídricos, aceleran la deforestación de los bosques y generan preocupación respecto de los cambios y competencias en el uso de suelos, lo que ha llevado a investigar biocombustibles de 3<sup>era</sup> generación que emplean microorganismos que pueden acumular altas concentraciones de ácidos grasos en su interior como diversas especies de bacterias, hongos y microalgas. Por ejemplo, se han logrado identificar microalgas capaces de sintetizar 100 veces más aceite que cualquier otra planta, incluso que la soja, esto demuestra el gran potencial de este tipo de materia prima, que requiere mayores niveles de desarrollo para su eventual puesta en marcha (22).


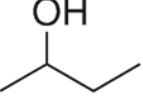
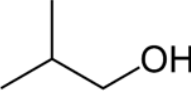
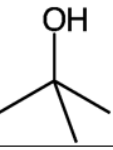
El mercado de los biocombustibles se encuentra en pleno auge. Se estima que entre 1980 y 2005, la producción global de biocombustibles aumentó en un orden de magnitud, desde 4,4 a

50,1 billones de litros, y se esperan notables crecimientos en los próximos años (22). El caso de la Unión Europea (UE) no es diferente, depende fundamentalmente del petróleo y gas transportado desde países política y económicamente inestables, un ejemplo de ello es que gran parte de su sistema de transporte se encuentra basado en el diésel. Esto ha llevado a que exista un amplio interés en la promoción y producción de energía renovable, entre la que se encuentra la opción de los biocombustibles. Se persiguen tres objetivos estratégicos: el combate contra el cambio climático, la reducción de la dependencia externa de la UE de los hidrocarburos importados, y la promoción del crecimiento y la creación de empleos, consolidando fuentes de energía seguras y asequibles a los consumidores (23). Un ejemplo de ello es que en marzo de 2007 el Consejo Europeo publicó la directiva que obliga a los estados miembros a alcanzar el objetivo mínimo de 10% de biocombustibles en el sector de transportes para el año 2020 (24).

En la UE solamente se utilizan como biocombustibles el biodiesel, alcanzando el 76%, y producido a partir de aceites vegetales, y bioetanol llegando al 20%, derivado fundamentalmente de cultivos energéticos como el trigo, la caña de azúcar, el maíz, almidón y en menor medida desde madera y paja, ya en menor medida se encuentra el biogás sintetizado en Polonia, Alemania y otros países europeos fundamentalmente del maíz. El bioetanol puede ser utilizado hasta en una mezcla de 5% con combustibles fósiles sin tener que realizar modificaciones a los motores, esto según la norma de calidad EN228, y para alcanzar mayores concentraciones de etanol en el combustible, como puede ser E85, es decir, 85% de etanol, esta modificación se vuelve estrictamente necesaria. En el año 2012, se calcula que toda la superficie de terrenos de cultivo en la UE utilizada para la producción de biocombustibles fue de 4,4 millones de hectáreas, lo que representa un 3% de todas las áreas cultivables (23). En el año 2020 se estima que el mundo produjo cerca de 130,7 billones de litros de bioetanol y 40,3 billones de litros de biodiésel, si se observa el caso de la Unión Europea, se elaboraron 7,2 billones de litros de bioetanol y 14 billones de litros de biodiésel, lo que representa 5,57% y 34,93% respectivamente de la producción mundial, lo que permite clasificarlo como uno de los actores protagonistas en el mercado de los biocombustibles (25).

El biocombustible de interés para el actual trabajo corresponde al biobutanol, es decir, butanol obtenido desde fuentes renovables como es el caso de la biomasa. Corresponde a un alcohol primario de estructura lineal cuya fórmula química corresponde a  $C_4H_9OH$  conocido como *n*-butanol, 1-butanol o de forma sistemática como butan-1-ol. Existen cuatro isómeros estructurales para esta molécula orgánica, ilustrados en la Tabla 5, de los cuales, el *n*-butanol, isobutanol y *tert*-butanol pueden utilizarse como aditivos en combustibles fósiles, sin embargo, solamente el *n*-butanol es el más prometedor para su uso como biocombustible ya que puede mezclarse fácilmente en una alta proporción con gasolina, sin requerir ningún tipo de modificación a los convencionales motores de ignición. Otra interesante aplicación es su capacidad para ser mezclado con diésel, lo que permitiría reducir las emisiones, fundamentalmente de hollín, debido a su mayor contenido de oxígeno. Además, presenta un más alto calor de vaporización que el ampliamente utilizado etanol, lo que es beneficioso porque permite reducir la temperatura de combustión y dificulta la generación de compuestos  $NO_x$ , indeseados por sus perjudiciales efectos a la salud y el medio ambiente (26).

Tabla 5. Isómeros estructurales del butanol: características generales y principales aplicaciones. Adaptado de (26).

Isómero de butanol	Estructura molecular	Principales aplicaciones	Características específicas
1-butanol ( <i>n</i> -butanol)		Solventes (industria de pinturas) Plastificantes (industria de plásticos) Líquido de frenos hidráulico Cosméticos	Aditivo en gasolinas  Potencial combustible alternativo
2-butanol		Solvente (diversas industrias) Agente de limpieza doméstica Limpiador industrial y decapante	Perfumes y sabores artificiales
<i>iso</i> -butanol		Solvente y aditivo (industria de pinturas) Limpiador industrial y decapante Ingrediente de tintas	Aditivo en gasolinas
<i>tert</i> -butanol		Solvente Limpiador industrial y decapante Intermediario para MTBE, ETBE, TBHP	Aditivo en gasolinas y potenciador de octanaje  Denaturalizante de etanol

Nomenclatura: MTBE, metil *tert*-butil éter; ETBE, etil *tert*-butil éter; TBHP, *tert*-butil hidroperóxido

El *n*-butanol presenta una serie de propiedades y características que otorgan ventajas y desventajas frente a los combustibles tradicionales y frente los biocombustibles, estas son resumidas en la Tabla 6. Respecto de su potencial uso como fuente de energía, resulta favorable su alto calor de combustión, este valor se incrementa a medida que una molécula tiene un mayor número de átomos de carbono, en este caso, el butanol presenta el doble que el etanol, lo que se traduce en un mayor nivel de densidad energética por volumen. De esta forma un motor que utilice butanol requerirá un menor consumo de combustible o bien, un mejor kilometraje, si es comparado con otro que funcione con etanol. Otra propiedad interesante corresponde a su baja volatilidad, de forma inversa, la volatilidad de los alcoholes disminuye a medida que se incrementa el número de carbonos, lo que se traduce en una menor tendencia a la vaporización. Si a esta situación, se añade que presenta un mayor punto de inflamabilidad que el etanol, se obtiene que el *n*-butanol es eventualmente más seguro para su utilización a altas temperaturas y para su transporte (26).

Tabla 6. Propiedades físicas y químicas de algunos alcoholes y combustibles fósiles tradicionales. Adaptado de (26).

	Gasolina	Diesel	Metanol	Etanol	<i>n</i> -butanol
Fórmula molecular	C <sub>4</sub> -C <sub>12</sub>	C <sub>12</sub> -C <sub>25</sub>	CH <sub>3</sub> OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH
Peso molecular	111,19	198,4	32,4	46,06	74,11
Número de cetano	0-10	40-55	3	8	25
Número de octano	80-99	20-30	111	108	96
RON	88-98	0	109	109	98
MON	80-88	0	89	90	85
Contenido de oxígeno (% peso)	-	-	50	34,8	21,6
Densidad (g/mL) a 20 °C	0,72-0,78	0,82-0,86	0,796	0,79	0,808
Temperatura de Autoignición (°C)	300	210	470	434	385
Punto de inflamabilidad (°C) a taza cerrada	-45 a -38	65-88	12	8	35
Calor de combustión (MJ/kg)	42,7	42,5	19,9	26,8	33,1
Punto de ebullición (°C)	25-215	180-370	64,5	78,4	117,7
Ratio estequiométrico	14,7	14,3	6,49	9,02	11,21
Calor latente (kJ/kg) a 25 °C	380-500	270	1109	904	582
Límite de inflamabilidad (% vol.)	0,6-8	1,5-7,6	6,0-36,5	4,3-19	1,4-11,2
Presión de saturación (kPa) a 38 °C	31,01	1,86	31,69	13,8	2,27
Viscosidad (mm <sup>2</sup> /s) a 40 °C	0,4-0,8	1,9-4,1	0,59	1,08	2,63
Densidad energética (MJ/L)	32	35,86	16	19,6	29,2

Nomenclatura: RON, Research Octane Numer;MON, Motor Octane Number.

Entre las principales ventajas de la utilización de butanol como combustible está que utilizarse en altas concentraciones en los motores convencionales de chispa sin inconvenientes. Además, debido a que el calor de vaporización tiene un valor menor que el etanol o metanol, de esta forma se esperan menos problemas para un arranque del motor en frío. Por otro lado, derivado de un mayor número de átomos de carbono, el *n*-butanol presenta una mayor afinidad por las sustancias orgánicas, como la gasolina, y menor afinidad por el agua e higroscopicidad, lo que facilita su mezclado y previene la contaminación del biocombustible con agua durante su fase de distribución. También derivado de su estructura química, el 1-butanol presenta mayor viscosidad y lubricidad que los demás alcoholes comparados, de esta forma, el biocombustible podría proteger diversas partes del motor que están sometidas a desgaste como bombas, rieles e inyectores (26).

Sin embargo, la utilización de *n*-butanol también presenta una serie de desafíos, entre ellos se encuentra que al presentar un menor calor de combustión que los combustibles fósiles, el desempeño del motor será menor que con las gasolinas tradicionales. Además, implicará un mayor consumo, debido a que se deberá inyectar una mayor cantidad de biocombustible por cada ciclo de operación. Si bien el butanol presenta un similar número de octano que las bencinas convencionales, valor que se relaciona con la capacidad antidetonante de la sustancia, es menor si se compara con el etanol, lo que se traduce en un menor ratio de compresión, y por lo tanto, una menor eficiencia en el funcionamiento del motor, tanto en ciudad (RON) como carretera (MON) (26).

Si se compara el índice de cetano, que guarda relación con el tiempo que transcurre entre la inyección del carburante, la gasolina, y el comienzo de la combustión, se observan menores valores para el *n*-butanol si es comparado con el diésel lo que reduce la autoignición y potencialmente perjudica el control de la combustión. Esto se debe a que cuanto más elevado sea el número de cetano, menor es el retraso en la ignición y mejor es la calidad de la combustión. No obstante, la principal desventaja del biobutanol no se relaciona con sus propiedades como

combustible, sino con su fabricación, debido a que las fermentaciones que lo generan presentan valores particularmente bajos de producción si es comparada con la bien establecida fermentación que produce etanol, que tiene una tasa de producción entre 10 a 30 veces mayor, siendo un importante reto que mejorar desde el punto de vista biotecnológico.

Se estima que el mercado mundial de 1-butanol presenta un tamaño de más de 2,8 millones de toneladas producidas anualmente, lo que equivale a un valor de aproximadamente 5 billones de dólares, con una tasa de crecimiento anual de 3,2%, concentrándose su demanda en América del Norte con un 28% del mercado, Europa Occidental con un 23% y el Nordeste Asiático con un elevado 35% (27). Su importancia no radica solamente, en aplicaciones convencionales, presentadas en la Tabla 5, como solvente en pinturas, plastificantes o aditivo en gasolinas, en los que es un bloque de construcción para ésteres de acrilato y metacrilato, éteres de glicol, acetato de butilo y diversos polímeros de amplia aplicación industrial, sino que también en la perspectiva futura de ser utilizado como biocombustible.

En la actualidad la mayor parte del *n*-butanol es obtenido de forma sintética derivado de la actividad petroquímica, mediante un proceso bien establecido denominado proceso oxo basado en la hidroformilación del propileno (26). Esto se traduce en la adición de hidrógeno y un grupo formil a el doble enlace carbono-carbono del propileno, empleando monóxido de carbono e hidrógeno, obteniéndose *n*-butiraldehído e isobutiraldehído gracias al uso de catalizadores de cobalto y rodio a alta presión. A continuación, se hace uso de catalizadores de níquel con el fin de hidrogenar dichos aldehídos, resultando en la formación de *n*-butanol e *iso*-butanol (28). Los costes de producción y disponibilidad de butanol van de la mano con los del propileno al ser su materia prima de partida, el propileno a su vez depende fuertemente del precio del petróleo, ya que se obtiene por la termólisis de este material, por lo tanto, en el *status quo* en que nos encontramos el butanol se encuentra completamente supeditado al crudo. Sin embargo, uno de los nuevos paradigmas hacia los que se desplaza nuestra sociedad corresponde a la emancipación de los recursos fósiles y sus derivados, tanto por razones medioambientales como también, sociales y económicas, por ello la obtención de butanol desde fuentes renovables, como es el caso del bagazo de manzana, cobra nuevamente un especial significado (26).

#### 1.4. Fermentación ABE

El mecanismo por el cual se pretende obtener el biobutanol, es mediante la fermentación Acetona-Butanol-Etanol, mejor conocida como ABE. A pesar de haber captado el interés de investigadoras e investigadores en las últimas décadas, sus orígenes se remontan incluso hasta la segunda mitad del siglo XIX. La producción de *n*-butanol mediante fermentación microbiana se remonta al año 1861 siendo reportada por el propio Louis Pasteur. Entre las décadas de 1860 hasta 1910 se llevaron a cabo importantes avances en el reconocimiento de los microorganismos productores de butanol y acetona, hasta que en el año 1911 Jaim Weizmann, investigador de la Universidad de Manchester, aisló una bacteria anaerobia que posteriormente se denominó *Clostridium acetobutylicum*. Con ella se diseñó un proceso que presentaba altos rendimientos para generar butanol y acetona a partir de diversos sustratos ricos en almidón, fermentación que finalmente se patentó en 1915 (29).

El proceso cobra importancia, a partir de la Primera Guerra Mundial, donde se instalan plantas en Reino Unido, Canadá y Estados Unidos que se basan en el proceso Weizmann para la producción de acetona, como precursor para formar cordita, un tipo de pólvora empleado en la guerra. Durante el periodo de entreguerras la patente expiró y con la llegada de la Segunda Guerra Mundial en el año 1939, la demanda de acetona volvió a incrementarse y nuevas plantas de ABE

fueron construidas en Japón, India, Australia, China, URRS y Sudáfrica, además de expandirse en los países existentes. Sin embargo, con el desarrollo de la industria petroquímica a comienzos de los años 1950, y por lo tanto, con el descubrimiento de la producción sintética de butanol a partir de los derivados del petróleo, la industria basada en la fermentación comenzó a decaer por el efecto combinado de un menor precio de los solventes debido al incremento en la oferta, y además por el alza en el precio de las melazas, la materia prima empleada para el crecimiento bacteriano (29).

Casi un siglo de perfeccionamiento de la química del petróleo acabó casi totalmente con la industria basada en ABE, y afianzó la producción del *n*-butanol petroquímico a gran escala como precursor de una diversa serie de compuestos para un amplio rango de industrias. Finalmente, desde la década de los 2000, la fermentación ABE ha atraído una renovada atención como un mecanismo para generar compuestos químicos desde recursos renovables, fuentes de energía amigables con el medio ambiente y como una oportunidad para disminuir o acabar con la dependencia de los recursos fósiles (29).

Los solventes butanol, acetona y etanol son formados naturalmente por un amplio número de especies del género *Clostridium*, como son *C. saccharoacetobutylicum*, *C. aurantibutyricum*, *C. pasteurianum*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* o *C. tetanomorphum*, sin embargo, destacan por su capacidad solventogénica las especies *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum*, y *C. saccharoperbutylacetonicum*, por ello son las más utilizadas para las investigaciones relacionadas con ABE. En términos generales, corresponden a bacterias anaerobias estrictas, grampositivas, con forma de bacilo y capaces de formar esporas. Se caracterizan por ser capaces de metabolizar una amplia variedad de sustratos desde monosacáridos, como hexosas y pentosas, hasta polisacáridos como el almidón. En términos generales, no son capaces de sintetizar enzimas con actividad celulolítica, por lo que no pueden utilizar directamente la celulosa como fuente de carbono y energía. Por ello es esencial un pretratamiento ácido o enzimático que promueva la hidrólisis de este material si se quiere revalorizar biomasa de tipo lignocelulósica (30).

Desde un punto metabólico, estas bacterias son clasificadas como quimioorganoheterótrofas debido a que utilizan compuestos orgánicos, en ese caso diversos tipos de azúcares, como fuente de energía, carbono y equivalentes reductores para las reacciones de biosíntesis. Su crecimiento se divide en dos fases, una acidogénica seguida de otra solventogénica, cada una con un comportamiento metabólico diferente y asociada a una evolución en la morfología de la célula (29). Durante la fase acidogénica, el microorganismo mantiene un crecimiento exponencial y produce ácidos acético y butírico, a medida que consume el sustrato, por ello se evidencia también una disminución en el valor del pH. A continuación, la acumulación de ácidos orgánicos y disminución de pH llegan a un punto crítico que desencadena el cambio hacia la fase solventogénica mientras las células se encuentran en fase estacionaria. En esta fase, la bacteria con el fin de detoxificar el ambiente que le rodea, vuelve a asimilar los ácidos convirtiéndolos en los solventes acetona, butanol y etanol, siguiendo una proporción de 3:6:1 respectivamente, comportamiento que se representa en la Figura 7.A (31).

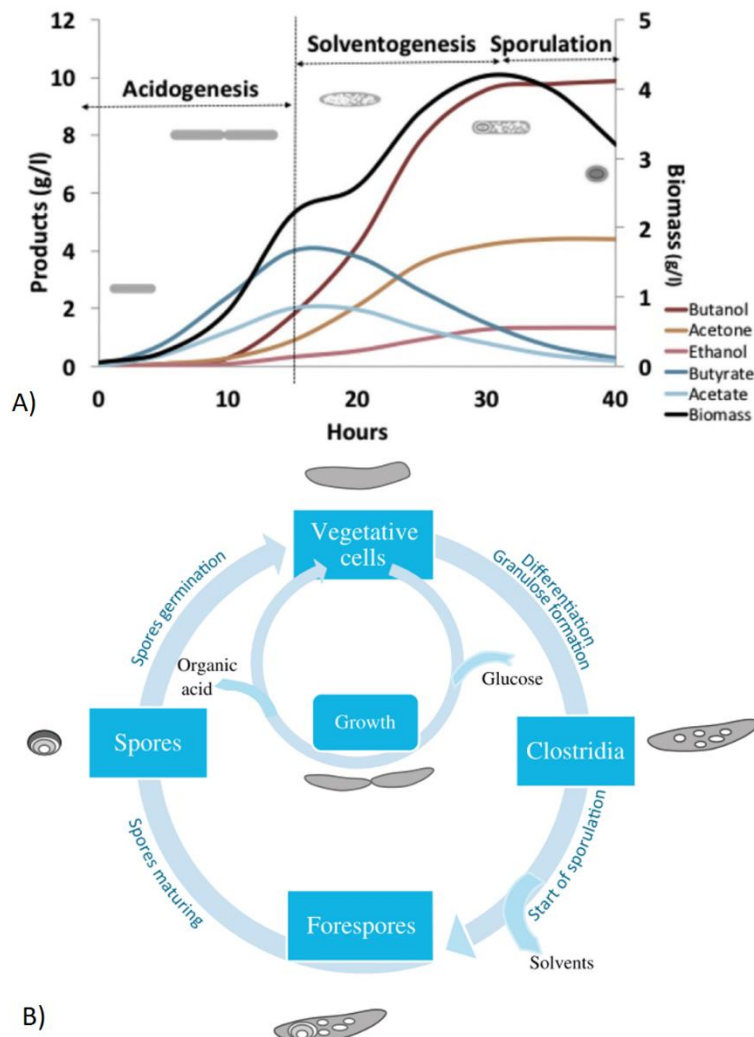


Figura 7.A. Perfiles de crecimiento celular, formación de productos y diferenciación celular de *Clostridium acetobutylicum* durante el desarrollo de un cultivo batch de ABE (31). B. Ciclo celular de las bacterias productoras de solvente del género *Clostridium* (29).

Desde el punto de vista de la morfología celular, también representado en la Figura 7.B, las células vegetativas en crecimiento, durante la fase acidogénica, evolucionan hacia la forma denominada clostridia. A medida que el ambiente se torna adverso por la acumulación de ácidos, esa forma inicia el proceso denominado diferenciación en el que, como mecanismo de defensa, las células forman gránulos que posteriormente utilizan como reserva de carbono y energía. Una vez que se ha alcanzado la fase estacionaria y se produce el *switch* metabólico, las células en estado clostridial comienzan a convertir los ácidos en solventes mientras que de forma paralela se inicia el proceso de esporulación, en el que los depósitos granulares se emplean como fuente para formación de la endoespora. Finalmente, ocurre el proceso de maduración en donde se termina de desarrollar la espora y esta es liberada desde el interior de la célula, siendo capaz de sobrevivir por largos periodos de tiempo hasta que las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables y se produzca la germinación (32).

Si se estudia el metabolismo de forma más detallada se observa que los azúcares son catabolizados mediante la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) hasta piruvato, y luego transformado en un primer momento en acetil-CoA y CO<sub>2</sub> mediante la enzima piruvato:ferrodoxin oxidorreductasa. Producto de la combinación de dos moléculas de acetil-CoA y la sucesión de

múltiples pasos enzimáticos se obtiene butiril-CoA, ambos intermediarios son fundamentales para el metabolismo de *Clostridia*, debido a que pueden convertirse en ácidos o solventes, dependiendo de la fase en que se encuentre la bacteria. Como resultado de esta vía glicolítica, se generan ATP, principal molécula de transferencia energética, y NADH, como poder reductor a partir de NAD<sup>+</sup>. Las moléculas de ATP son consumidas en las vías biosintéticas o anabólicas de la célula, mientras que el NAD<sup>+</sup> debe ser regenerado para que el consumo de azúcares pueda continuar. La producción de ácido acético es la opción más favorable para la producción de ATP, mientras que la síntesis de ácido butírico permite reoxidar parte del NADH. El resto de poder reductor es consumido mediante la enzima hidrogenasa que permite combinar el exceso de protones y electrones generados por el metabolismo con la consecutiva producción de hidrógeno molecular (29).

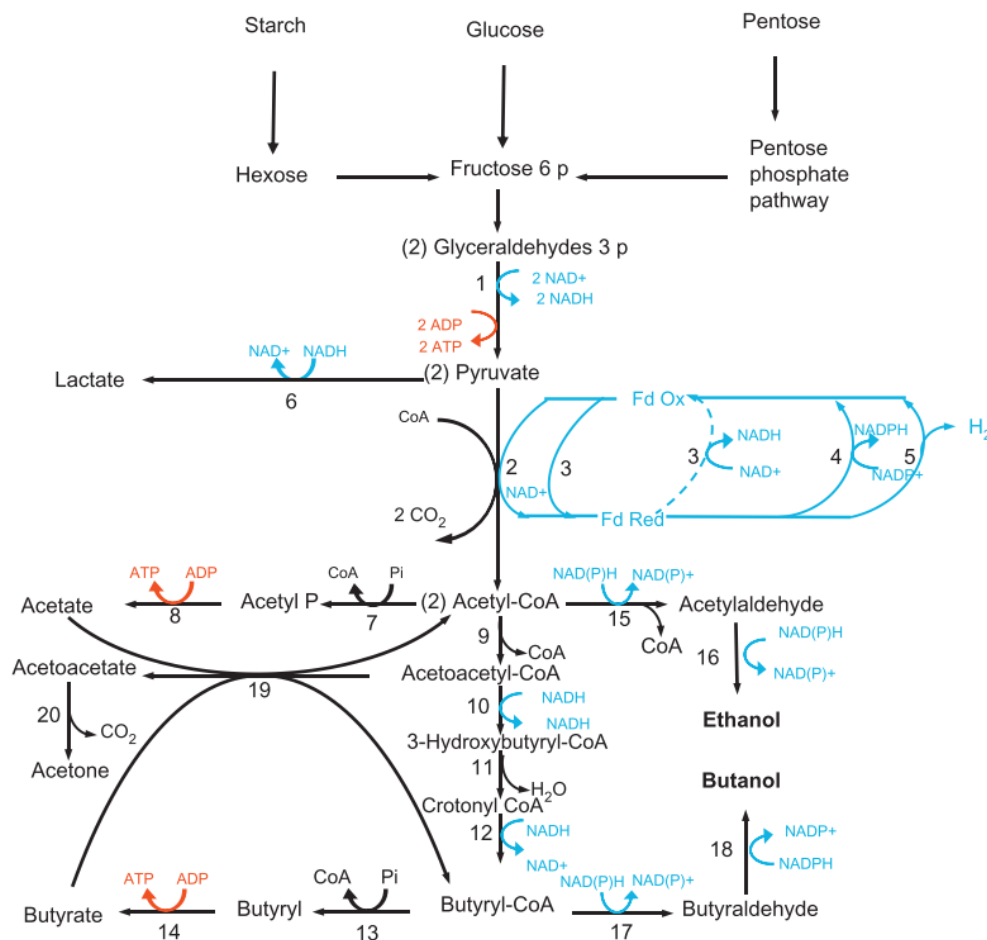


Figura 8. Esquema de las vías catabólicas presentes en el metabolismo de las bacterias productoras de solvente del género *Clostridium*. Se diferencia con código de colores el flujo de carbono con flechas negras y el flujo de electrones con flechas azules. Las enzimas etiquetadas por número corresponden a: 1. Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa, 2. Piruvato-ferredoxina oxidorreductasa, 3. NADH-ferredoxina oxidorreductasa, 4. NADPH-ferredoxina oxidorreductasa, 5. Hidrogenasa, 6. Lactato deshidrogenasa, 7. Fosfato acetiltransferasa, 8. Acetato quinasa, 9. Tiolasa, 10. 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, 11. Crotonasa, 12. Butiril-CoA deshidrogenasa, 13. Fosfato butiltransferasa, 14. Butirato quinasa, 15. Acetaldehído deshidrogenasa, 16. Etanol deshidrogenasa, 17. Butiraldehído deshidrogenasa, 18. Butanol deshidrogenasa, 19. Acetoacetoil-Coa:acetato/butirato:CoA transferasa; 20. Acetoacetato descarboxilasa (29).

Diversos factores influyen para que se produzca un apropiado cambio hacia la fase solventogénica, entre ellos se encuentra el pH extra e intracelular, la concentración de ácidos productos, la limitación de nutrientes, la temperatura y el oxígeno, sin embargo, se ha reportado que el más significativo corresponde a la concentración de ácido butírico no disociado. A medida

que se produce la reutilización de los ácidos y la diferenciación celular, se produce acetoacetato, precursor de la acetona, y de forma paralela ambos ácidos orgánicos son reducidos hacia etanol y butanol mediante sus correspondientes enzimas deshidrogenasas (29).

La fermentación ABE presenta importantes desafíos a superar, el primero de ellos y más importante corresponde a la inhibición por producto que sufren los cultivos de *Clostridium*. Se ha reportado que la inhibición del crecimiento y la síntesis de solventes es parcial cuando la concentración de *n*-butanol llega a 11 g/L y es total cuando se superan los 15 g/L. La toxicidad de este compuesto se explica en que el butanol rompe los enlaces tipo puente de hidrógeno entre fosfolípidos que componen la membrana plasmática generando la pérdida del potencial de membrana e incrementando su fluidez (29). Esto desencadena una alteración en el mantenimiento de la fuerza protón motriz, el pH interno, los niveles de ATP, la absorción de glucosa y una pérdida de actividad de las proteínas integrales de membrana, lo que finalmente se traduce en una reducción de la viabilidad celular (30). Los principales enfoques para incrementar la producción de butanol son por un lado, manipular genéticamente a los microorganismos para aumentar sus niveles de tolerancia, y por otro lado, la implementación de técnicas de remoción de producto *in situ*, como adsorción, absorción, líquidos iónicos, extracción líquido-líquido, entre otras, para remover el butanol del caldo de cultivo mientras es generado (27).

Además de la inhibición por producto, en determinados casos durante el pretratamiento de la biomasa, también se generan una serie de compuestos inhibitorios del crecimiento de las cepas. Algunos de estas sustancias pueden ser formados al realizar una hidrólisis ácida de los componentes lignocelulósicos de la materia prima y pueden incluir furanos, como el furfural o 5-hidroximetilfurfural (HMF), y ácidos orgánicos como ácido fórmico o ácido acético. Sin embargo, ciertas moléculas inhibitorias se encuentran desde el comienzo en la biomasa, este es el caso de diversos compuestos fenólicos. Con el fin de reducir este efecto inhibitorio, se puede adoptar una serie de operaciones de detoxificación del hidrolizado como son la suplementación con glicerol, la adsorción mediante carbón activado o resinas, el *overliming* con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  o  $\text{CaO}$ , o bien realizar una extracción previa a la fermentación en el caso de los polifenoles, que permiten incrementar la producción de butanol (33).

Un segundo inconveniente corresponde a la degeneración de la cepa, esto es, la pérdida de capacidad de las células para producir los solventes a medida que estas se enfocan en el proceso de esporulación. Es el resultado de una serie de cambios genéticos que ocurren al mantener las cepas de *Clostridia* en estado vegetativo por prolongados periodos de tiempo en un mismo cultivo o al realizar cultivos en serie, lo que provoca una paulatina disminución en la productividad de butanol a medida que se acumulan las células degeneradas en la fermentación. Por ello, cobra especial importancia la mantención de un banco celular en buen estado, para llevar a cabo las fermentaciones que sean necesarias y evitando llegar al proceso de degeneración. En tercer lugar, la infección de las bacterias por virus de tipo bacteriófago es otra importante problemática que sufren este tipo de cultivos, para ello se deben maximizar las condiciones de limpieza y esterilidad, con el fin de evitar la contaminación. Para evitar esta situación se han evaluado procesos de selección y aislamiento de mutantes que presenten mayores niveles de resistencia a la infección (30).

El cuarto elemento para considerar en el cultivo de *Clostridium* corresponde al fenómeno llamado *acid crash* que ocurre justo entre la transición entre acidogénesis y solventogénesis. Ocurre cuando en una fermentación se pierde el control del pH, que a su vez provoca un detenimiento en el consumo de sustrato, la producción de ácidos y de butanol. Se ha observado que la sobreproducción de ácidos orgánicos sin disociar, con una concentración mayor a 60 mM,

con un bajo pH pueden corresponder a las causas principales del *acid crash*. Sin embargo, se requiere una concentración mínima de ácido butírico sin disociar de 1,5 g/L para dar comienzo a la solventogénesis, por lo tanto, es importante encontrarse dentro de dicho rango para que la fermentación sea exitosa. De todas formas, aún se desconocen varios aspectos como a) el pH exacto en el que ocurre el *acid crash*, b) a qué pH producción de butanol será la principal, c) a qué pH se impondrá la generación de ácido butírico. Lo que sí se conoce, es que el control del pH juega un rol fundamental en la producción de butanol. Entre las estrategias que existen para regularlo se encuentra la neutralización con NaOH a medida que pasa el tiempo, la suplementación del medio de cultivo con CaCO<sub>3</sub> y la utilización acetato de sodio (HOAc/NaOAc) como tampón (34).

Existe una considerable cantidad de trabajos en los que se emplea biomasa lignocelulósica como materia prima para la síntesis de biobutanol mediante fermentación ABE (22, 29, 30, 35), entre las que se encuentran: paja de arroz, paja de cebada, pulpa de remolacha azucarera, tallo de maíz, bagazo de caña de azúcar, madera de pino, madera de olmo, paja de trigo, microalgas, lodo de molienda de papel, eucaliptus, bagazo dulce de sorgo, torta de palmiste, rastrojo de maíz, grano gastado de la cerveza (BSG) y residuo de fibras de algodón. Además, se utilizan diferentes cepas de bacterias: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum*, y *C. saccharoperbutylacetonicum*.

En la Tabla 7 se presentan algunas de las materias primas renovables empleadas como sustrato para la fermentación ABE. Se observa que existe una amplia diversidad de resultados, que dependen de la materia prima utilizada, el proceso utilizado o la cantidad de azúcares iniciales. Los mejores resultados en términos de concentración se obtuvieron con paja de arroz y mazorcas de maíz, probablemente debido a la detoxificación. Los mayores rendimientos y productividades se obtuvieron también con maíz, mientras que con paja de arroz los solventes se producen a una velocidad sustancialmente menor, debido quizás a la utilización de ácidos en el pretratamiento y a la baja concentración de azúcares. Los resultados de la Tabla 7 muestran que múltiples variables afectan a la fermentación ABE tales como la composición de la materia prima, la presencia de compuestos inhibidores, la concentración inicial de sustrato, el tipo de pretratamiento, el control de pH, la temperatura, la modalidad de operación, entre otras.

Tabla 7. Comparación de la producción de biobutanol mediante fermentación a partir de materias primas lignocelulósicas en las que se emplearon diferentes tipos de pretratamiento. Adaptado de (29).

Sustrato	Pretratamiento	Hidrólisis enzimática		Detoxificación	Fermentación	Producción de ABE		
		Sólido cargado (g/L)	Azúcares iniciales (g/L)			Cultivo	ABE (g/L)	Rendimiento (g ABE/g Azúcar)
Rastrojo de maíz	Peroxidación alcalina	100	53,5	Si	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	12,1	0,3	0,17
Rastrojo de maíz	Alcali	100	49,5	No	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	15,4	0,41	0,21
Mazorcas de maíz	Explosión con vapor	111,5	57,2	Si	<i>C. acetobutylicum</i> IFP 193	20,5	0,31	0,45
Rastrojo de maíz	Explosión con vapor	100	53,5	Si	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	12,4	0,3	0,17
Rastrojo de maíz	Etanol organosolv	80	23,6	No	<i>C. acetobutylicum</i> NRRL B-591	10,5	0,44	0,2
Olmo	Etanol organosolv	80	23,2	No	<i>C. acetobutylicum</i> NRRL B-591	11,6	0,5	0,2
Pino	Etanol organosolv	50	9,6	No	<i>C. acetobutylicum</i> NRRL B-591	4,8	0,5	0,08
Bagazo de sorgo dulce	Acetona organosolv	50	36,3	No	<i>C. acetobutylicum</i> NRRL B-591	11,4	0,31	0,25
Pino	Autohidrólisis	50	21	No	<i>C. acetobutylicum</i> NRRL B-591	6	0,28	0,09
Paja de Arroz	Ácido diluido	80	39,9	Si	<i>C. acetobutylicum</i> NCIM 2337	20,6	0,52	<0,08
Mazorcas de maíz	Molienda de disco húmedo	50	39,7	No	<i>C. acetobutylicum</i> SE-1	14,1	0,36	0,2

El bagazo de manzana se ha utilizado también como sustrato para la fermentación ABE. Hijosa-Valsero *et al.* (35) estudiaron diferentes técnicas de pretratamiento para liberar los azúcares que contenía el bagazo: autohidrólisis, ácidos, álcalis, solventes orgánicos y surfactantes. Luego, todas las muestras fueron sometidas a un tratamiento enzimático con celulasas,  $\beta$ -glucosidasas y hemicelulasas. Observaron que el pretratamiento que generaba la menor cantidad de compuestos inhibidores corresponde a surfactante poli-etilenglicol 6000 1,96% w/w obteniéndose una concentración de azúcares de 42 g/L a pH 6 y 35 °C. Tras 96 h de fermentación con *Clostridium beijerinckii* CECT 508 se obtuvieron 3,55 g/L de acetona, 9,11 g/L de butanol y 0,26 g/L de etanol, con un consumo de azúcar del 91%, demostrando que es posible optimizar las condiciones durante el pretratamiento con el fin de minimizar la concentración de inhibidores.

Por otro lado, Jin *et al.* (36) evaluaron la producción de *n*-butanol a partir de bagazo de manzana estudiando la extracción de azúcares con agua caliente (WWS) y los pretratamientos con ácidos (ACHS) y álcalis (ALHS), seguidos de hidrólisis enzimática con celulasas y pectinasas. Los cultivos que combinaban la extracción con alguno de los pretratamientos presentaron los mejores resultados siendo estos 260,1 y 262,2 g ABE/kg de bagazo de manzana seco para WSS+ACHS y WSS+ALHS respectivamente. El microorganismo empleado fue *Clostridium beijerinckii* P260 con condiciones de cultivo de 35 °C, concentración inicial de azúcares de 30 g/L con un tiempo de cultivo de 48 h.

En otro estudio, se evaluaron una serie de pretratamientos, con el fin de liberar azúcares fermentables desde la matriz lignocelulósica, para la producción de biobutanol empleando diferentes residuos agroindustriales. Entre ellos se encontraban los residuos líquidos de la industria cervecera (BLW), grano gastado de cervecera (BSG), residuos sólidos de bagazo de manzana (APS), lodo de ultrafiltración de pulpa de manzana (APUS) y aguas residuales de la industria del almidón (SIW). Para los residuos cerveceros BLW y BSG se empleó una hidrólisis catalizada por ácido obteniendo rendimientos de azúcares totales de 0,433 y 0,68 g/g respectivamente. Por otro lado, se realizó un método hidrotérmico asistido por microondas para el APS y APUS donde se obtuvo rendimientos 0,404 y 0,631 g/g respectivamente, mientras que para la biomasa SIW se aplicó catálisis ácida asistida por microondas con un rendimiento de 0,359 g/g. Se seleccionó el BLW como sustrato para las fermentaciones debido a su alta disponibilidad como materia prima, su mayor nivel nutricional al encontrarse desde un principio enriquecido con levadura y otros micronutrientes y presentar una alta concentración de sólidos. Finalmente, tras 72 h de fermentación con *C. beijerinckii* se obtuvieron 10,62 g/L de ABE en un cultivo a pH inicial de 6,7, 37 °C y con una concentración inicial de azúcares de 52,9 g/L (37).

Un resumen de los trabajos que han empleado bagazo de manzana como sustrato renovable para la producción de butanol se presenta en la Tabla 8. Se aprecian resultados similares en términos de ABE producido, rendimientos o productividad, debido a que se emplean sustratos de similares características, todos son residuos de manzana, y en general se comienza de concentraciones de azúcares de valores equivalentes.

Tabla 8. Comparación de la producción de biobutanol mediante fermentación ABE donde se utiliza bagazo de manzana como sustrato y diferentes técnicas de pretratamiento para la liberación de azúcares reductores. Adaptado de (36).

Cepa	Pretratamiento	Hidrólisis enzimática	Sustrato de la fermentación	Azúcares utilizables (g/L)	ABE producido (g/L)	Productividad ABE (g/L/h)	Rendimiento del solvente (g/g)
<i>C. beijerinckii</i> P260	Ácido sulfúrico (1%, 60 min, 121 °C)	Cellic CTec 2 y pectinasas	Azúcares solubles e hidrolizados	31,9	10,7	0,22	0,34
<i>C. beijerinckii</i> P260	Hidróxido de sodio (2%, 30 min, 121 °C)	Cellic CTec 2 y pectinasas	Azúcares solubles e hidrolizados	29,9	10,8	0,23	0,36
<i>C. beijerinckii</i> P260	-	-	Azúcares solubles	30,5	10,1	0,21	0,33
<i>C. beijerinckii</i> P260	Ácido sulfúrico (1%, 60 min, 121 °C)	Cellic CTec 2 y pectinasas	Azúcares hidrolizados	30,4	9,6	0,1	0,32
<i>C. beijerinckii</i> P260	Hidróxido de sodio (2%, 30 min, 121 °C)	Cellic CTec 2 y pectinasas	Azúcares hidrolizados	28	9,4	0,13	0,34
<i>C. beijerinckii</i> CECT 508	Autohidrólisis (12 min, 142,4 °C)	Cellic CTec 2	Azúcares hidrolizados	38,9	8,3	0,09	0,23
<i>C. beijerinckii</i> CECT 508	HNO <sub>3</sub> (1,83%, 7,3 min, 124,2 °C)	Cellic CTec 2	Azúcares hidrolizados	3,1	0,1	0,001	0,03
<i>C. beijerinckii</i> CECT 508	Acetona (10%, 5 min, 112,1 °C)	Cellic CTec 2	Azúcares hidrolizados	37,4	15,1	0,016	0,42
<i>C. beijerinckii</i> CECT 508	PEG 6000 (1,96%, 5 min, 100,2 °C)	Cellic CTec 2	Azúcares hidrolizados	38,2	12,9	0,13	0,4
<i>C. acetobutylicum</i> NRRL B 596	-	-	Azúcares solubles	33,6	11,4 (A+B)	0,16 (A+B)	0,34 (A+B)
<i>C. butylicum</i> NRRL B 592	-	-	Azúcares solubles	34	13,1 (A+B)	0,18 (A+B)	0,38 (A+B)
<i>C. butylicum</i> NRRL B 593	-	-	Azúcares solubles	32	12,8 (A+B)	0,18 (A+B)	0,4 (A+B)

Nomenclatura: Cellic CTec 2, Celulasas, β-glucosidasas y hemicelulas. A+B, acetona y butanol

El actual trabajo, se basa en la revalorización del bagazo de manzana para la producción de biobutanol mediante la fermentación ABE y se sostiene en el conocimiento y trabajo previo de anteriores estudiantes de máster y doctorado del grupo de biotecnología ambiental de la USC. En la tesis doctoral de Helena Peñas González se estudió la implementación de la fermentación extractiva a la convencional fermentación ABE mediante la extracción líquido-líquido logrando incrementar la producción de butanol al retirar *in situ* dicho compuesto inhibitorio (38). En el TFM de Nicolás Botana se evaluó la utilización de biomasa lignocelulósica pretratada por el proceso organosolv como sustrato para ABE, además de implementar la citometría de flujo para analizar la morfología celular (39). Luego, en el TFM de Inés Prado, ya en el contexto del proyecto ULTREIA, se optimizó la extracción de compuestos fenólicos desde bagazo de manzana, para luego ser hidrolizado y utilizado como sustrato para la fermentación ABE donde se evaluó el efecto del contenido de sólidos (40). De esta forma, se llega al presente Trabajo de Fin de Máster, en donde lo que se desea conocer son las condiciones óptimas de operación para la fermentación ABE utilizando dicho hidrolizado de bagazo de manzana. La producción de ABE por *Clostridium* corresponde a un sistema altamente sensible a las condiciones ambientales como el pH, la temperatura, la concentración de ácidos sin disociar, la presencia de compuestos inhibidores, la composición del medio de cultivo, entre otros factores.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster es la determinación de las condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de carbonato de calcio para la fermentación ABE de *Clostridium beijerinckii* CECT 508 con el fin de maximizar la concentración de butanol, empleando hidrolizado de bagazo de manzana como sustrato.

Como objetivos secundarios se plantea:

-Elaborar el stock celular de *Clostridium beijerinckii* en medio de adaptación a partir de cultivos en placas, con el propósito de obtener un inóculo apropiado para cada fermentación.

-Estudiar el efecto del pH, temperatura y concentración de  $\text{CaCO}_3$  en la producción de butanol mediante fermentación ABE realizando un diseño experimental Box-Behnken (DBB) para tres factores con tres niveles.

-Obtener un modelo matemático con el objetivo de determinar las condiciones óptimas del cultivo para la producción de butanol, mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM).

-Comprobar las condiciones óptimas predichas por el modelo y realizar experimentos complementarios con la finalidad de mejorar su nivel de precisión.

-Obtener una cinética de crecimiento, perfil de pH, consumo de azúcares, producción de ácidos, disolventes y gas a lo largo del tiempo para las condiciones óptimas.

-Comparar los resultados de las fermentaciones que emplean hidrolizado de bagazo de manzana como sustrato con fermentaciones control en basadas en glucosa.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Reactantes, sustrato y microorganismo

Los compuestos químicos que se utilizaron para realizar los experimentos llevados a cabo en este TFM son los indicados en la Tabla 9.

Tabla 9. Compuestos químicos utilizados, fórmula química, pureza y suministrador.

Compuesto	Fórmula	Pureza (%)	Suministrador
Acetato de amonio	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	≥ 99	Sigma-Aldrich
Acetato de sodio	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	≥ 99	Panreac
Acetona	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	99,8	Sigma-Aldrich
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	98	Panreac
Ácido acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	≥ 99	J.T.Baker
Ácido butírico	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-	Merck Schuchardt
Ácido clorhídrico	HCl	-	J.T.Baker
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	99	Sigma-Aldrich
Agar	-	-	VWR BDH PROLABO
Almidón soluble	-	-	Panreac
Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	≥ 99	Sigma-Aldrich
Butanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	99	Panreac
Carbonato de calcio	CaCO <sub>3</sub>	≥ 98,5	Panreac
Cloruro de sodio	NaCl	≥ 99	Sigma-Aldrich
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	-	J.T.Baker
Extracto de carne	-	-	Panreac
Extracto de levadura	-	-	INTRON BIOTECHNOLOGY
Fosfato de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	≥ 99	Panreac
Fosfato dibásico de potasio	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	≥ 98	Panreac
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	≥ 99,5	Panreac
Glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	≥ 99,5	Fisher Chemical
Hidróxido de sodio	NaOH	≥ 98	LABKEM
Isopropanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	99,8	Panreac
L-cisteína	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	-	Sigma-Aldrich
Nitrógeno	N <sub>2</sub>	-	PRAXAIR
Peptona de carne	-	-	Panreac
Resazurina	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	-	Sigma-Aldrich
Sulfato de hierro heptahidratado	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	≥ 99,5	Merck
Sulfato de magnesio hidratado	MgO <sub>4</sub> S · H <sub>2</sub> O	≥ 97	Fluka
Sulfato de manganeso hidratado	MnO <sub>4</sub> S · H <sub>2</sub> O	≥ 98	Panreac
Tartrato mixto de potasio y sodio	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	99	Acros Organics
Tiamina	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OS+	-	Sigma-Aldrich

El sustrato utilizado en las fermentaciones corresponde a hidrolizado de bagazo de manzana que se encuentra disponible producto del trabajo de otros investigadores en el laboratorio. Originalmente el bagazo de manzana fue suministrado por la empresa gallega Custom Drinks (Chantada, Lugo) que se dedica a la producción de sidra, el cual se secó durante 24 h a 45 °C y se molió a un tamaño de partícula de 2-17 mm.

El sólido obtenido fue pretratado mediante hidrólisis enzimática utilizando preparados de celulasas y pectinasas, con actividades de 5.250 FPU y 75,39 FPU respectivamente, a 50 °C durante 48 h con una relación sólido-líquido de 15%. Finalmente, se centrifugó a 4.000 rpm por 10 min (Centrifuge AVANTI J26XPI- Beckman Coulter) para separar la mayor parte de los sólidos suspendidos. De esta forma se obtuvo el hidrolizado de bagazo de manzana, con una concentración de azúcares reductores totales de 67 g/L. Este hidrolizado se almacenó en congelador a -20 °C hasta ser usado como fuente de carbono y energía en las fermentaciones.

El microorganismo empleado para las fermentaciones corresponde a la bacteria *Clostridium beijerinckii* CECT 508 que proviene de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España).

### 3.2. Metodología de trabajo

Una visión general de la metodología llevada a cabo en el laboratorio se representa en la Figura 9. Se comenzó con la reactivación de las esporas de *Clostridium beijerinckii* conservadas en una solución acuosa de glicerol a -20 °C, mediante el tratamiento de *Heat Shock* y el posterior precultivo en medio de reactivación ATCC 2107. Las etapas de crecimiento también se realizaron utilizando medio de reactivación en volúmenes de fermentación cada vez mayores, primero 6 mL, luego 10 mL y finalmente 60 mL, con lo que se pudo obtener el correspondiente banco de respaldo y banco de trabajo. A partir de este último, se inocularon los cultivos de adaptación que se desarrollaron en medio sintético P2 hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial. Estos cultivos se emplearon como inóculo en las fermentaciones ABE con hidrolizado de bagazo de manzana (HBM).

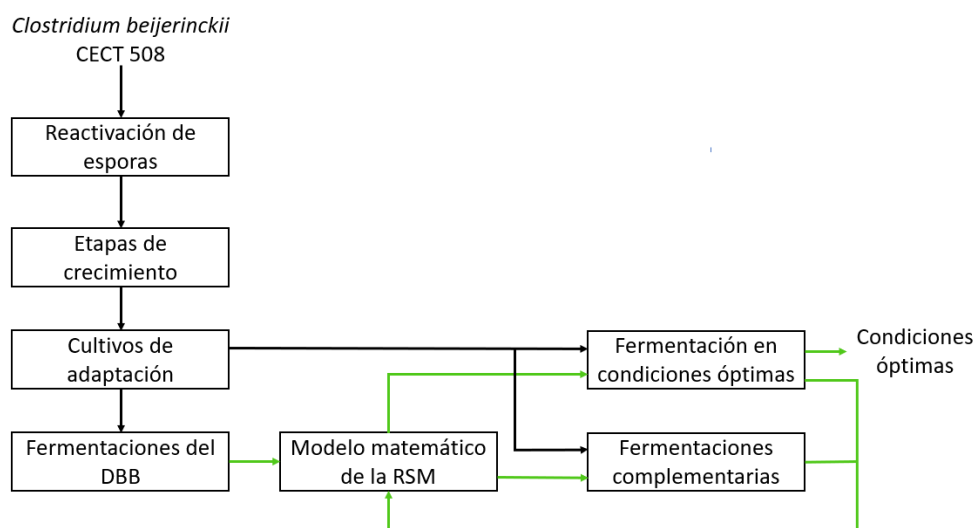


Figura 9. Representación de la metodología llevada a cabo en el laboratorio, se diferencia en flechas color negro los inóculos empleados en cada cultivo y en color verde el flujo de información y datos relacionados con el modelo. Nomenclatura: DBB, diseño Box-Behnken; RSM, metodología de superficie de respuesta.

En una primera instancia se llevaron a cabo las fermentaciones del diseño experimental tipo Box-Behnken (DBB), en el que se estudió a tres niveles el efecto del pH, temperatura y carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) en la producción de *n*-butanol. Dichos resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA con el fin de obtener un modelo matemático que prediga las condiciones óptimas que maximizan la síntesis del biocombustible a través de la metodología de superficie de respuesta. Una vez obtenidas, se realizaron experimentos de validación tanto a las condiciones óptimas como a otras condiciones predichas, cuyos resultados fueron retroalimentados al modelo con el fin de mejorar su nivel de precisión.

De forma más detallada se presenta en la Figura 10 el procedimiento realizado para llevar a cabo cada una de las etapas de cultivo de *Clostridium beijerinckii*, desde cultivos en placa hasta las fermentaciones ABE que emplean bagazo de manzana como sustrato para determinar las condiciones óptimas de producción de butanol, pasando secuencialmente por las etapas de reactivación, crecimiento, adaptación y fermentaciones.

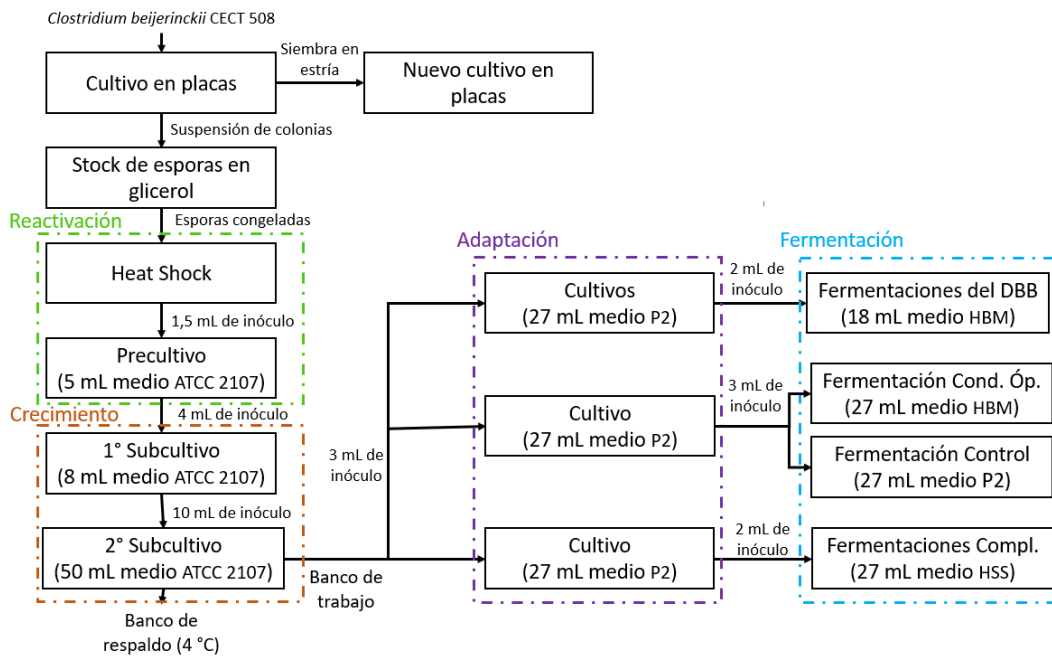


Figura 10. Representación del procedimiento para llevar a cabo cada una de las fermentaciones ABE en el laboratorio. Nomenclatura: DDB, diseño Box-Behnken; HBM, hidrolizado de bagazo de manzana; Cond. Óp., Condiciones óptimas; Compl., Complementarias.

Se comenzó con la elaboración de un nuevo cultivo de placas de Petri con el fin de mantener el stock de colonias de *Clostridium* en buen estado. Para ello se preparó 250 mL de medio de reactivación ATCC 2107 *Modified Reinforced Clostridial* cuya composición se indica en la Tabla 10. Debido a la presencia del indicador resazurina la solución toma un color azul y debe mantenerse en agitación constante hasta que se observe un cambio a tonalidades anaranjadas o rosas. Posteriormente, se ajustó el pH hasta 6,8 mediante una disolución de NaOH 4 M, para luego añadir, en ausencia de agitación, la cantidad de agar suficiente que permita alcanzar una concentración de 15 g/L. El medio de activación se esterilizó en autoclave a 110 °C por 30 min.

Tabla 10. Composición del medio de reactivación ATCC 2107.

Compuesto	Concentración
Peptona de carne	10 g/L
Extracto de carne	10 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Glucosa	5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Almidón soluble	1 g/L
L-cisteína	0,5 g/L
Acetato de sodio	3 g/L
Resazurina (0,025% w/v)	4 mL/L

Una vez que el medio se ha enfriado lo suficiente como para ser manipulado se añadió, en condiciones de esterilidad bajo campana y mechero, 20 mL a cada una de las ocho placas también estériles, para luego ser cerradas y dejarlas enfriar hasta que el medio solidifique. Es recomendable cerrarlas con parafilm y almacenarlas boca abajo para evitar la condensación, en caso de no ser utilizadas de forma inmediata deben ser almacenadas a 4 °C. Para la inoculación, bajo campana y mechero, se tomó una colonia de la placa de partida con el asa de siembra que fuese idealmente de color amarillo claro, forma circular regular y superficie lisa para ser sembrada en estría en cuatro cuadrantes de la nueva placa con el fin de favorecer el crecimiento de colonias independientes. Las placas inoculadas se almacenaron en una jarra de anaerobiosis que mantenía

las condiciones anaerobias mediante Anaerocult® A (Merck KGaA, 1.13829.0001) y que eran comprobadas por la presencia de un indicador Anaerostest® (Merck KGaA, 1.15112.0001), a los cuales se les debió añadir 35 y 1 mL de agua destilada respectivamente para ser activados. La jarra se incubó a 35 °C durante 5 a 7 semanas.

A continuación, desde una placa ya existente en buen estado se elaboró el stock de esporas en glicerol. Para ello se preparó 50 mL de una solución estéril de 15% glicerol y 85% suero fisiológico (9 g/L de cloruro de sodio en agua destilada). Posteriormente, bajo mechero y en campana, se añadió 1,5 mL de esta solución a tubos Eppendorf estériles. La placa Petri que se escogió no solamente contenía colonias visualmente apropiadas en términos de color, forma y textura, sino que también se comprobó al microscopio óptico Nikon Labophot, equipado con una cámara Nikon asociada al software Nis Elements D 4.40.000, con un aumento de 10x, que la morfología principal de las bacterias era de tipo spora, dichas fotografías se adjuntan en el Anexo A. Manteniendo las condiciones de esterilidad, se tomaron una o dos colonias desde la placa, mediante el asa de siembra y se suspendieron en un tubo Eppendorf, procedimiento que se repitió con cada uno de ellos, para luego ser almacenados a -20 °C en congelador.

Desde los tubos con esporas congeladas es posible comenzar con el proceso de reactivación llevado a cabo por choque térmico o *heat shock*. Primero, los Eppendorf se descongelaron en un baño de agua a 35 °C, para luego ser sometidos a un baño caliente de agua a 80 °C durante 10 min. Inmediatamente después, se colocaron en agua fría cercana a los 0 °C durante 5 min. En paralelo se preparó 100 mL de medio de reactivación ATCC 2107, se mantuvo en agitación hasta el viraje de color de azul a rosado, se ajustó el pH a 6,8 añadiendo NaOH 4 M y se distribuyó en tubos de vidrio de 5 mL que una vez tapados con algodón fueron autoclavados a 110 °C durante 30 min. Se añadió 1 mL del contenido de un tubo Eppendorf con esporas tratadas por *heat shock*, bajo campana y mechero, a cada tubo con medio de reactivación estéril. Estos se introdujeron finalmente a una jarra de anaerobiosis, que mantenía un ambiente anaerobio mediante el reactivo Anaerocult® A, era comprobado mediante el indicador Anaerostest® y fue incubada a 35 °C durante una semana.

Tras observar crecimiento en los tubos se inició la etapa de crecimiento. Para ello se preparó 200 mL de medio de reactivación ATCC 2107, se ajustó el pH a 6,8 mediante una solución de NaOH 4 M y se añadió a ocho botellas que se encapsularon, cuatro que contenían 8 mL, dos con 25 mL y dos con 50 mL. A todas las botellas se les desplazó el oxígeno (O<sub>2</sub>) mediante nitrógeno (N<sub>2</sub>) con el fin de crear un ambiente anaerobio durante 40 min, con lo que se apreció un cambio de color de azul pálido a rosado, y posteriormente fueron presurizadas también con N<sub>2</sub> durante 20 min. Las botellas se esterilizaron en autoclave a 110 °C durante 30 min. Luego, bajo condiciones de esterilidad en campana y mechero, se inoculó aquellas botellas que contenían 8 mL de medio de reactivación con el contenido de aquellos tubos de vidrio en los que se observó crecimiento, dos con un inóculo de 2 mL y las otras dos con un inóculo de 4 mL. Las cuatro botellas se incubaron durante 2 días a 35 °C.

Cuando se observó crecimiento en las botellas incubadas se pasó a inocular aquellas de 25 y 50 mL, también bajo campana y mechero, y utilizando un tamaño de inóculo de 10 mL proveniente de dichas botellas. También estas cuatro botellas fueron incubadas a 35 °C durante una semana hasta que se aprecie crecimiento. Para continuar con la investigación se escogió como banco de trabajo, almacenado en cámara fría a 4 °C, una botella de volumen final de 60 mL, en la que se visualizó crecimiento celular y comprobó en microscopio su buen estado, fotografías que se incluyen en el Anexo B, mientras que las demás botellas se almacenaron como banco de respaldo.

A partir del banco de trabajo se desarrollaron todos los cultivos de adaptación utilizando medio P2. Este medio de cultivo se compone de tres diferentes disoluciones, una denominada “principal” que contiene la mayor parte de macro y micronutrientes, una de resazurina como indicador y una de vitaminas diluidas, de volúmenes 24 mL, 1,5 mL y 1,5 mL, respectivamente. Se comenzó con la preparación de la disolución principal cuya composición se indica en la Tabla 11 a partir de agua destilada y se ajustó el pH a 6,8 utilizando una solución de NaOH 4 M. A continuación, también en agua destilada, se preparó 100 mL de la solución de resazurina en una concentración de 0,02 g/L. En una botella de vidrio se añadió 24 mL de la solución principal y 1,5 mL de la solución de resazurina para luego encapsularse. Posteriormente, se desplazó el O<sub>2</sub> mediante la adición de N<sub>2</sub> durante 40 min para luego ser presurizada con el mismo gas por 20 min, donde se observó un cambio de color de azul pálido a rosado. Las botellas se esterilizaron en autoclave a 110 °C durante 30 min y se almacenaron a 4 °C para su posterior utilización.

Tabla 11. Composición de la disolución principal que forma parte del medio P2.

Compuesto	Concentración (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,625
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,625
MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,25
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,0125
Cloruro de sodio	0,0125
Acetato de amonio	2,75
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,0125
Extracto de levadura	1,25
Glucosa	75
L-cisteína	0,625
CaCO <sub>3</sub>	6,25

La solución de vitaminas diluidas añadidas al medio P2 se elaboró a partir de una concentrada, cuya composición se presenta en la Tabla 12. Inicialmente se autoclavó una botella con 250 mL de agua destilada, otra botella con 99,49 mL de agua destilada y dos botellas vacías. Bajo condiciones de esterilidad en campana y mechero se preparó la solución de vitaminas concentradas en la botella con 250 mL de agua destilada, a continuación, se esterilizó por filtración, al hacerla pasar por un filtro de 0,22 µm (MILLEXGP filter unit, Millipore Express, SLG033RB).

Tabla 12. Composición de la disolución concentrada de vitaminas.

Compuesto	Concentración (g/L)
Ácido p-aminobenzoico	3,9
Biotina	3,9
Tiamina	0,039

También bajo condiciones de esterilidad se tomó 0,51 mL de solución de vitaminas concentradas y se agregó a la botella que contenía 99,49 mL de agua destilada estéril. Nuevamente, esta solución se filtró por un poro de 0,22 µm al trasvasiarse a una botella vacía, de esta forma se obtuvo la disolución de vitaminas diluidas cuya composición se indica en la Tabla 13. Esta botella se encapsuló, se desplazó el O<sub>2</sub> con N<sub>2</sub> durante 40 min utilizando agujas y filtros estériles, se presurizó con el mismo gas por 20 min, y se mantuvo en almacenamiento a 4 °C junto con la de vitaminas concentradas.

Tabla 13. Composición de la disolución de vitaminas diluidas para el medio P2.

Compuesto	Concentración (g/L)
Ácido p-aminobenzoico	0,02
Biotina	0,02
Tiamina	0,0002

De esta forma, en el momento de la inoculación, a las botellas que ya contenían la disolución principal con la de resazurina, bajo condiciones de esterilidad, en campana y mechero, se añadió 1,5 mL de solución de vitaminas diluidas y 3 mL de inóculo desde el banco de trabajo, obteniendo un cultivo de 30 mL totales y cuya composición se detalla en la Tabla 14. Estas botellas se incubaron a 30 °C durante tres días.

Tabla 14. Composición del medio de cultivo P2.

Compuesto	Concentración (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,01
Cloruro de sodio	0,01
Acetato de amonio	2,2
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,01
Extracto de levadura	1
Glucosa	60
L-cisteína	0,5
CaCO <sub>3</sub>	5
Resazurina	0,001
Ácido p-aminobenzoico	0,001
Biotina	0,001
Tiamina	0,00001

A partir de los cultivos de adaptación en medio P2 se llevaron a cabo las fermentaciones en las que se utilizó hidrolizado de bagazo de manzana (HBM) como sustrato. Se llevó a cabo un diseño experimental Box-Behnken (DBB) de tres factores a tres niveles como se presenta en la Tabla 15. Los factores pH, concentración de CaCO<sub>3</sub> y temperatura se definieron como x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub> y x<sub>3</sub>, respectivamente, considerando los rangos de trabajo típicamente utilizados en bibliografía para optimizar este tipo de cultivos (34, 38–42). Por lo tanto, las características del medio de cultivo varían en función del experimento que se realizó.

Tabla 15. Diseño experimental Box-Behnken realizado para la optimización del pH, [CaCO<sub>3</sub>] y temperatura para la fermentación ABE.

Factores		Factores			Unidades
		Niveles			
		-1	0	1	
x <sub>1</sub>	pH	5	6	7	
x <sub>2</sub>	[CaCO <sub>3</sub> ]	2	5	8	g/L
x <sub>3</sub>	T°	30	35	40	°C

Diseño Experimental						
Experimento	Valores codificados			Valores reales		
	x <sub>1</sub> *	x <sub>2</sub> *	x <sub>3</sub> *	pH	[CaCO <sub>3</sub> ] (g/L)	T (°C)
1	-1	-1	0	5	2	35
2	1	-1	0	7	2	35
3	-1	1	0	5	8	35
4	1	1	0	7	8	35
5	-1	0	-1	5	5	30
6	1	0	-1	7	5	30
7	-1	0	1	5	5	40
8	1	0	1	7	5	40
9	0	-1	-1	6	2	30
10	0	1	-1	6	8	30
11	0	-1	1	6	2	40
12	0	1	1	6	8	40
13	0	0	0	6	5	35
14	0	0	0	6	5	35
15	0	0	0	6	5	35

Nomenclatura: [CaCO<sub>3</sub>], Concentración de CaCO<sub>3</sub>

De forma análoga a la elaboración del medio P2, el medio HBM también se compone de tres disoluciones diferentes, una denominada “principal”, una de resazurina y otra de vitaminas diluidas, con un volumen de 17,83 mL, 0,085 mL y 0,085 mL respectivamente, que junto con un inóculo de 2 mL alcanzan un volumen final de 20 mL de fermentación. Se elaboró la solución principal según lo indicado en la Tabla 16 en hidrolizado de bagazo que contiene una concentración de azúcares de 67,3 g/L. Es importante mencionar que la concentración de CaCO<sub>3</sub> varía en función del experimento realizado, por lo que se ejemplifica con la concentración requerida para los tres niveles diferentes. A dicha disolución se le ajustó el pH con la adición de NaOH 4 M o HCl 1 M. A continuación, se elaboró 100 mL la solución de resazurina a una concentración de 0,235 g/L, así en cada botella se añadió 17,83 mL de la disolución principal de HBM y 0,085 mL de la solución de resazurina para ser encapsulada. Se burbujeó con N<sub>2</sub> por 40 min, se presurizó por 20, se esterilizó en autoclave a 110 °C por 30 min y se almacenó a 4 °C para su posterior utilización.

Tabla 16. Composición de la disolución principal del medio HBM.

Compuesto	Concentración (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,561
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,561
MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,224
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,011
Cloruro de sodio	0,011
Acetato de amonio	2,468
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,011
Extracto de levadura	1,122
L-cisteína	0,561
	(nivel -1) 2,243
CaCO <sub>3</sub>	(nivel 0) 5,609
	(nivel 1) 8,974

La solución de vitaminas para el medio HBM se elaboró esterilizando en autoclave un volumen 93,96 mL de agua destilada en una botella, junto con una botella vacía. A continuación, se tomó, bajo condiciones de esterilidad en campana y mechero, 6,04 mL de la solución de vitaminas concentradas preparada previamente y se añadió al agua destilada, obteniéndose la composición indicada en la Tabla 17. Posteriormente, se trasladó el contenido a la botella vacía a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para esterilizarla. Se encapsuló, burbujeó con  $\text{N}_2$  por 40 min, se presurizó por 20 min y se almacenó en cámara fría a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Tabla 17. Composición de la disolución de vitaminas diluidas para el medio HBM.

Compuesto	Concentración (g/L)
Ácido p-aminobenzoico	0,235
Biotina	0,235
Tiamina	0,0024

Al momento de iniciar una fermentación, en campana y con mechero encendido, se tomó una botella que contenía la solución de HBM principal y resazurina, para añadirle 0,085 mL de la disolución de vitaminas diluidas y 2 mL de inóculo proveniente de un cultivo adaptado en medio P2, obteniendo la composición presentada para la Tabla 18 y un volumen de fermentación de 20 mL. Cada experimento se realizó por triplicado en botellas selladas de 120 mL. Luego, la botella se incubó a la temperatura correspondiente según el nivel que requería este factor durante una semana, en la que se midió la presión acumulada, el pH, la concentración de azúcares totales, glucosa, ácidos orgánicos, solventes y biomasa.

Para el experimento a condiciones óptimas se ajustó el volumen añadido de cada componente del medio HBS para alcanzar un volumen final de fermentación de 30 mL. Para los experimentos del DBB y complementarios se tomaron muestras de 1,5 mL iniciales y finales, a tiempos 0 h y 168 h respectivamente, mientras que para las condiciones óptimas se tomaron cada 24 h.

Tabla 18. Composición del medio HBM.

Compuesto	Concentración (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01
Cloruro de sodio	0,01
Acetato de amonio	2,2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01
Extracto de levadura	1
L-cisteína	0,5
	(nivel -1) 2
$\text{CaCO}_3$	(nivel 0) 5
	(nivel 1) 8
Resazurina	0,001
Ácido p-aminobenzoico	0,001
Biotina	0,001
Tiamina	0,00001

A la muestra tomada se le midió el pH, y fue centrifugada a 10.000 rpm por 5 min con el fin de separar el sobrenadante, para la posterior medición de sustratos y productos, y el pellet, que se resuspendió, luego de dos lavados de biomasa, en agua destilada para la medición de  $\text{OD}_{600}$ .

La productividad volumétrica se determinó según lo indicado en la ecuación 1 como la diferencia entre la concentración de un compuesto para un intervalo de tiempo determinado.

$$Productividad_i = \frac{C_{i,t_2} - C_{i,t_1}}{t_2 - t_1} \quad 1$$

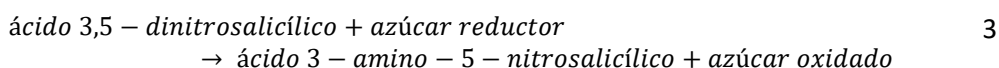
El rendimiento de un compuesto se calculó en base al cociente de la producción y el consumo de azúcares reductores totales del cultivo, como se indica en la ecuación 2.

$$Rendimiento_i = \frac{C_{i,168 h} - C_{i,0 h}}{C_{azúcares,0 h} - C_{azúcares,168 h}} \quad 2$$

### 3.3. Métodos analíticos

#### Concentración de azúcares reductores totales

Para la medición de los azúcares reductores totales se utilizó el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). Este se basa en la mezcla de dicho ácido con una muestra que contiene azúcares, seguido de la adición de calor para catalizar la reacción indicada en la ecuación 3, para finalmente medir la absorbancia visible de los productos obtenidos, principalmente ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, en un espectrofotómetro (46). Se utiliza ampliamente ya que es simple y rápido, siendo una herramienta versátil para la medición de azúcares reductores, como glucosa, fructosa o xilosa, provenientes de biomasa hidrolizada (47).



Para preparar el reactivo DNS se disolvieron 30 g de tartrato de potasio y sodio tetrahidrato en 20 mL de agua destilada, 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 50 mL de agua destilada, ambas en placa calefactora a 90-95 °C con agitación en botellas cerradas, y se preparó 20 mL de una solución de hidróxido de sodio 2 N. Primero se vierte la solución de tartrato sobre la de ácido dinitrosalicílico para luego añadir la de hidróxido de sodio, manteniendo la agitación y temperatura. Finalmente, el reactivo se filtró y almacenó en una botella de vidrio oscura a temperatura ambiente.

Para utilizar el reactivo se añaden 100 µL de muestra a un tubo Eppendorf y luego 100 µL de reactivo DNS. Es colocado en un recipiente con agua hirviendo durante 5 min, y luego enfriado en otro recipiente con agua fría hasta temperatura ambiente. Se añade 1 mL de agua destilada para diluir y se agita utilizando el vórtex. Inmediatamente se mide su absorbancia a 540 nm, utilizando como blanco agua destilada (47). Procedimiento que se realiza por duplicado para cada muestra a analizar.

La recta de calibrado del método DNS (Figura 11) se elaboró a partir de agua destilada y una solución 2 g/L de glucosa que se diluyó de forma serial para obtener los diferentes puntos de absorbancia.

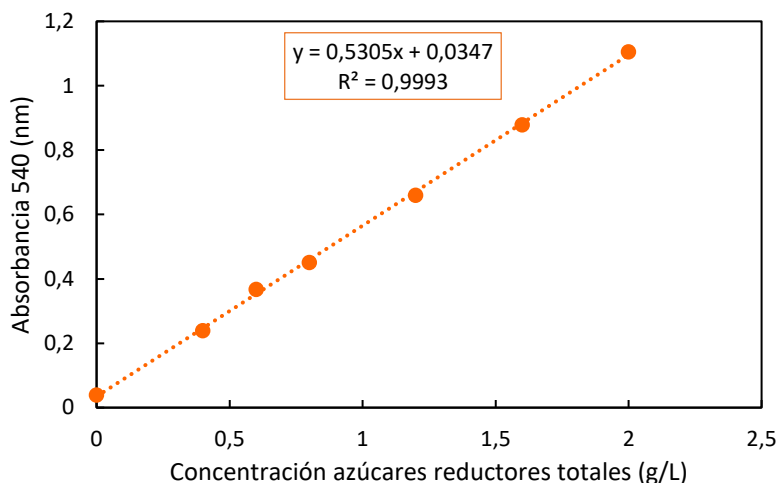
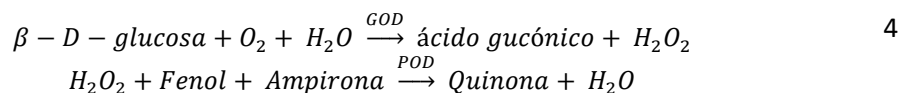


Figura 11. Recta de calibrado para concentración de azúcares reductores totales mediante el método DNS.

### Concentración de glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó mediante el kit enzimático Glucosa-TR (SPINREACT. Ref. 1001190), basado en dos reacciones enzimáticas secuenciales. En primer lugar, la enzima glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa en ácido glucónico generando además peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este compuesto se vuelve sustrato de la segunda reacción catalizada por la enzima peroxidasa (POD), que junto un aceptor cromogénico de oxígeno como el fenol-ampirona genera quinona. Como se indica en la ecuación 4, la intensidad del color formado por la quinona es proporcional a la concentración inicial de glucosa presente en la muestra medida (48).



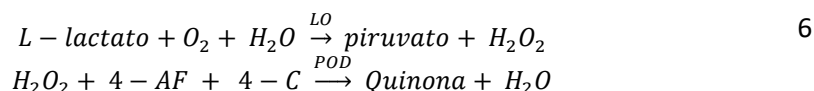
El kit se compone de tres reactivos diferentes, una primera solución de tampón que contiene TRIS pH 7,4 en 92 mmol/L y fenol en 0,3 mmol/L. Una solución de preparado enzimático con GOD y POD en 15.000 U/L y 1.000 U/L de actividad respectivamente junto con 4-aminofenazona en concentración 2,6 mmol/L. Y una tercera solución de patrón de glucosa 100 mg/dL de agua. Se deben disolver las enzimas en el frasco que contiene el tampón para generar el reactivo de trabajo (RT), que es estable durante un mes a 4 °C (48).

Para utilizar este método se añade a una cubeta de 1,5 mL y 1 cm de paso de luz un volumen de 1 mL de RT y 10  $\mu$ L de patrón glucosa. En una segunda cubeta, se añade 1,5 mL de RT y 10  $\mu$ L de la muestra a ensayar. Cada cubeta se cubre con parafilm y se agita con el fin de homogeneizar. Tras 25 min se mide la absorbancia a 505 nm en espectrofotómetro empleando como blanco una cubeta con 1 mL de RT frente a una de agua destilada. Cada medición se realiza por triplicado. La concentración de glucosa se determina mediante la ecuación 5, en donde se relaciona la absorbancia de la muestra, la del patrón y el factor de dilución utilizado.

$$C_{glu} = \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{patrón}} \cdot f_d
 \tag{5}$$

### Concentración de lactato

De forma análoga a la glucosa, la concentración de lactato se determinó mediante un kit enzimático Lactato LO-POD (SPINREACT, Ref. 1001330), basado, como se indica en la ecuación 6, en la oxidación de lactato a piruvato y peróxido de hidrógeno por la enzima lactato oxidasa (LO), y luego la producción de quinona en presencia de 4-aminofenazona (4-AF) y 4-clorofenol (4-C) catalizado por la enzima peroxidasa (POD). Donde la intensidad del color que se forma observado a 505 nm es proporcional a la concentración de lactato en la muestra.



El kit se compone de tres reactivos diferentes, una solución tampón que contiene buffer PIPES pH 7,5 50 mmol/L y 4-clorofenol 4 mmol/L. En segundo lugar, un preparado enzimático con lactato oxidasa 800 U/L, peroxidasa 2000 U/L y 4-aminofenazona 0,4 mmol/L. Y una solución acuosa de calibrado con lactato 1 g/L. Se debe disolver el preparado enzimático en 10 mL de la solución tampón para generar el reactivo de trabajo (RT), que es estable durante un mes a 4 °C (49).

Para utilizar este método se añade a una cubeta de 1,5 mL y 1 cm de paso de luz un volumen de 1 mL de RT y 10 µL de patrón lactato. En una segunda cubeta, se añade 1,5 mL de RT y 10 µL de la muestra a ensayar. Cada cubeta se cubre con parafilm y se agita con el fin de homogeneizar. Tras 25 min se mide la absorbancia a 505 nm en espectrofotómetro empleando como blanco una cubeta con 1 mL de RT frente a una de agua destilada. Cada medición se realiza por triplicado. La concentración de lactato se determina mediante la ecuación 7, en donde se relaciona la absorbancia de la muestra, la del patrón y el factor de dilución utilizado.

$$C_{lac} = \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{patrón}} \cdot f_d \quad 7$$

### Concentración de solventes y ácidos

Con el fin de determinar la concentración de los ácidos orgánicos, acético y butírico, y los solventes, acetona, butanol y etanol, se empleó un cromatógrafo de gases HP6890 con detector FID, equipado con una columna DB-WAX 30 m x 250 µm x 0,25 µm Agilent 122-7032E. El horno del equipo se mantiene isotérmico a una temperatura de 70 °C durante 3 min, la que se incrementa paulatinamente hasta 220 °C a una velocidad de 60 °C/min. Se utiliza un flujo de N<sub>2</sub> de 1 L/min con una relación de Split 5:1. Las temperaturas del inyector y del detector son de 250 °C y 300 °C respectivamente.

Cada una de las muestras se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min (Eppendorf, Centrifuge 5417 R) para separar la biomasa del caldo de cultivo, y se filtró en (MF-Millipore, 13 mm, HAWP01300) de 0,45 µm de poro. El volumen que se inyecta al cromatógrafo para medir cada muestra es de 1 µL.

Con el fin de obtener las rectas de calibrado para cada uno de estos compuestos se elaboró una disolución concentrada con ácido butírico 10 g/L, ácido acético 10 g/L, butanol 10 g/L, etanol 4 g/L, isopropanol 4 g/L y acetona 10 g/L. A partir de ella se realizaron diluciones en serie para obtener los diferentes puntos de la recta. Un ejemplo de cromatograma obtenido para esta solución se adjunta en la Figura 12 donde se aprecia el tiempo de retención para cada uno de los

compuestos siendo respectivamente 6,3; 5,8; 4,5; 3,1; 3 y 2,6 min. Las rectas de calibrado para los ácidos orgánicos y los solventes se presentan en las Figura 13 y Figura 14, respectivamente.

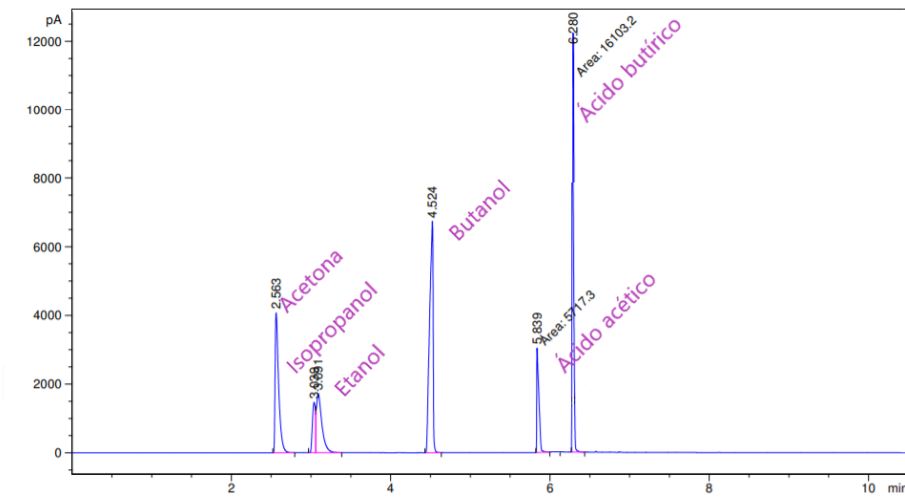


Figura 12. Cromatograma obtenido donde se aprecian los picos característicos para una solución 10 g/L de ácido butírico, 10 g/L de ácido acético, 10 g/L de butanol, 4 g/L de etanol, 4 g/L de isopropanol y 10 g/L de acetona.

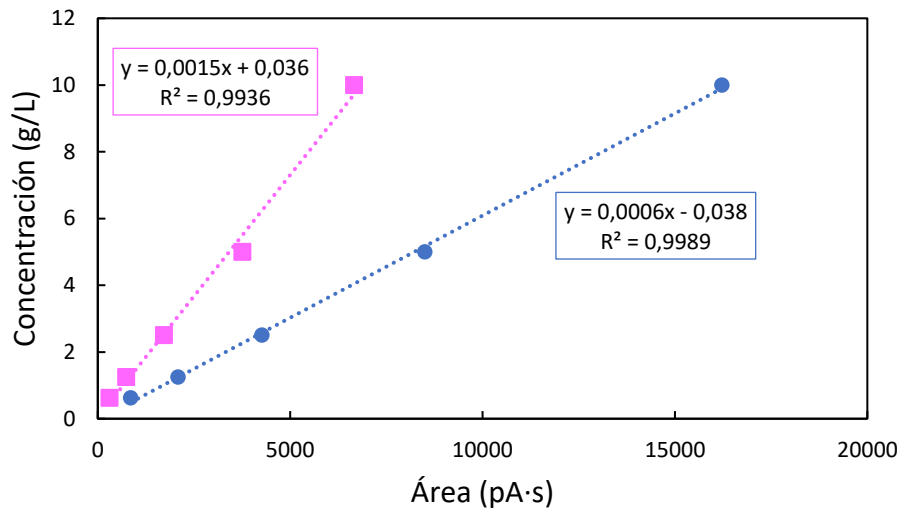


Figura 13. Rectas de calibrado para ácido butírico (●) y ácido acético (■).

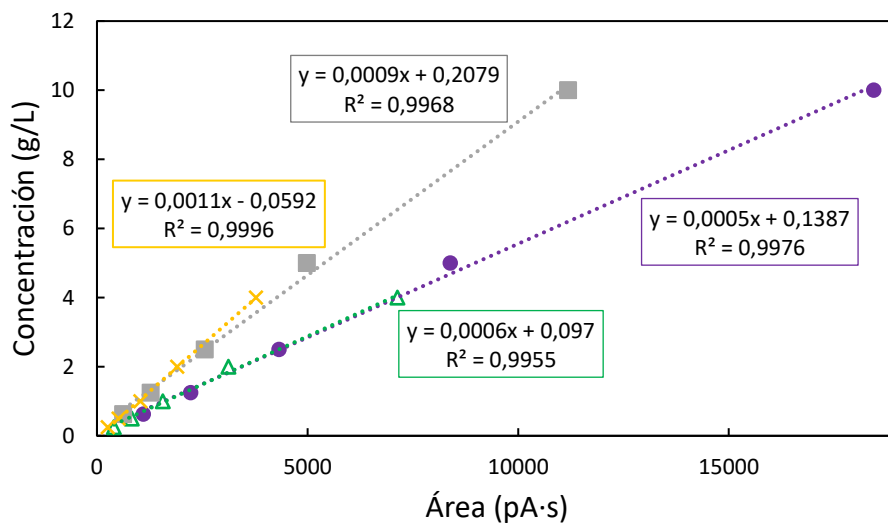


Figura 14. Rectas de calibrado para butanol (●), etanol (Δ), acetona (■) e isopropanol (×).

### Concentración de biomasa celular

En el caso de la medición de biomasa celular, se escogió la técnica espectrofotométrica de densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ), debido a que es el método más utilizado en bibliografía incluso en presencia de carbonato de calcio (34,50,51). Para ello se elaboraron rectas de calibrado empleando diluciones seriadas del caldo de cultivo a diferentes tiempos de fermentación, se les midió la absorbancia a 600 nm, se secaron a 115 °C durante 24 h y se determinó su peso seco. Las rectas obtenidas se presentan en la Figura 15 para el medio de cultivo HBM y medio P2.

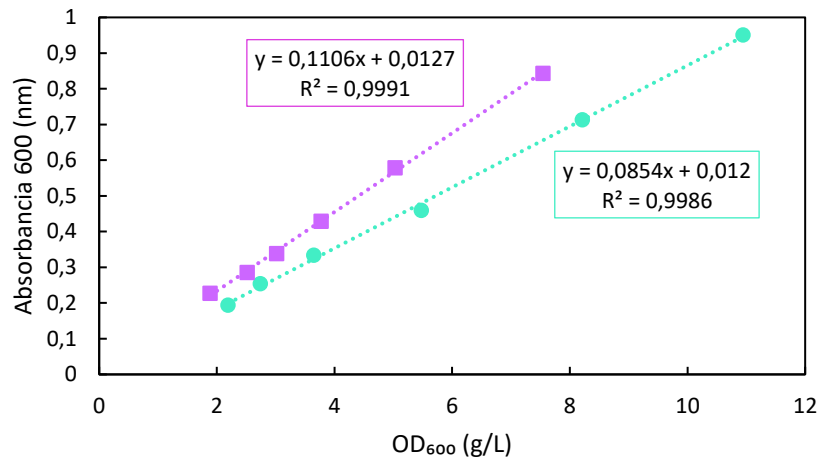


Figura 15. Rectas de calibrado para la densidad óptica a 600 nm. Para medio HBM (■) y para medio P2 (●).

Para obtener las muestras de biomasa se tomó 2 mL de cada fermentación cada 24 h, se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante para las mediciones de azúcares, solventes y ácidos, y se realizó un lavado de biomasa empleando agua destilada. El pellet se resuspendió utilizando un disruptor (Gene disruptor, Scientific Industries, 5.707.861) para nuevamente ser centrifugado y lavado. Se midió la absorbancia de las muestras a 600 nm, empleando el sobrenadante como blanco. Las muestras medidas se almacenaron en congelador a -20 °C. La concentración de biomasa se determinó por la diferencia entre la  $OD_{600}$  para cada una de las muestras y la  $OD_{600}$  del medio de cultivo sin inocular, con el fin de restar el efecto de otros sólidos suspendidos del bagazo o del  $CaCO_3$  añadido.

### Otras mediciones

Con el fin de conocer la evolución de la presión acumulada durante la fermentación, como una medición indirecta de los gases producidos, se utilizó un transductor de presión (Centrepoint Electronics), previamente calibrado. El transductor relaciona el potencial eléctrico a través de una pieza conductora deformada por una determinada presión a la que se somete el equipo. Se presenta en la Figura 16 la recta de calibrado del aparato. Para realizar la medición se pinchó cada una de las botellas empleando agujas estériles.

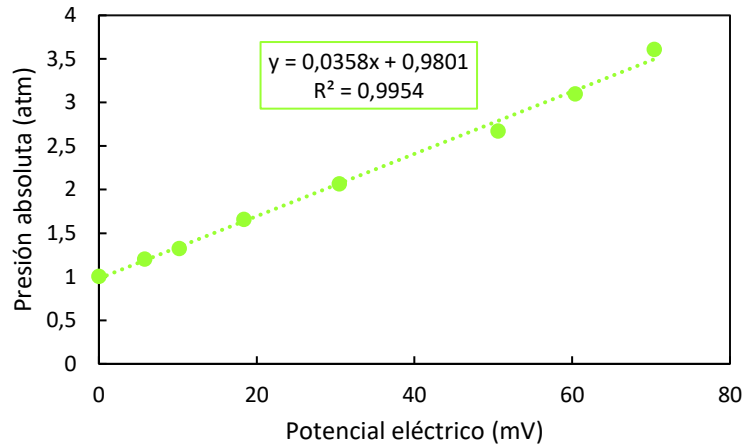


Figura 16. Recta de calibrado para el transductor de presión.

El número de moles de gas producido se calculó en base a la ecuación de los gases ideales, presentada en la ecuación 8 considerando la presión medida, el volumen como espacio de cabeza en la botella de 120 mL, la temperatura a la que se realiza la medición en torno a 26 °C y la constante de los gases ideales con un valor de 0,082 atm L/mol/K. A continuación, se determinó la cantidad de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en base a la composición molar típica para este gas de fermentación y el peso molecular de cada compuesto se determinó la masa total de gas producida. Finalmente se dividió por el volumen de fermentación para determinar los gramos de gas producidos por litro de caldo de cultivo.

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

8

La medición del pH se realizó mediante un pHmetro Crison micropH 2001 cuya precisión es de ±0,01, que se calibraba a diario con soluciones tampón estandarizadas de pH 7 y pH 4,01.

### 3.4. Análisis estadístico

Con el fin analizar los resultados del DBB y obtener el modelo matemático que relaciona las variables independientes, temperatura, pH y concentración de CaCO<sub>3</sub>, con la variable dependiente, producción de butanol, se utilizó el software IBM SPSS Statistics V.28. La herramienta aplicada fue una regresión lineal de segundo orden con el método *Hacia Atrás*. El polinomio obtenido en cada modelo se evaluó estadísticamente a través de un análisis de varianza ANOVA utilizando un nivel de confianza del 95%. Las gráficas para visualizar el punto óptimo de la RSM se elaboraron utilizando Excel.

Mediante el software R (RStudio, R-CRAN versión v.4.0.5) se comprobó el punto óptimo obtenido (*minqa* package, R-CRAN) y mediante la función *Steepest Ascent* (*rsm* package, R-CRAN) se escogieron los experimentos complementarios a realizar. Esta función proporciona un vector de estimaciones que indica una dirección de búsqueda que debería traer una mejora rápida en la variable respuesta a medida que los valores de las variables independientes se alejan de la región inicialmente estudiada, tomando como punto de inicio de la búsqueda el origen del sistema. Este rastreo de la mayor pendiente en los valores que tome la variable independiente, en este caso, de la producción de butanol, se denomina ascenso más rápido o *steepest ascent* en inglés y se identifica como la dirección más razonable de exploración cuando se desea encontrar un punto óptimo alrededor de la superficie de respuesta (52). El *script* utilizado para el análisis estadístico en R se adjunta en el Anexo C.

## 4. Resultados y discusiones

### 4.1. Modelo matemático

La optimización de la fermentación ABE usando HBM como sustrato se llevó a cabo mediante un DBB de tres factores a tres niveles con tres réplicas en el punto central, Como se presentó en la Tabla 15 del apartado 3.2.

Wang y Blaschek estudiaron la optimización de la fermentación ABE mediante RSM considerando el efecto del pH, la concentración de azúcares y la agitación, en el caso del pH en un rango de 5,5-7 quienes observaron producción de butanol para todo el rango (44). Al-Shorgani *et al.* estudiaron el efecto de la agitación, pH y tamaño de inóculo en la productividad de ABE, considerando para el pH un rango de 4-8, donde observaron producción entre pH 5-7 (41). Wang *et al.* realizaron un test ortogonal para las condiciones de la fermentación ABE considerando el pH entre 6-7, la temperatura entre 34-38 °C y el tamaño de inóculo (45). De esta forma se justifica la elección del intervalo de pH 5-7 para el presente TFM. Lin *et al.* optimizaron las condiciones del cultivo de *Clostridium* considerando las variables de tiempo de reacción, temperatura entre 24-46 °C y [CaCO<sub>3</sub>] entre 0-7 g/L, observando los principales resultados entre 30-40 °C y sobre los 2 g/L de CaCO<sub>3</sub> (43). Además, para el género *Clostridium* se recomienda llevar a cabo las fermentaciones a temperaturas entre 30 a 40 °C (30), por lo que se escogió dicho rango para realizar la optimización.

Narueworanon *et al.* estudiaron el impacto de la concentración inicial de azúcares, nitrógeno y CaCO<sub>3</sub>, en un rango de 4-12 g/L, en la producción de butanol donde la síntesis del alcohol para todo el rango (42). Yang *et al.* compararon los mecanismos de neutralización con NaOH, tamponado con NaOAc y suplementación de CaCO<sub>3</sub> en el control del pH, para este último factor en un rango de 2-8 g/L donde observaron mayor producción de butanol en torno a 5 g/L (34). Finalmente, Sirisantimethakoma *et al.* estudiaron la producción de butanol mediante un diseño de matriz ortogonal para los compuestos CaCO<sub>3</sub> (4-10 g/L), sulfato de amonio y ácido butírico suplementados al medio de cultivo. Ellos observaron la producción de butanol más elevada a una concentración de 7 g/L de CaCO<sub>3</sub> (53). Con el fin de considerar los diferentes resultados mencionados se escogió estudiar el rango entre 2-8 g/L de CaCO<sub>3</sub>.

Las variables independientes corresponden al pH, con niveles 5, 6 y 7; la [CaCO<sub>3</sub>], con niveles 2, 5 y 8 g/L; y la temperatura, con niveles de 30, 35 y 40 °C. Estas variables juegan un rol fundamental en la ocurrencia del denominado *acid crash* para un cultivo de *Clostridium* y nunca se ha estudiado su efecto combinado de forma simultánea.

Entre las diversas variables fijas del experimento se encuentra la agitación, que en este caso es nula, la concentración de sustrato a 60 g/L y el tiempo de fermentación a 168 h, debido a que a estas condiciones es posible alcanzar las máximas concentraciones de butanol. Además, como se resume en la Tabla 19, se define la variable dependiente de dichos factores como la concentración final de butanol o [ButOH] denominada Y.

Tabla 19. Variables fijas, dependientes e independientes con sus respectivos valores evaluados.

Tipo de variable	Definición y unidades	Símbolo	Valor
Fijas	Agitación (rpm)		0
	Concentración inicial azúcares (g/L)	-	60
	Volumen de inóculo (%)		10
	Tiempo (h)		168
Independientes	pH	$x_1$	5-7
	[CaCO <sub>3</sub> ] (g/L)	$x_2$	2-8
	Temperatura (°C)	$x_3$	30-40
Dependiente	[ButOH] (g/L)	Y	

Nomenclatura: [CaCO<sub>3</sub>], concentración de CaCO<sub>3</sub>; [ButOH], concentración de butanol

Del DBB realizado se obtuvo una serie de valores para las variables respuesta según las condiciones a las que se sometió el cultivo. Además, con el fin de mejorar la calidad del modelo, se incluyeron los resultados de fermentaciones realizadas previamente al DBB según las condiciones recomendadas en bibliografía (experimento 16). En términos generales, como se presenta en la Tabla 20, se aprecian mejores resultados para aquellos experimentos con un mayor pH inicial, una mayor concentración de CaCO<sub>3</sub> y una menor temperatura.

Tabla 20. Concentración de butanol de acuerdo con el diseño experimental factorial 3<sup>3</sup>. [Valores medios] ± [SD] por triplicado.

Experimento	$x_1^*$	$x_2^*$	$x_3^*$	Y (g/L)		
1	-1	-1	0	0,30	±	0,01
2	1	-1	0	0,32	±	0,05
3	-1	1	0	3,82	±	1,03
4	1	1	0	8,58	±	2,14
5	-1	0	-1	0,22	±	0,07
6	1	0	-1	9,62	±	0,63
7	-1	0	1	0,00	±	0,00
8	1	0	1	0,01	±	0,02
9	0	-1	-1	0,21	±	0,00
10	0	1	-1	7,19	±	0,24
11	0	-1	1	0,00	±	0,00
12	0	1	1	0,01	±	0,02
13	0	0	0	3,66	±	0,32
14	0	0	0	4,27	±	0,72
15	0	0	0	0,13	±	0,03
16	0,8	0	-1	10,57	±	0,86

Se presenta en la Tabla 21. el estado inicial y final de cada uno de los cultivos que compone el diseño experimental. Es importante aclarar que el factor a optimizar  $x_1^*$  corresponde al pH que se ajusta el medio de cultivo durante su formulación. Una vez que se añade el inóculo se aprecia en todos los casos una disminución inmediata el pH que corresponde al valor medido a 0 h para todos los casos. Por lo tanto, con el fin de ser más precisos, el factor a optimizar corresponde al pH ajustado del medio de cultivo considerando su posterior disminución al comienzo de la fermentación, por ello su valor difiere en los puntos iniciales.

Tabla 21. pH y concentración (g/L) de los sustratos y productos al comienzo y al final las fermentaciones de acuerdo con el diseño experimental factorial 3<sup>3</sup>. [Valores medios] ± [SD] por triplicado.

Exp	pH	TRS	Glucosa	Ác. Butírico	Ác. Acético	Butanol	Etanol	Acetona
<b>Tiempo 0 h</b>								
1	4,51 ± 0,01	64,51 ± 0,45	10,60 ± 0,52	0,44 ± 0,01	2,70 ± 0,32	0,27 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,00
2	5,10 ± 0,02	64,02 ± 0,54	10,62 ± 0,24	0,45 ± 0,03	4,17 ± 0,30	0,31 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,01
3	5,52 ± 0,09	57,63 ± 0,90	11,25 ± 0,81	0,46 ± 0,10	5,67 ± 0,38	0,30 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,04
4	6,64 ± 0,04	55,63 ± 0,48	13,04 ± 0,26	0,48 ± 0,02	6,16 ± 0,26	0,31 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,02
5	4,89 ± 0,04	63,23 ± 3,04	9,16 ± 0,35	0,92 ± 0,38	5,90 ± 0,90	0,21 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,04
6	5,78 ± 0,03	61,79 ± 1,39	9,82 ± 0,12	0,64 ± 0,25	6,58 ± 1,36	0,21 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,04
7	4,93 ± 0,04	63,82 ± 0,99	13,30 ± 0,74	0,44 ± 0,22	6,26 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01
8	5,80 ± 0,02	61,00 ± 2,58	14,22 ± 1,47	0,25 ± 0,01	6,67 ± 0,27	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01
9	4,82 ± 0,01	60,42 ± 0,80	9,76 ± 0,22	0,31 ± 0,02	5,83 ± 0,24	0,23 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,01
10	5,96 ± 0,07	58,58 ± 3,59	10,79 ± 0,33	0,51 ± 0,08	7,10 ± 0,26	0,29 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,02
11	5,01 ± 0,02	62,62 ± 2,10	13,09 ± 1,29	0,21 ± 0,01	6,54 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
12	6,01 ± 0,04	61,10 ± 1,76	14,97 ± 0,71	0,20 ± 0,01	6,68 ± 0,16	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
13	5,19 ± 0,05	57,88 ± 1,20	11,17 ± 0,29	0,27 ± 0,03	5,41 ± 0,07	0,13 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,01
14	5,23 ± 0,04	60,00 ± 0,45	11,87 ± 0,05	0,54 ± 0,36	5,79 ± 0,20	0,12 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,02
15	5,19 ± 0,05	58,87 ± 3,58	11,54 ± 0,62	0,85 ± 0,82	5,83 ± 0,33	0,13 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,03
16	5,95 ± 0,02	57,77 ± 5,88	7,80 ± 0,37	0,14 ± 0,01	3,36 ± 0,63	0,80 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,67 ± 0,01
<b>Tiempo 168 h</b>								
1	4,40 ± 0,01	57,80 ± 0,39	10,70 ± 0,16	0,44 ± 0,01	4,38 ± 0,18	0,30 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,01
2	4,89 ± 0,04	56,50 ± 2,34	10,97 ± 0,11	0,46 ± 0,04	5,31 ± 0,23	0,32 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,02
3	5,35 ± 0,11	45,33 ± 2,07	7,16 ± 0,46	0,97 ± 0,60	5,74 ± 1,24	3,82 ± 1,03	0,08 ± 0,03	1,97 ± 1,68
4	5,55 ± 0,07	16,35 ± 0,75	0,16 ± 0,23	4,86 ± 2,48	5,67 ± 1,92	8,58 ± 2,14	0,50 ± 0,25	5,88 ± 1,37
5	4,74 ± 0,06	59,72 ± 0,71	11,35 ± 0,23	0,83 ± 0,49	6,42 ± 1,01	0,22 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,16
6	5,88 ± 0,03	17,73 ± 1,15	3,65 ± 0,13	1,77 ± 0,08	2,95 ± 0,24	9,62 ± 0,63	0,22 ± 0,04	5,29 ± 0,25
7	4,70 ± 0,02	64,99 ± 0,85	15,00 ± 0,71	0,28 ± 0,04	6,58 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01
8	5,21 ± 0,13	60,99 ± 3,41	14,20 ± 2,03	0,50 ± 0,38	7,09 ± 0,59	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,04
9	4,69 ± 0,02	58,24 ± 0,65	11,89 ± 0,61	0,38 ± 0,02	6,51 ± 0,48	0,21 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,01
10	5,80 ± 0,15	18,33 ± 1,90	3,38 ± 0,88	1,88 ± 0,27	3,01 ± 0,22	7,19 ± 0,24	0,14 ± 0,02	4,40 ± 0,26
11	4,80 ± 0,06	62,28 ± 2,45	13,15 ± 0,63	0,21 ± 0,04	5,86 ± 0,73	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02
12	5,39 ± 0,52	57,85 ± 2,92	12,77 ± 1,09	0,67 ± 0,59	7,20 ± 1,20	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,03
13	5,19 ± 0,16	40,02 ± 2,01	8,11 ± 1,24	0,97 ± 0,02	4,92 ± 0,37	3,66 ± 0,32	0,43 ± 0,02	4,61 ± 0,44
14	5,28 ± 0,06	35,42 ± 1,56	7,56 ± 0,84	0,94 ± 0,02	4,46 ± 0,22	4,27 ± 0,72	0,44 ± 0,04	5,92 ± 0,26
15	4,69 ± 0,07	62,50 ± 1,14	11,11 ± 1,05	0,29 ± 0,15	5,28 ± 0,42	0,13 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,03
16	6,24 ± 0,15	12,20 ± 0,76	2,95 ± 0,48	0,68 ± 0,10	2,59 ± 1,41	10,57 ± 0,86	0,45 ± 0,03	8,78 ± 0,71

Concentraciones expresadas en g/L.

Nomenclatura: Exp, experimento; TRS, azúcares reductores totales.

Se observa que todas las fermentaciones comienzan con una concentración inicial de TRS alrededor de 60 g/L, donde la glucosa representa 7-13 g/L. Además, la disminución inmediata del pH al añadir el inóculo se explica en que además de biomasa se añade una cantidad significativa de ácidos orgánicos, especialmente de ácido acético, con valores entre 3-7 g/L, y concentraciones despreciables de disolventes. Esto es un claro indicador de que las células inoculadas se encuentran en fase de crecimiento exponencial que en el caso del género *Clostridium* corresponde a la fase acidogénica.

En los experimentos 1, 2, 5, 7, 8, 9, 11, 12 y 15 ocurre *acid crash*, esto se evidencia porque prácticamente no existe un consumo de sustrato, pero si un incremento en la concentración de ácido acético y butírico de la mano con una disminución del pH. En los experimentos 3, 13 y 14 existe producción de solventes en bajas concentraciones y una utilización parcial del sustrato, probablemente debido a que son condiciones que no favorecen del todo la síntesis de butanol. Para los experimentos 4, 6, 10 y 16 se obtienen los mejores resultados, donde se alcanza una concentración de butanol entre 7,19-10,57 g/L, que se aproximan al límite máximo de inhibición (11-15 g/L), y además se consume la mayor parte del sustrato disponible y no se aprecia una disminución drástica del pH.

A partir de estos resultados se realizó una regresión lineal con la que se obtuvo un modelo matemático representado por una ecuación polinómica para la variable dependiente. Los coeficientes y parámetros (R, R<sup>2</sup> y nivel de significancia estadística) de dicho modelo se presentan en la Tabla 22. Para la variable Y se excluye primero el efecto cuadrático de [CaCO<sub>3</sub>] $\cdot$ [CaCO<sub>3</sub>] con una significancia de 0,793; luego el efecto cuadrático de T $\cdot$ T con una significancia de 0,550; el efecto cuadrático de pH $\cdot$ pH con una significancia de 0,450, el efecto doble de pH $\cdot$ [CaCO<sub>3</sub>] con una significancia de 0,188 y finalmente se excluye el efecto doble de [CaCO<sub>3</sub>] $\cdot$ T con una significancia de 0,074.

Tabla 22. Coeficientes de las ecuaciones de modelización, R, R<sup>2</sup>, F de Fisher y nivel de significancia.

Coeficiente		Y (g/L)
Constante	b <sub>0</sub>	2,68 <sup>a</sup>
pH	b <sub>1</sub>	1,95 <sup>b</sup>
[CaCO <sub>3</sub> ]	b <sub>2</sub>	2,35 <sup>a</sup>
T	b <sub>3</sub>	-2,38 <sup>a</sup>
pH $\cdot$ [CaCO <sub>3</sub> ]	b <sub>12</sub>	excluido
[CaCO <sub>3</sub> ] $\cdot$ T	b <sub>23</sub>	excluido
pH $\cdot$ T	b <sub>13</sub>	-2,71 <sup>b</sup>
pH $\cdot$ pH	b <sub>11</sub>	excluido
[CaCO <sub>3</sub> ] $\cdot$ [CaCO <sub>3</sub> ]	b <sub>22</sub>	excluido
T $\cdot$ T	b <sub>33</sub>	excluido
R		0,901
R <sup>2</sup>		0,812
F-exp		11,86
Nivel de significancia (%)		>99,9

Nomenclatura: a, coeficiente significativo a un nivel de confianza del 99%

b, coeficiente significativo a un nivel de confianza del 95%

La función obtenida para la concentración de butanol se presenta en la ecuación 9 en donde todos los coeficientes poseen una significancia menor a 0,05. La ecuación se compone de un valor constante, los tres efectos principales y una interacción doble del pH con la temperatura.

$$Y = 2,675 + 1,954 \cdot x_1^* + 2,347 \cdot x_2^* - 2,375 \cdot x_3^* - 2,705 \cdot x_1^* \cdot x_3^* \quad 9$$

El modelo matemático obtenido puede evaluarse desde tres perspectivas diferentes. La primera se relaciona con la prueba ANOVA realizada, con la que se obtuvo para la ecuación 9 significancia <0,001 que es inferior a 0,05 por lo tanto el modelo es significativo. En segundo lugar, la comparación entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo se grafica en la Figura 17. De esta forma para la variable Y se obtuvo un coeficiente de correlación R<sup>2</sup> de 0,804; que para las condiciones experimentales evaluadas se considera aceptable.

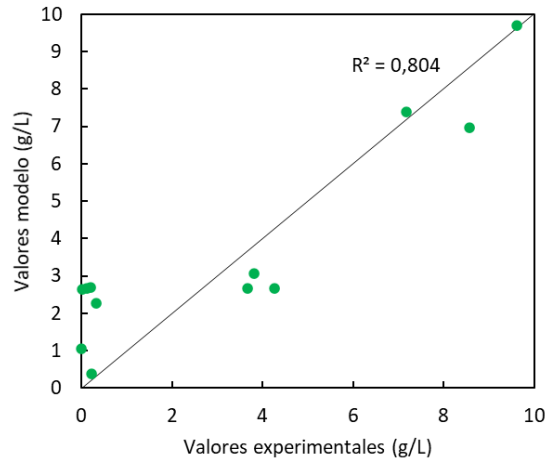


Figura 17. Comparación entre los valores experimentales obtenidos y su valor predicho por cada modelo para la producción de butanol.

En tercer lugar, si se observa la Tabla 22, para el modelo de Y se obtuvo un coeficiente de correlación R de 0,901 y  $R^2$  de 0,812; que también se consideran aceptables dadas las características de la experimentación realizada.

#### 4.2. Superficie de respuesta

Considerando la concentración de butanol (g/L) como respuesta, se presenta las superficies de respuesta tridimensionales con sus correspondientes gráficas de contorno bidimensionales en las Figura 18-Figura 20. En ellas se aprecia los efectos relativos de dos variables independientes en la producción, manteniendo una tercera constante. A partir de la ecuación 9 se determinó la máxima producción de butanol se generan a un pH de 7, a una  $[CaCO_3]$  de 8 g/L y una temperatura de 30 °C, alcanzando un valor de 12,06 g/L, que puede comprobarse a través de las superficies de respuesta.

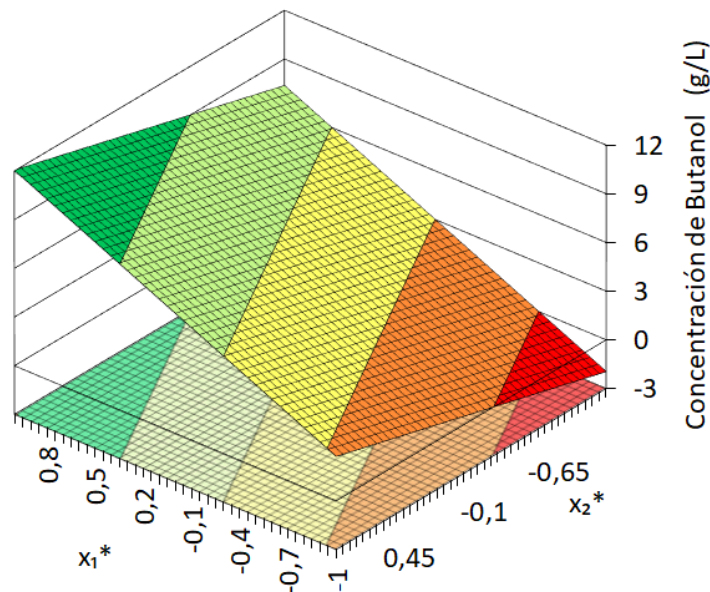


Figura 18. Superficie de respuesta y gráfico de contornos para la concentración de butanol (g/L) considerando los efectos del pH ( $x_1$ ) y la  $[CaCO_3]$  ( $x_2$ ) cuando la temperatura ( $x_3$ ) se fija a 30 °C. Leyenda:

■ -3-0 ■ 0-3 ■ 3-6 ■ 6-9 ■ 9-12

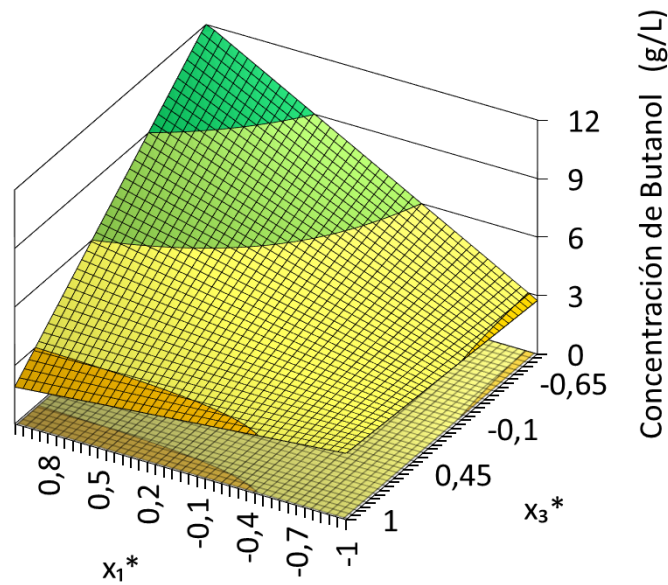


Figura 19. Superficie de respuesta y gráfico de contornos para la concentración de butanol (g/L) considerando los efectos del pH ( $x_1$ ) y la temperatura ( $x_3$ ) cuando la  $[CaCO_3]$  ( $x_2$ ) se fija a 8 g/L. Leyenda:

■ -3-0 ■ 0-3 ■ 3-6 ■ 6-9 ■ 9-12

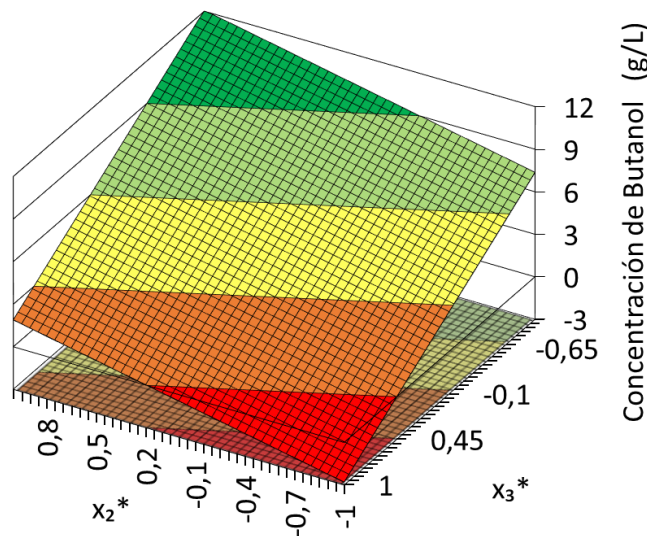


Figura 20. Superficie de respuesta y gráfico de contornos para la concentración de butanol (g/L) considerando los efectos de la  $[CaCO_3]$  ( $x_2$ ) y la temperatura ( $x_3$ ) cuando el pH ( $x_1$ ) se fija a 8. Leyenda:

■ -3-0 ■ 0-3 ■ 3-6 ■ 6-9 ■ 9-12

En las Figura 18 y Figura 19 se aprecia un incremento de la producción de butanol a medida que el pH aumenta, alcanzándose la máxima producción a pH 7. Este resultado es coherente con lo observado en bibliografía, en la mayoría de los trabajos en los que se estudia la optimización de otros factores como la concentración macro y micronutrientes, la agitación o la temperatura, el pH escogido para realizar las fermentaciones gira en torno a 6,7 debido a que son las condiciones que maximizan la producción (43, 45, 54, 55). Según Bankar *et al.* el pH óptimo de las diferentes especies de *Clostridium* se encuentra entre 6,8 y 7 (30). Wang y Blaschek estudiaron el efecto del pH en el rendimiento de azúcares en butanol a partir de zumo de tallo de maíz empleando *Clostridium beijerinckii*, mediante la metodología de superficie de respuesta, corroboraron que el pH óptimo es 6,7 (44).

De acuerdo a la literatura, el pH inicial del cultivo juega un rol preponderante en la ocurrencia o no del *acid crash* y la producción de butanol, debido a que este factor proporciona las condiciones ácidas en la fase acidogénica del cultivo que permite a las células realizar el switch hacia la fase solventogénica (41). En el presente trabajo, dicha situación se comprobó en las cuatro fermentaciones realizadas a pH 5 en el diseño experimental, en tres (experimentos 1, 5 y 7) se provocó *acid crash*, verificado por un descenso del pH por debajo de 4,5, un detenimiento de consumo de azúcares y el crecimiento celular y la ausencia de producción de butanol; mientras que en el experimento 3, existe una baja producción de butanol debido a que la alta concentración de CaCO<sub>3</sub> tiene un efecto tamponador del medio de cultivo.

En términos generales, los mejores resultados se obtuvieron a los pH más altos ( $x_1^* = 1$  o 0), como es el caso de los experimentos 4, 6 o 10. Si se realizan fermentaciones sin control de pH, el pH inicial debe ser lo suficientemente alto o bien el medio debe estar suficientemente tamponado, para que cuando este parámetro disminuya durante la fase acidogénica logre superar el "punto de quiebre", sin bajar de 4,5, para provocar la producción de solventes, ya que de otra forma, la solventogénesis no tendrá lugar y los ácidos no serán reasimilados (44). Qureshi *et al.* reportaron que es necesario ajustar el pH en un valor de 6,8 los cultivos de *C. beijerinckii* BA101 en medio P2, para que durante la acidogénesis disminuyese en torno a 5,0-5,5 y se generara el switch a la fase solventogénica con una apropiada producción de butanol (56).

Se prevé que a pH más elevados que 7 no se produciría un aumento en la producción de butanol, debido a que habría una fuerte inhibición en el crecimiento celular de *Clostridia* lo que provocaría una muy baja o nula generación de solventes.

Por otro lado, en las Figura 18 y Figura 20, se presenta el efecto de la concentración de CaCO<sub>3</sub> en la producción de butanol. A medida que la concentración de CaCO<sub>3</sub> se incrementa se observa un aumento en la variable Y, alcanzando su máximo valor cuando  $x_2$  es 8 g/L. No existe consenso en bibliografía respecto de la concentración óptima de CaCO<sub>3</sub>, debido a que puede variar en función del sustrato empleado y de la especie de *Clostridium* cultivada.

Por ejemplo, Narueworanon *et al.* obtuvieron una concentración óptima es 6,6 g/L en los cultivos de *C. beijerinckii* TISTR 1461 empleando melazas de caña de azúcar como sustrato. También observaron que un incremento en este parámetro provoca una interacción entre el carbonato y las melazas que no favorece la generación de butanol (42). En el estudio llevado a cabo por Lin *et al.* la concentración óptima, empleando en hidrolizado de almidón como sustrato, tomó un valor de 5,04 g/L de CaCO<sub>3</sub> (43), sin embargo, la especie utilizada corresponde a *Clostridium acetobutylicum*, y por lo tanto puede existir una diferencia respecto de *C. beijerinckii*. De hecho, dichas especies presentan diferentes pH óptimos, siendo para *C. acetobutylicum* más bajo con un valor en torno a 5,7, lo que podría explicar también una preferencia por una menor concentración de CaCO<sub>3</sub> (57).

De forma contraria, según el trabajo de Sirisantimethakoma *et al.* se llevó a cabo un diseño experimental de matriz ortogonal, en donde uno de los factores optimizados fue la concentración de CaCO<sub>3</sub>, la fermentación ABE se llevó a cabo con zumo de sorgo dulce por *C. beijerinckii* TISTR 1461 a 37 °C, donde se obtuvo una concentración óptima de 7 g/L un valor bastante cercano al obtenido en este TFM (53).

En el estudio llevado por El Kanouni *et al.* la adición de 10 g/L de CaCO<sub>3</sub> al medio de cultivo, empleando *C. acetobutylicum*, se previene la caída del pH por debajo de 4,8 pero además incrementa el consumo de xilosa y glucosa presentes en el medio de cultivo. Sus resultados indican que un exceso de este compuesto puede aumentar la tolerancia de la bacteria a la

inhibición por butanol, lo que se traduce en un mayor consumo de sustrato y producción (51). Además, se ha observado que en cultivos de *C. acetobutylicum* la suplementación de 8 g/L de CaCO<sub>3</sub> al medio permite extender el tiempo de crecimiento exponencial del cultivo, lo que genera un aumento en el rendimiento de ácido butírico. Se ha planteado que existe una correlación lineal entre la concentración de ácido butírico no disociado y la velocidad específica de producción de butanol, en este caso el efecto tamponador del CaCO<sub>3</sub> permitiría incrementar la cantidad de dichos ácidos sin disociar favoreciendo la producción del alcohol (34).

Lo que está claro, es que una cantidad mínima de CaCO<sub>3</sub> permite potenciar la capacidad de *Clostridium* para sintetizar butanol. Situación que se comprobó experimentalmente, ya que, en términos generales, los resultados del DBB indican una alta concentración de butanol cuando la concentración de CaCO<sub>3</sub> también era elevada, como es el caso del experimento 6 donde se empleó 5 g/L y los experimentos 4 y 10 con 8 g/L, lo que se explica por diversos motivos. El CaCO<sub>3</sub> es escasamente soluble en agua y varía en función del pH, por ejemplo, a un valor de 6, la solubilidad en agua es de aproximadamente 2 g/L, sin embargo, a medida que el pH disminuye se incrementa la solubilización del carbonato, que consume protones y alcaliniza el medio. De esta forma, la adición de CaCO<sub>3</sub> en exceso de 2 g/L opera como depósito de tampón, que hace frente a la disminución natural del pH durante el transcurso de la fermentación ABE (58).

Otros efectos operan a nivel celular y se relacionan con el catión Ca<sup>2+</sup>, producto de la disociación en agua del carbonato de calcio, e involucran aspectos como la división celular, la esporulación, el mantenimiento de la estructura celular, la quimiotaxis o la replicación del DNA. Se ha planteado que el ion de calcio induce la expresión de enzimas claves en el metabolismo de *C. beijerinckii* de la fase solventogénica, como acetato quinasa, acetoacetato descarboxilasa y CoA-transferasa, alcanzando esta última un aumento de hasta 2,3 veces en su actividad y jugando un papel fundamental en la reasimilación de acetato y butirato para su posterior transformación en butanol (33, 58).

Se ha demostrado también que la concentración de Ca<sup>2+</sup> influye en el nivel de toxicidad del butanol y la utilización de azúcares. Se conoce que el butanol afecta negativamente la integridad de la membrana celular, interrumpiendo la viabilidad de la bacteria, además de inhibir los transportadores o permeasas de xilosa y glucosa a una concentración de 8 y 12 g/L respectivamente. El ion Ca<sup>2+</sup> tiene la capacidad de establecer puentes cruzados de tipo iónico con estructuras cargadas negativamente presentes en la membrana celular de *C. beijerinckii*, como los grupos fosfato, lo que ejerce un efecto estabilizador frente a la intromisión del butano y evita la lisis celular. Adicionalmente suplementar Ca<sup>2+</sup> al medio de cultivo provoca un incremento significativo de la presencia de diversas proteínas y enzimas asociadas a la membrana, como las proteínas de unión a carbohidratos, o las enzimas glucósido hidrolasas o 6-fosfo-β-glucosidasa, involucradas en el transporte o metabolismo de los carbohidratos, lo que promueven el consumo de sustrato (58).

Finalmente, de acuerdo con el estudio de Han *et al.*, la presencia de 4 g/L o más de CaCO<sub>3</sub> durante la fermentación ABE con *C. beijerinckii* incrementa considerablemente los niveles de las proteínas DnaK y GrpE, la primera, una chaperona y proteína de choque térmico que además juega roles clave en la replicación del DNA y la división celular, y la segunda, un factor de intercambio de nucleótidos, que media en la unión de la chaperona con una proteína en estado no nativo para su correcto plegamiento. Se ha observado que este grupo de proteínas participan en la reparación de proteínas con estructura aberrante y evita el daño proteico mediado por el estrés, en este caso causado por las altas concentraciones de butanol. De esta manera, la presencia de Ca<sup>2+</sup> induce una sobreexpresión de DnaK y GrpE, lo que a su vez provoca un

incremento en la replicación celular y una estabilización de la maquinaria metabólica biosintética de *C. beijerinckii* que se visualiza en un incremento de la biomasa y la producción de butanol (58).

Respecto del efecto de la temperatura, en las Figura 19 y Figura 20, se observa un aumento de la concentración de butanol a medida que se este factor disminuye, hasta alcanzar la máxima concentración estimada por el modelo a 30 °C. Esta información es coherente con lo encontrado en bibliografía, donde se plantea que la temperatura óptima para la fermentación ABE se encuentra entre los 30 y 40 °C (30). De acuerdo con el trabajo de Wang *et al.* la temperatura que maximiza la producción de butanol, empleando *Clostridium saccharobutylicum*, es de 36 °C cuando se emplea hidrolizado de madera de álamo como sustrato (45). Mientras que, según lo estudiado por Lin *et al.*, la temperatura óptima para la producción de butanol, para la fermentación ABE de hidrolizado de almidón utilizando *C. acetobutylicum* corresponde a 35 °C (43). Por lo tanto, es probable que existan diferencias para este parámetro óptimo según la cepa de *Clostridium* cultivada y el tipo de sustrato utilizado como fuente de carbono y energía.

De los experimentos realizados en el DBB se obtienen mejores resultados a las menores temperaturas analizadas, el experimento 4 realizado a 35 °C y los experimentos 6 y 10 a 30 °C, y encuentra su fundamento en el fenómeno conocido como *acid crash*. Se ha determinado que los valores críticos máximos que puede alcanzar la concentración de ácidos orgánicos sin disociar se encuentra en torno a 57-60 mmol/L, por sobre este valor la solventogénesis, el crecimiento y el consumo de sustrato se detiene (59). Como ya se analizó previamente el pH juega un rol preponderante en el desarrollo del *acid crash*, sin embargo, el segundo factor a considerar es la velocidad de formación de dichos ácidos. Se ha observado que esta velocidad es función de la velocidad del consumo de glucosa, el crecimiento celular, la disminución en la producción de ácidos una vez que comienza la solventogénesis y su velocidad de reasimilación.

Sin embargo, el comienzo de la solventogénesis requiere una concentración mínima de ácidos orgánicos cercana a 20 mmol/L, por lo tanto, la ocurrencia del *acid crash*, corresponde a un problema de cinética que ocurre cuando se supera el máximo mencionado. Es decir, no es que el switch no se produzca, sino que es una finalización precoz de la solventogénesis una vez que el switch ya ha ocurrido, debido a que la cinética de formación de ácidos no disminuyó lo suficiente, superando el límite de 60 mmol/L. Entre las estrategias para prevenir dicho fenómeno se encuentra disminuir la concentración de ácidos sin disociar, con un ajuste de pH, o disminuir la velocidad formación de dichos ácidos, en este caso, disminuyendo la temperatura. Realizar un cultivo a menor temperatura ralentiza la velocidad a la que ocurren los fenómenos metabólicos y el crecimiento celular, lo que le da el tiempo suficiente a la célula para responder y hacer una apropiada transición entre las dos fases de la fermentación (59).

Estos mismos resultados fueron observados por González-Peñas, quién realizó fermentaciones ABE en medio P2 donde cultivó, al igual que el presente TFM, *C. beijerinckii* CECT 508 a 30, 34 y 37 °C. Donde concluyó que los cultivos realizados a mayor temperatura acumulan ácido butírico a mayor velocidad, que desemboca en un cese del crecimiento celular y la actividad metabólica una vez que se ha alcanzado una concentración límite. A 30 °C obtuvo los mejores resultados, alcanzando una concentración de butanol de 12 g/L, más que a 34 °C con 8 g/L, además de promover el consumo de glucosa e incrementar el nivel de tolerancia de las bacterias al butanol, lo que comprueba los resultados obtenidos en el DBB (38). Al-Shorgani *et al.* estudiaron el efecto de la temperatura en la fermentación ABE de residuos de molinos de aceite de palma empleando *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 en un rango de 25 a 40 °C, observaron que la máxima producción de butanol y ABE ocurre a 30 °C, debido a que mayores temperaturas es probable que se produzca la inactivación de enzimas claves del metabolismo acidogénico o

solventogénico de la bacteria, y a menores temperaturas el crecimiento celular es muy lento, lo que perjudica la síntesis del alcohol (41).

Ahora que se ha discutido el resultado para cada efecto individual, se puede analizar los resultados obtenidos para los puntos centrales. Los experimentos 13, 14 y 15, fueron realizados a las mismas condiciones de  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ ; sin embargo, los resultados obtenidos distan significativamente unos de otros (Tabla 20). Esto se explica porque fueron realizados en condiciones que se encuentran en puntos intermedios entre estados que favorecen o previenen el *acid crash*. Es posible que para los experimentos 13 y 14, la utilización de 5 g/L de  $\text{CaCO}_3$  permitiese controlar la concentración de ácidos orgánicos, que a su vez posibilita la transición a la fase solventogénica, pero con una baja producción de butanol, debido de la temperatura de 35 °C. Mientras que para el caso del experimento 15, puede que la velocidad de producción de ácidos en un pH inicial de 6 fuese levemente más alta y no le otorgase el tiempo suficiente al cultivo para evitar llegar al *acid crash*.

El modelo predice también la existencia de un efecto doble entre el pH y la temperatura, cuya influencia se aprecia en la Figura 19, en donde se observan los mejores resultados cuando  $x_1$  toma el valor de 1 y  $x_3$  el valor de -1, alcanzando un valor de Y de 12,06 g/L. No obstante, existe un incremento de la concentración de butanol cuando se invierte la tendencia de dichas variables y toman los valores de -1 y 1 respectivamente, donde se consigue una concentración de 3,4 g/L, lo que permite describir la geometría de la superficie como tipo silla, donde se obtienen los peores resultados cuando ambos factores toman el valor de 1 o de -1. Respecto de este efecto doble no se encontró evidencia en bibliografía, sin embargo, no corresponde a uno de los más significativos del modelo.

### 4.3. Validación del modelo

Con el fin de validar el modelo matemático obtenido se realizó una fermentación en medio HBM a condiciones óptimas, es decir, pH 7, concentración de  $\text{CaCO}_3$  de 8 g/L y 30 °C. Además, se llevó a cabo una fermentación en medio sintético P2 con fines comparativos.

El perfil del pH para la fermentación en medio HBM y la fermentación control, presentado en la Figura 21, indica una duración de la fase acidogénica del cultivo en medio HBM hasta las 24 h, donde el pH disminuye desde 6,34 hasta 6,05; a continuación, se eleva, lo que advierte el comienzo de la solventogénesis, hasta alcanzar el valor de 6,49 a las 168 h. Esto es congruente con lo observado por Sirisantimethakom *et al.*, que emplearon zumo de sorgo dulce como sustrato para la fermentación de *C. beijerinckii* TISTR 1461 en donde se observó una disminución inicial del pH en las primeras horas de fase acidogénica desde 6,59 hasta 6,14; para luego aumentar hasta 7,15 durante la fase solventogénica (53). En el caso de la fermentación control el pH disminuye hasta las 72 h, sin embargo, el principal decrecimiento también se produce en las primeras 24 h, a continuación, no se genera un incremento significativo del pH, alcanzando un valor de 6,02 en las 168 h. Este comportamiento se encuentra ampliamente respaldado en bibliografía para diferentes especies del género *Clostridium*, en donde la presencia de altas concentraciones de  $\text{CaCO}_3$  en medio P2 provoca muy pocas variaciones en el pH durante la fase solventogénica una vez que ya a descendido y ha acabado la acidogénesis (33, 34, 58, 60). También se observa que debido a la adición del inóculo el pH inicialmente ajustado en 7 disminuye inmediatamente a 6,3-6,4 para el tiempo 0 h, debido a que se añaden bacterias en plena fase exponencial de producción de ácidos orgánicos.

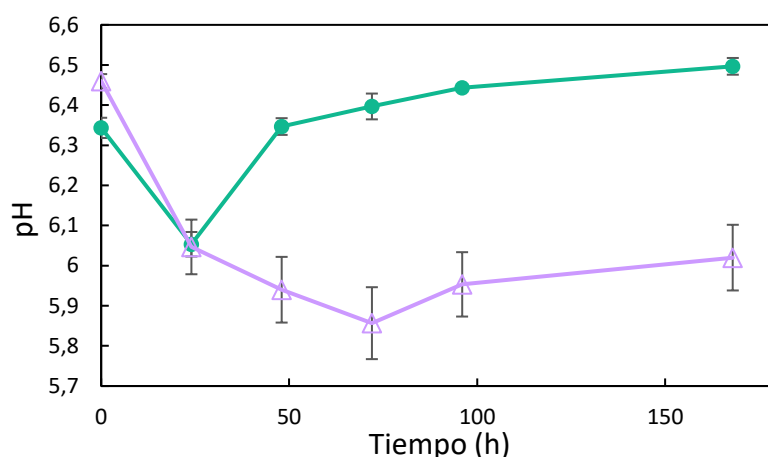


Figura 21. Perfil del pH durante el cultivo de *C. beijerinckii* en medio HBM (●) y medio P2 (▲). [Valores medios] ± [SD] por triplicado.

En el perfil de la biomasa, medido como OD<sub>600</sub> en la Figura 22, se observa tanto para la fermentación en medio HBM como para el control el mayor crecimiento durante las primeras 24 h, que coincide con la mayor disminución de pH lo que sostiene la identificación de dicho periodo como crecimiento exponencial y fase acidogénica. Para ambos cultivos la máxima concentración de biomasa corresponde a 1,92 g/L y 2,20 g/L para el medio HBM y P2 respectivamente. Durante la fase estacionaria hay una concentración de células levemente menor en el medio HBM que en el control, probablemente debido a la presencia de azúcares de más compleja metabolización en la biomasa revalorizada que en el medio sintético, cuya única fuente de carbono es glucosa. A partir de las 72 h se observa una paulatina disminución de la biomasa debido fundamentalmente al efecto tóxico del butanol generado.

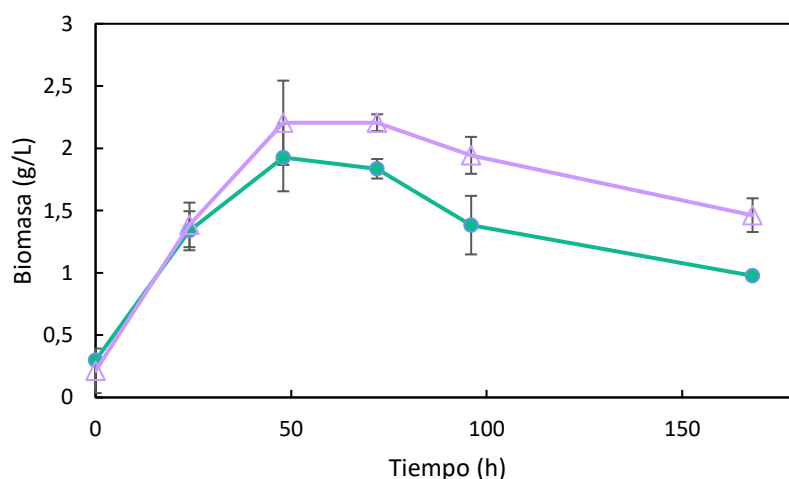


Figura 22. Perfil de biomasa durante el cultivo de *C. beijerinckii* en medio HBM (●) y medio P2 (▲). [Valores medios] ± [SD] por triplicado.

Se ha descrito que para fermentaciones en modalidad *batch* se alcanzan normalmente concentraciones celulares <4 g/L lo que es congruente con el perfil observado (22). De acuerdo con el trabajo de Yang *et al.* que cultivó *C. acetobutylicum* en medio P2 suplementado con CaCO<sub>3</sub> se observan también la fase exponencial del cultivo fundamentalmente en las primeras 24 h, para luego alcanzar en la fase estacionaria 0,6 g/L de biomasa y más tarde una fase de muerte, comportamiento que en general concuerda con lo observado en la Figura 22 (34). De acuerdo con González-Peñas *et al.* que cultivó la misma cepa de *C. beijerinckii* CECT 508 que este TFM, en

celulosa hidrolizada de madera de haya organosolv se obtuvo concentraciones máximas de biomasa en torno a los 2,79 y 2,68 g/L para el control de medio P2 y el medio hidrolizado respectivamente, valores que son cercanos a lo obtenido en este estudio, además en su trabajo observan una fase de muerte más acusada en el medio hidrolizado que en el control, situación que también concuerda con lo presentado en el perfil (61).

La presencia de compuestos inhibidores en la biomasa lignocelulósica utilizada como sustrato para la fermentación ABE se encuentra ampliamente respaldada en literatura. Este tipo de sustancias puede encontrarse naturalmente en la biomasa, como es el caso de ciertos compuestos fenólicos, o bien generarse durante el pretratamiento, como es el caso del furfural, hidroximetilfurfural, ácido fórmico o el ácido levulínico (12). Debido a que la cinética de crecimiento en el medio HBS y control van a la par es posible afirmar que no existen compuestos inhibidores del crecimiento en el bagazo de manzana empleado como sustrato. De haber, se observaría un incremento de la fase de latencia que permitiría a las células adaptarse lo que desfasaría los perfiles de crecimiento, e incluso, si la concentración de inhibidores fuese suficientemente alta, no se observaría crecimiento celular.

Es importante tomar en cuenta dos consideraciones respecto de la cuantificación de la biomasa celular. En primer lugar, solamente las células en estado vegetativo responden a la  $OD_{600}$ , por lo tanto, no considera la concentración de células en otros estados morfológicos como clostridia o esporas. De esta forma, la disminución de  $OD_{600}$  a partir de las 48 h, puede deberse a la combinación de fenómenos como la muerte celular producto de la inhibición por butanol, pero también la transformación de bacterias vegetativas a través del proceso de esporulación como un mecanismo de defensa frente al tóxico ambiente extracelular en que se encuentran. En segundo lugar, la biomasa se midió como la diferencia entre la  $OD_{600}$  total en cada instante de tiempo y la  $OD_{600}$  del medio de cultivo a tiempo cero, donde se asumió que la concentración de sólidos que no corresponden a biomasa, como el  $CaCO_3$  o compuestos del bagazo, fueron constantes. Esto podría haber incrementado el margen de error para cada una de las mediciones tomadas, porque existe parte del material en suspensión del bagazo que es consumido durante la fermentación, lo que podría generar diferencias en la  $OD_{600}$ .

El perfil de azúcares reductores totales (RTS) y glucosa, Figura 23 A y B respectivamente, muestra un consumo de sustrato, desde aproximadamente 60 g/L de RTS, casi a velocidad constante hasta las 72 h a un valor de 0,8-0,9 g/L/h, para luego detenerse completamente, donde permanece una concentración residual de azúcares de 12,5-14,6 g/L hasta las 168 h. La dinámica de consumo de RTS es casi idéntica entre el cultivo en medio HBM y el control. El punto en que se deja de consumir sustrato coincide con el detenimiento del crecimiento celular y se explica en el comienzo de la inhibición por producto. Esto se traduce en un consumo de RTS entre 48,3-49,2 g/L que equivale a cerca de un 80% de los azúcares presentes inicialmente en el sustrato. Similar perfil se observa para el consumo de glucosa, con la diferencia que para la fermentación en medio HBM la glucosa es consumida totalmente, debido a que es solo uno de los diversos tipos de azúcares presentes en el hidrolizado de bagazo de manzana.

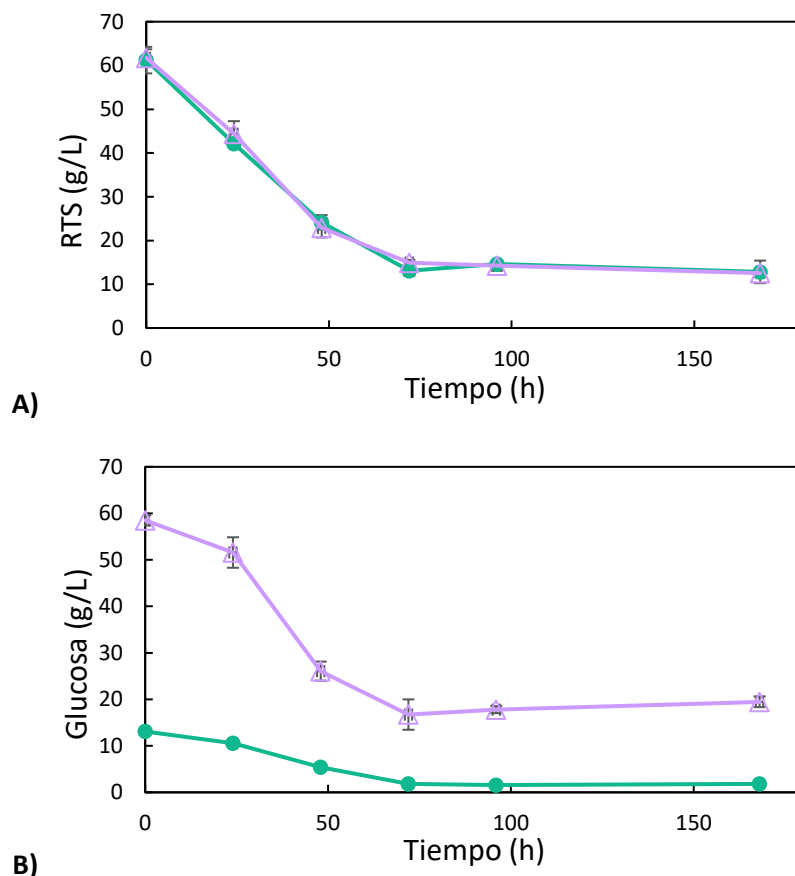


Figura 23. Perfil de RTS (A) y glucosa (B) durante el cultivo de *C. beijerinckii* en medio HBM (●) y medio P2 (Δ). [Valores medios] ± [SD] por triplicado.

Esta dinámica encuentra respaldo en bibliografía en el trabajo de Veza *et al.*, en que se emplea *C. beijerinckii* ATCC 35702 empleando hidrolizado de *L. limnetica* y *O. obscura* como sustrato bajo diferentes condiciones de operación y se observó un consumo de azúcares fundamentalmente hasta las 72 h, en donde la concentración de butanol ya es lo suficientemente alta para provocar una fuerte inhibición del crecimiento (62). En otro estudio en que se emplea bagazo de manzana para la fermentación ABE empleando *C. beijerinckii* P260 se observa un consumo de sustrato también hasta las 48-72 h, donde el cultivo alcanza el estado estacionario (36). Por lo tanto, en condiciones normales existe una clara correlación entre consumo de sustrato y la concentración de butanol inhibitoria, es más, se requiere utilizar una cepa mutante hiperproductora de butanol como *C. beijerinckii* BA101 para consumir totalmente los azúcares de un medio de cultivo P2 que contiene 60 g/L de glucosa, alcanzando una concentración de butanol de 13,2 g/L sin que se observe inhibición (56).

En las Figura 24 A y B, se presenta el perfil de los productos de fermentación para el medio HBM y el control respectivamente. En el primer caso, se obtiene durante las 24 h iniciales una leve disminución de la concentración de ácidos orgánicos, desde una concentración de  $8,5 \pm 0,05$  g/L y  $0,84 \pm 0,76$  g/L para acetato y butirato respectivamente, que coincide con la disminución del pH durante la fase acidogénica. A continuación, comienza la solventogénesis que, de la mano con un aumento del pH, se aprecian las máximas productividades para los solventes. A partir de las 76 h se produce el menor incremento de las concentraciones de solventes debido a que ha cesado el consumo de sustrato, luego a partir de las 96 h las concentraciones se mantienen prácticamente constantes. Las concentraciones finales de los solventes corresponden a  $6,54 \pm 0,65$  g/L,  $11,46 \pm 0,07$  g/L y  $0,48 \pm 0,03$  g/L para la acetona, butanol y etanol respectivamente a las 168 h. La

concentración final de ácido acético y butírico corresponde a  $2,11 \pm 0,11$  g/L y  $0,53 \pm 0,01$  g/L respectivamente. Además, se detectó la formación de isopropanol en bajas cantidades a partir de las 76 h, alcanzando finalmente una concentración de  $0,06 \pm 0,001$  g/L. La concentración final de ABE es de  $18,56 \pm 0,55$  g/L.

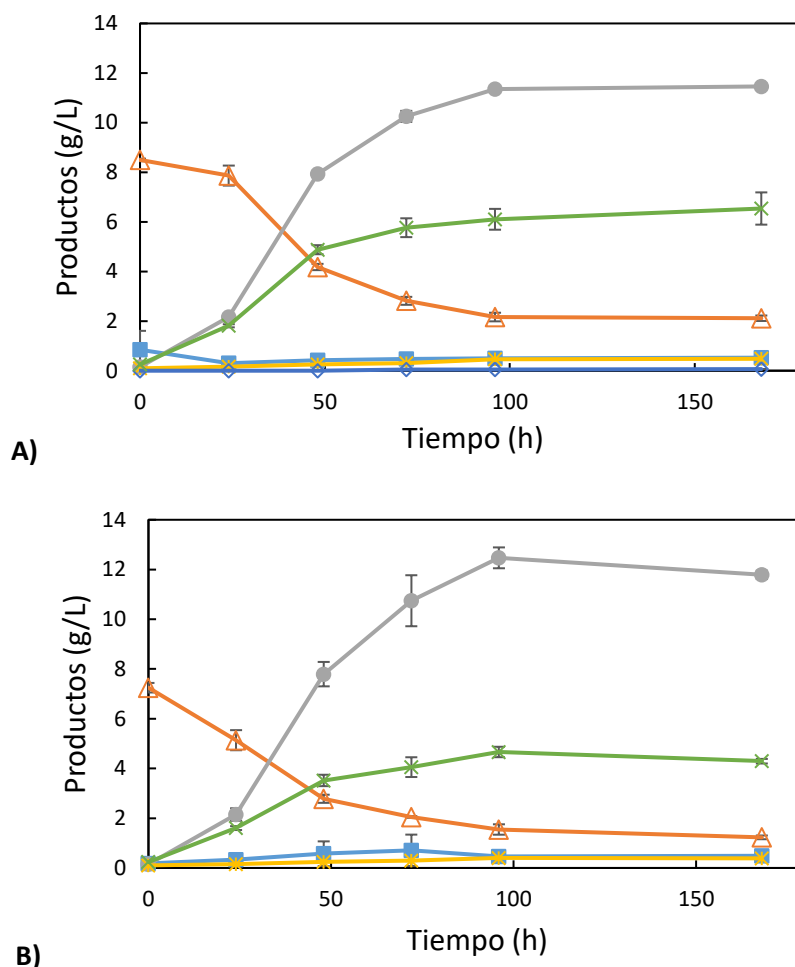


Figura 24. Perfil de los productos del cultivo de *C. beijerinckii* en medio HBM (A) y medio P2 (B). Ácido butírico (■), ácido acético (▲), butanol (●), etanol (★), acetona (×) e isopropanol (◇). [Valores medios] ± [SD] por triplicado.

En la Figura 24 B se observa una disminución constante del ácido acético desde 7,25 g/L en las primeras 48 h. Por otro lado, el ácido butírico incrementa su concentración desde 0,18 g/L hasta 0,57 g/L en el mismo periodo de tiempo. La solventogénesis comienza a las 24 h, alcanzando las mayores concentraciones de solventes a las 96 h con concentraciones de  $4,66 \pm 0,21$  g/L;  $12,47 \pm 0,42$  g/L y  $0,4 \pm 0,01$  g/L para la acetona, butanol y etanol respectivamente. Las concentraciones finales de los ácidos orgánicos corresponden a  $1,23 \pm 0,08$  g/L y  $0,49 \pm 0,18$  g/L de ácido acético y butírico respectivamente. No se aprecia producción de isopropanol en la fermentación control. La concentración final de ABE es de  $16,46 \pm 0,24$  g/L.

Los resultados obtenidos son congruentes con otros trabajos. Se obtienen valores similares para la fermentación ABE llevada a cabo con *C. beijerinckii* BA101 empleando glucosa como sustrato, donde se alcanzan 11,9 g/L de butanol y 17,7 g/L de ABE (63). En el trabajo de Wang y Blaschek se cultivó *C. beijerinckii* 8052 en zumo de tallo de maíz tropical alcanzando una concentración de butanol de 11,5 g/L (44). En la fermentación de *C. beijerinckii* SE-2 llevada a cabo por Zhang y Jia utilizando hidrolizado de mazorca de maíz como sustrato se obtuvo una concentración de butanol de 11,65 g/L y total ABE de 19,22 g/L (55). Y en el estudio de Ni *et al.*

empleando *C. saccharobutylicum* DSM 13864 con melazas de caña de azúcar como sustrato se alcanza una concentración de butanol de 11,86 g/L con una concentración total de ABE de 17,88 g/L (64).

Por otro lado, los resultados obtenidos son mejores que los reportados en otros estudios en los que también se emplea bagazo de manzana como sustrato para la fermentación ABE. Hijosa-Valsero *et al.* obtuvieron la mayor concentración de butanol pretratando el bagazo con el surfactante PEG 6000 antes de emplearlo como fuente de carbono para *C. beijerinckii* CECT 508, donde se alcanzó un valor de 9,11 g/L (35). Jin *et al.* aplicaron diferentes pretratamientos al bagazo de manzana, en un caso con ácido sulfúrico (1%, 60 min, 121 °C) y otro con hidróxido de sodio (2%, 30 min, 121 °C) y al cultivar *C. beijerinckii* P260 obtuvieron 10,7 g/L de ABE con 5,92 g/L de butanol y 10,8 g/L de ABE con 5,40 g/L de butanol respectivamente (36), valores significativamente menores a los obtenidos en este TFM.

La proporción de los solventes generados es diferente entre el medio HBM y el medio sintético P2, y además difiere de la proporción teórica 3:6:1 para acetona, butanol y etanol respectivamente. En el caso del medio HBM, la proporción final es 3,42:6:0,25. La concentración de acetona se aproxima a la ratio, pero es superior, pero lo más llamativo es que existe una clara deficiencia en la producción de etanol. En el caso del control, la relación obtenida es de 2,19:6:0,19; es decir, existe una menor producción de acetona y una aún menor producción de etanol, esto si se toma la concentración de butanol como referencia. En este sentido es importante mencionar que la proporción teórica es solo orientativa ya que varía en función de la especie y cepa de *Clostridium* cultivada, del sustrato utilizado e incluso el pretratamiento aplicado. Por ejemplo, para el ya mencionado estudio de Jin *et al.* si el bagazo de manzana recibe un pretratamiento ácido la relación ABE es 3,09:6:1,62 mientras que si es alcalino 4,05:6:1,94 (36).

La mayor producción de biobutanol en el medio control que en el medio HBS se encuentra respaldado en bibliografía. Por ejemplo, de acuerdo con lo investigado por Maiti *et al.* donde se utilizó hidrolizado de residuos líquidos de la industria cervecera (BLW) para la síntesis de biobutanol con *C. beijerinckii* NRRL B-466 mediante fermentación ABE y se comparó con un cultivo en medio P2 de la misma forma que este TFM. Observaron una mayor producción de butanol en el medio sintético debido a que la totalidad de los azúcares presentes corresponde a glucosa, que son de más fácil metabolización que la mezcla compleja de azúcares presentes en el BLW (37), situación análoga que sucede con la metabolización del medio HBS en el que coexiste glucosa, fructosa, sacarosa, xilosa, almidón entre otros tipos de carbohidratos aprovechables.

La baja o ausente producción de etanol se encuentra documentada en el trabajo de González-Peñas *et al.* quienes cultivaron *C. beijerinckii* CECT 508, la misma cepa que este TFM, en medio P2 y observaron solamente producción de butanol y acetona (61). La mayor concentración de butanol obtenida en la fermentación control puede deberse fundamentalmente a mayor concentración de biomasa que alcanzó dicho cultivo, ya que como se indica en literatura, existe una fuerte correlación entre la concentración celular y la producción de butanol (34).

La existencia de isopropanol, indica que *C. beijerinckii* CECT 508 es capaz de producir este alcohol a partir de acetona, mediante la enzima isopropanol deshidrogenasa que utiliza NADPH como cofactor. Sin embargo, la concentración obtenida es muy baja y no se compara con otras cepas de *Clostridium* empleadas en la fermentación isobutanol-butanol-etanol (IBE) que alcanzan concentraciones de 1,63-2,65 g/L de isopropanol (65). Para lo que sucede existen múltiples explicaciones, es posible que la cepa utilizada presente enzimas con un muy bajo nivel de actividad específica, que los genes que codifican la enzima se expresen poco, que existan mecanismos de

modulación de la actividad enzimática, mecanismos inducción bajo control positivo que responden a altas concentraciones de acetona o una combinación de estos fenómenos, que podrían explicar la baja concentración de isopropanol obtenida.

Dai *et al.* observaron que la cepa de *C. acetobutylicum* DSM 1731 empleada para la fermentación ABE incluye la enzima isopropanol deshidrogenasa en su patrimonio genético sin embargo se encuentra supeditada a una región promotora que prácticamente no se expresa. Cuando modificaron genéticamente el microorganismo incluyendo un gen secundario *sADH* para esta enzima, bajo el control de un promotor con un alto grado de expresión, observaron que la totalidad de la acetona era convertida en isopropanol, pasando de una fermentación ABE a una IBE (66). Esto es un claro indicador que la producción de isopropanol por las diferentes cepas de *Clostridium* está relacionado con la capacidad de expresión de enzimas clave del metabolismo ABE o IBE y la regulación de regiones operadoras y promotoras involucradas en dicho proceso.

Con el fin de profundizar en la validación del modelo matemático, si se comparan los  $11,46 \pm 0,07$  g/L de butanol obtenidos para el medio HBM con los 12,06 g/L estimados por el modelo se obtiene una diferencia porcentual del 4,98 %; por lo tanto, es posible afirmar que el modelo tiene una apropiada capacidad de predicción. De hecho, se obtiene una concentración de butanol más alta que para todos los experimentos realizados en el DBB y cuyos resultados fueron suministrados a la RSM. Por otro lado, es importante recordar que para un cultivo *batch* típico, existe un límite teórico a la concentración de butanol debido a la inhibición por producto que este genera. Se ha descrito que existe entre un 50-100 % de inhibición del crecimiento para una concentración de 11-15 g/L de *n*-butanol (29), por lo tanto, alcanzar el valor próximo de 11,46 g/L en los cultivos realizados en medio HBM se considera un éxito al alcanzar un 88,15 % de dicho límite máximo.

Además de los parámetros tradicionalmente medidos en la fermentación ABE, como el pH, biomasa, sustratos y productos, se decidió incluir en las mediciones la presión acumulada por los gases de fermentación y la evolución del lactato, un producto de la fermentación ABE menos conocido. Este último es un ácido orgánico originado de la reducción del piruvato, catalizado por la enzima lactato deshidrogenasa que permite regenerar la coenzima oxidada  $\text{NAD}^+$  para que la glicolisis pueda continuar (29). El perfil de lactato para la fermentación a condiciones óptimas de la Figura 25 confirma la información anteriormente comentada. Se corrobora que la fase acidogénica ocurre en las primeras 24 h, donde la concentración de ácido láctico se incrementa desde  $1,79 \pm 0,02$  g/L a  $2,17 \pm 0,05$  g/L en el caso de la fermentación en medio HBM y desde  $2,12 \pm 0,01$  g/L a  $2,62 \pm 0,11$  g/L para el control. Esto concuerda con la disminución inicial del pH seguida de un súbito decrecimiento de este compuesto para ambos cultivos lo que coincide con el comienzo de la fase solventogénica y la reasimilación de los ácidos orgánicos generados. Con el desarrollo del cultivo las concentraciones se mantienen prácticamente constantes, siendo más alta para la fermentación en medio HBM con un valor de  $1,08 \pm 0,06$  g/L que para el control en medio P2  $0,45 \pm 0,02$  g/L.

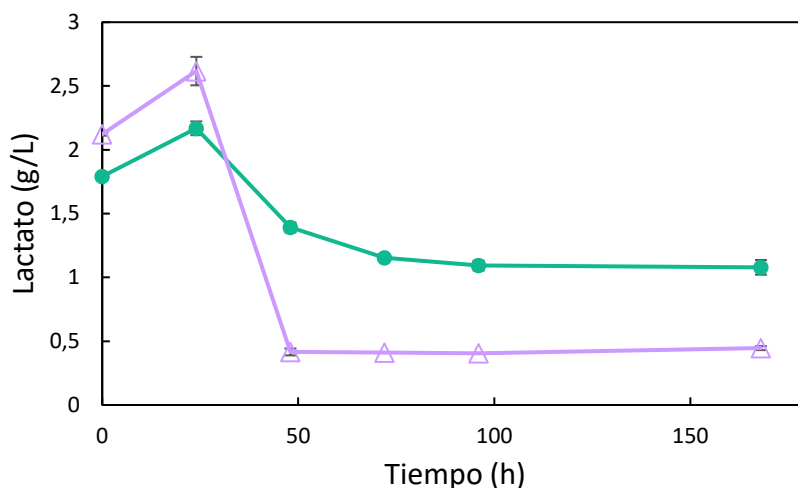


Figura 25. Perfil de lactato durante el cultivo de *C. beijerinckii* en medio HBM (●) y medio P2 (△). [Valores medios] ± [SD] por triplicado.

Si se comparan los resultados con literatura se comprueba que *C. beijerinckii* es capaz de producir lactato. Sin embargo, Wang *et al.* observaron que la cepa *C. beijerinckii* 8052 es capaz de producir bajas concentraciones <0,2 g/L en fermentaciones *batch* en medio P2, un valor significativamente menor a lo obtenido en este TFM. Además observaron que posteriormente el lactato es completamente resimilado (60), situación que tampoco sucedió en ninguno de los dos cultivos que se realizaron ya que permanece una concentración residual. Esto se debe probablemente a la inhibición del crecimiento bacteriano ya que el catabolismo de lactato se detiene al mismo tiempo que se detiene el consumo de azúcares. Vieira *et al.* utilizaron hidrolizado de melazas de caña de azúcar como sustrato para la producción de butanol con *C. beijerinckii* DSM 6423 y evidenciaron el consumo de ácido láctico hasta una concentración residual en torno a 1 g/L de lactato, valor más cercano al obtenido en este estudio (67).

La utilización de lactato como fuente de carbono y energía en diferentes especies del género *Clostridium* productoras ABE se encuentra ampliamente respaldada en bibliografía para *C. saccharoperbutylacetonicum* (68-70) y para *C. beijerinckii* (60, 67). Para los cultivos realizados se reasimilan 1,17 g/L de lactato que representa el 85,66% del total y 2,08 g/L que representan el 79,54% para la fermentación en HBM y control respectivamente. De hecho, según el trabajo Vieira *et al.* se comprueba que *C. beijerinckii* DSM 6423 es capaz de cometabolizar azúcares como glucosa, fructosa o sacarosa de forma simultánea con lactato (67), situación que justamente sucede en las fermentaciones llevadas a cabo en medio HBM y P2. Es posible que la mayor concentración celular obtenida para el cultivo control que para la fermentación en HBM se deba a la mayor cantidad de lactato empleada como sustrato. De esta forma se comprueba que la medición de lactato aporta información relevante sobre la evolución y el estado de la fermentación ABE.

En la Figura 26 se presenta el perfil de la presión acumulada y, por lo tanto, de los gases generados durante la fermentación. Es importante recordar que como subproductos del cultivo se generan dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e hidrógeno (H<sub>2</sub>). Por cada mol de glucosa catabolizada en la ruta EMP se generan 2 mol de CO<sub>2</sub> producto de la descarboxilación oxidativa de piruvato a acetyl-CoA por el complejo enzimático piruvato-ferrodoxin oxidorreductasa y luego 1 mol de CO<sub>2</sub> por la descarboxilación oxidativa de acetoacetato a acetona por la enzima acetoacetato descarboxilasa, para recuperar la coenzima NAD<sup>+</sup> se forma un mol de H<sub>2</sub> por la enzima deshidrogenasa (29). Para

un cultivo de *Clostridium* en modalidad *batch* típico para formar ABE se ha observado que la composición molar de los gases generados corresponde a un 58,3% de CO<sub>2</sub> y 41,7% de H<sub>2</sub> (71).

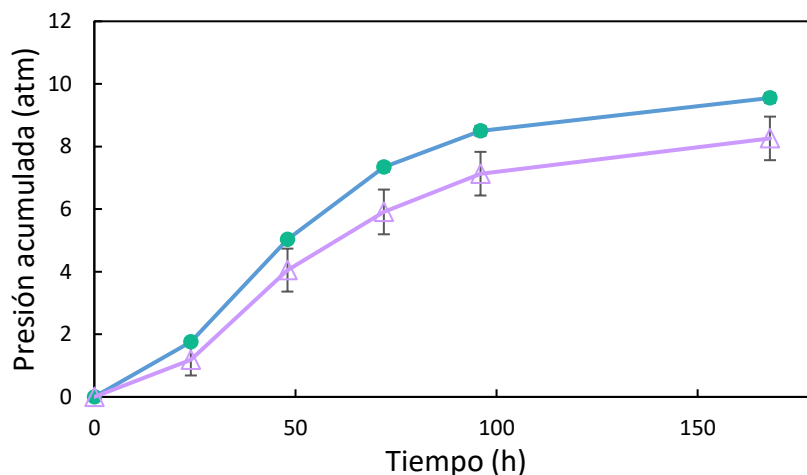


Figura 26. Perfil de la presión acumulada durante el cultivo de *C. beijerinckii* en medio HBM (●) y medio P2 (▲). [Valores medios] ± [SD] por triplicado.

En ambas fermentaciones la mayor producción de gases ocurre entre las 24 y 48 h, para luego incrementarse a una velocidad cada vez menor. En el caso de la fermentación en HBM la presión acumulada al final del cultivo es mayor y corresponde a  $9,55 \pm 0,15$  atm que considerando comportamiento de gas ideal equivale a  $29,20 \pm 0,46$  g/L de gases de fermentación. En el caso del control, la presión acumulada final es  $8,26 \pm 0,70$  atm que equivale, realizando las mismas suposiciones, a  $25,48 \pm 1,73$  g/L de gases de fermentación. Lo anterior es congruente con lo observado en bibliografía, donde las máximas producciones de gas coinciden con la fase de crecimiento celular, el consumo constante de sustrato y el comienzo de la solventogénesis (71). Otra posible explicación a la menor concentración celular obtenida para el cultivo en HBM es que las bacterias dedicaron una mayor parte del carbono a la producción de gas, situación que no solamente se corrobora porque la cantidad de gas generada es mayor para esta fermentación, sino que, además, sintetiza una mayor concentración de acetona si se compara con el control, lo que tiene una directa relación con la formación de CO<sub>2</sub>.

Respecto del tiempo de fermentación se observa que para los perfiles de sustrato y productos las concentraciones se mantienen constantes a partir de las 96 h. Esto es coherente con lo informado en bibliografía empleando bagazo de manzana como sustrato pero también para otros tipos de sustrato de origen vegetal (41–44). Jin *et al.* observaron que la producción de ABE por *C. beijerinckii* P260 alcanzaba su máximo valor también a las entre las 72-96 h dependiendo del pretratamiento aplicado al bagazo de manzana (36). Hijosa-Valsero *et al.* llevaron a cabo fermentaciones ABE con *C. beijerinckii* CECT 508 empleando bagazo de manzana como sustrato, con tiempos de fermentación de 96 h debido a que en ese instante observaron que la concentración de productos se mantenía en estado estacionario (35).

Si se considera que el bagazo de manzana (BM) fue hidrolizado en una relación sólido-líquido del 15%, con un factor de dilución de 1,12 cuando se preparó el medio de cultivo, se obtiene que este contiene una concentración de 0,13 kg/L de HBS. Por lo tanto, desde un punto de vista de la revalorización de biomasa lignocelulósica, considerando las concentraciones finales de butanol, acetona y etanol, se obtiene una producción de 85,69 g, 48,89 g y 3,59 g respectivamente por kg de bagazo de manzana seco, valores que son coherentes con lo observado en literatura. Jin *et al.* reportaron 150,0 g butanol, 46,0 g acetona y 6,8 g etanol por kg de bagazo

de manzana pretratado con agua caliente, y entre 23,3-20,7 g butanol, 12,5-14 g acetona y 6,3-6,7 g etanol para pretratamientos ácidos o álcalis (36). Esto demuestra la importancia de escoger el pretratamiento apropiado para la biomasa utilizada como sustrato que, en este caso, permita potenciar la producción de butanol.

De hecho, si se considera la composición de carbohidratos totales del BM descrita por Vendruscolo *et al.* que alcanza un valor de 82,68% en base seca (19) y una concentración de BM de 0,13 kg/L, se estima una disponibilidad total de azúcares hidrolizables en torno a 107,48 g/L. Dado que la concentración de RTS alcanzada después de la hidrólisis corresponde a 67 g/L, se estima que puede existir un porcentaje importante de carbohidratos que la bacteria no podría ser capaz de metabolizar. Por lo tanto, el pretratamiento podría ser un factor por mejorar con el fin de utilizar de mejor forma los azúcares presentes en el BM.

Se resume en la Tabla 23 los principales parámetros evaluados en la fermentación. El rendimiento de sustrato en butanol ( $Y_{B/S}$ ) coincide con lo observado en literatura para este mismo tipo de sustrato. Hijosa-Valsero *et al* obtuvieron un rendimiento de butanol para el bagazo de manzana pretratado con acetona de 0,19 g/g, mientras que para el pretratado con el surfactante PEG 6000 fue de 0,28 g/g. En el caso de la productividad se obtienen valores más elevados que los reportados para este sustrato en el mismo estudio, que rondan los 0,095 g/L/h (35). Sin embargo, se encuentra entre los valores reportados para otro tipo de sustratos de biomasa revalorizada como el hidrolizado de mazorca de maíz con 0,17 g/L/h y el zumo de tallo de maíz con 0,3 g/L/h de butanol (55). Los rendimientos de butanol, acetona ( $Y_{A/S}$ ), etanol ( $Y_{E/S}$ ) y ABE ( $Y_{ABE/S}$ ) son similares a los reportados por Kudahettige-Nilsson *et al.* con un valor de 0,24 g/g; 0,16 g/g; 0,02 g/g y 0,34 g/g respectivamente (72).

Tabla 23. Rendimientos y productividades obtenidas para la fermentación HBM y control en condiciones óptimas. [Valores medios]  $\pm$  [SD] por triplicado.

Parámetro	Fermentación HBM		Fermentación control	
Rendimiento (g/g)				
$Y_{B/S}$	0,234	$\pm$ 0,001	0,236	$\pm$ 0,003
$Y_{A/S}$	0,132	$\pm$ 0,009	0,082	$\pm$ 0,002
$Y_{E/S}$	0,008	$\pm$ 0,000	0,006	$\pm$ 0,000
$Y_{ABE/S}$	0,373	$\pm$ 0,011	0,324	$\pm$ 0,005
$Y_{X/S}$	0,044	$\pm$ 0,003	0,054	$\pm$ 0,010
$Y_{G/S}$	0,603	$\pm$ 0,010	0,518	$\pm$ 0,035
Productividad (g/L/h)				
Butanol	0,244	$\pm$ 0,244	0,235	$\pm$ 0,027
Acetona	0,130	$\pm$ 0,008	0,080	$\pm$ 0,013
Etanol	0,004	$\pm$ 0,002	0,004	$\pm$ 0,001
ABE	0,378	$\pm$ 0,030	0,319	$\pm$ 0,040
Biomasa	0,034	$\pm$ 0,006	0,041	$\pm$ 0,011
Gas	0,405	$\pm$ 0,005	0,376	$\pm$ 0,039

Nomenclatura:  $Y_{B/S}$ , rendimiento de sustrato en butanol;  $Y_{A/S}$ , rendimiento de sustrato en acetona;  $Y_{E/S}$ , rendimiento de sustrato en etanol;  $Y_{ABE/S}$ , rendimiento de sustrato en ABE;  $Y_{X/S}$ , rendimiento de sustrato en biomasa;  $Y_{G/S}$ , rendimiento de sustrato en gas.

El rendimiento para los gases ( $Y_{G/S}$ ) de fermentación generados es cercano a lo documentado en literatura, según el trabajo de Outram *et al.* corresponde a 0,58 g/g (73), sin embargo es probable que este parámetro varíe en función del microorganismo, el sustrato o incluso la modalidad de cultivo empleada. Respecto del rendimiento de biomasa ( $Y_{X/S}$ ), de acuerdo al mismo autor, tiene un valor de 0,1 g/g (73) que es superior a lo obtenido en este estudio. Sin embargo, en otros trabajos,  $Y_{X/S}$  toma valores entre 0,06-0,07 g/g para *C. beijerinckii* BA101

cultivada en glucosa y en hidrolizado de fibra de maíz, valores mucho más cercanos a lo conseguido en el cultivo HBM y medio control (56).

Como es de esperar, los rendimientos obtenidos son inferiores a los máximos teóricos reportados en bibliografía que corresponden a 0,41 g/g, 0,32 g/g y 0,51 g/g para el butanol, acetona y etanol respectivamente a partir de glucosa. Estos valores son determinados a través de modelos matemáticos de la fermentación ABE que contemplan las reacciones de las principales rutas metabólicas, la cinética de consumo o formación de cada metabolito, el crecimiento celular, la inhibición por productos, entre otros factores (74).

Si se realiza un balance de materia al sustrato consumido, la suma de los rendimientos en los diferentes productos y subproductos de fermentación debería aproximarse al valor de 1. En este caso, la combinación de  $Y_{B/S}$ ,  $Y_{A/S}$ ,  $Y_{E/S}$ ,  $Y_{X/S}$  y  $Y_{G/S}$  alcanza la cifra de 1,01; valor que se considera aceptable tomando en cuenta el margen de error de cada una de las metodologías analíticas aplicadas. Esto indica que la cantidad de sustrato metabolizado por *C. beijerinckii* CECT 508 logra explicar la formación de cada uno de los compuestos analizados.

#### 4.4. Ruta del máximo ascenso

Con el fin de comprobar que las condiciones óptimas obtenidas corresponden a un máximo para la variable dependiente de la concentración de butanol se utilizó la metodología de *steepest ascent*, esto porque para los tres factores estudiados la magnitud que maximiza la respuesta se encontraba en alguno de sus extremos. Esta entrega el camino de mayor pendiente en la superficie de respuesta a través de las condiciones que permiten maximizar una determinada variable. Por lo tanto, permite identificar experimentos clave fuera de la región estudiada para analizar la validez del modelo y corroborar los puntos óptimos que se han identificado.

Los experimentos seleccionados por la metodología *steepest ascent* se indican en la Tabla 24. Como era de esperar, el modelo matemático estima que se alcanzarán concentraciones de butanol muy altas, imposibles de conseguir de forma experimental dadas las características y limitaciones del sistema biológico estudiado. Como la geometría de la superficie de respuestas son planos inclinados y una silla, el algoritmo calcula que para mayores pH y concentración de  $\text{CaCO}_3$  y menores temperaturas se obtendrán cada vez concentraciones de butanol más elevadas. Sin embargo, existen múltiples límites del sistema como la inhibición por alta concentración de butanol en torno a 11-15 g/L para un cultivo *batch*, la concentración de sustrato también es limitada con un valor de 60 g/L, valores de pH muy altos inhibirán el crecimiento, temperaturas muy bajas estancarán las cinéticas de crecimiento y producción de ácidos y solventes, entre otros factores.

Tabla 24. Experimentos realizados que fueron propuestos por la metodología *steepest ascent*.

Experimento	$x_1^*$	$x_2^*$	$x_3^*$	pH	[ $\text{CaCO}_3$ ] (g/L)	T (°C)	$Y_{\text{modelo}}$ (g/L)
17	1,54	1,21	-1,21	7,54	8,62	28,95	16,43
18	3,04	1,54	-1,57	8,04	9,63	27,16	28,86

Nomenclatura:  $Y_{\text{modelo}}$ , concentración de butanol estimada

La realización de estos experimentos complementarios permite considerar e incorporar, de alguna forma, las limitaciones biológicas mencionadas. La concentración de butanol obtenida se presenta en la Tabla 25, se comprobó que los valores obtenidos son similares a los alcanzados a condiciones óptimas con un valor de  $11,46 \pm 0,07$  g/L de butanol. Así queda demostrado que dicha variable no puede incrementarse infinitamente, sino que existe quizás un tipo de meseta o *plateau* a partir de la cual no existen mejoras significativas de la variable respuesta.

Tabla 25. Comparación de la concentración de butanol obtenida para los experimentos complementarios. [Valores medios] ± [SD] por triplicado.

Experimento	$x_1^*$	$x_2^*$	$x_3^*$	$Y_{\text{experimental}} \text{ (g/L)}$
Op	1,00	1,00	-1,00	11,46 ± 0,07
17	1,54	1,21	-1,21	11,41 ± 0,40
18	3,04	1,54	-1,57	11,22 ± 0,76

Nomenclatura:  $Y_{\text{experimental}}$ , concentración de butanol obtenida;  
Op, experimento a condiciones óptimas

En la Tabla 26 se compara el estado de las fermentaciones complementarias con la fermentación a condiciones óptimas a tiempo 0 h y 168 h. Se observa que las condiciones iniciales son similares en términos de concentración de sustrato, pH inicial y solventes. Existe una alta concentración de ácidos orgánicos, en especial de ácido acético, lo que de forma análoga a los experimentos del DBB, comprueba la inoculación de células en fase de crecimiento exponencial.

Tabla 26. pH y concentración (g/L) de los sustratos y productos al comienzo y al final la fermentación óptima y complementarias. [Valores medios] ± [SD] por triplicado.

Exp	pH	TRS	Glucosa	Ác. Butírico	Ác. Acético	Butanol	Etanol	Acetona
<b>Tiempo 0 h</b>								
Op	6,34 ± 0,03	61,22 ± 3,02	13,08 ± 0,43	0,84 ± 0,76	8,50 ± 0,05	0,15 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,25 ± 0,06
17	6,53 ± 0,03	61,52 ± 1,91	11,71 ± 0,80	0,55 ± 0,09	6,29 ± 0,48	0,17 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,00
18	6,56 ± 0,01	62,02 ± 1,62	12,23 ± 1,07	0,29 ± 0,05	6,84 ± 0,34	0,16 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,00
<b>Tiempo 168 h</b>								
Op	6,50 ± 0,03	12,83 ± 2,58	1,795 ± 0,01	0,53 ± 0,01	2,11 ± 0,11	11,46 ± 0,07	0,48 ± 0,03	6,54 ± 0,65
17	6,65 ± 0,03	26,18 ± 0,29	0,625 ± 0,16	0,41 ± 0,05	1,90 ± 0,11	11,41 ± 0,40	0,49 ± 0,02	6,63 ± 0,51
18	6,66 ± 0,13	28,25 ± 1,75	0,804 ± 0,45	0,39 ± 0,08	1,44 ± 0,18	11,22 ± 0,76	0,48 ± 0,03	6,39 ± 0,34

Concentraciones expresadas en g/L.

Nomenclatura: Exp, experimento; TRS, azúcares reductores totales; Op, experimento a condiciones óptimas.

Una vez que el cultivo ha finalizado, se observa una elevación del pH que es superior a todos los experimentos realizados en el DBB, esto por el efecto combinado de alta concentración de solventes generados y la paulatina disminución de ácidos orgánicos. Además, se obtienen concentraciones similares de acetona, butanol y etanol, lo que corrobora la proporción 3,42:6:0,25 respectiva obtenida a condiciones óptimas, caracterizada por una mayor concentración de acetona que el medio control y una baja producción de etanol comparada con la proporción teórica de 3:6:1. Sin embargo, se aprecia un menor consumo de TRS en el caso de los experimentos complementarios lo que se traduce en mejores rendimientos de sustrato en solventes. En este sentido, es importante mencionar que las condiciones que maximizan la producción de butanol pueden diferir de aquellas que maximicen el rendimiento. Además, como el objetivo del estudio es maximizar la concentración, se mantiene el criterio de selección en base a este parámetro.

De esta forma, es posible afirmar que las condiciones óptimas para la fermentación ABE en medio HBM para el cultivo de *Clostridium beijerinckii* CECT 508 que maximizan la concentración de butanol corresponden a pH 7, concentración de  $\text{CaCO}_3$  de 8 g/L y una temperatura de 30 °C.

## 5. Conclusión

Empleando hidrolizado de bagazo de manzana como sustrato se logró llevar a cabo una serie de experimentos según el diseño Box-Behnken para los factores de pH, concentración de carbonato de calcio y la temperatura que influyen en la concentración de butanol generada en la fermentación Acetona-Butanol-Etanol con *Clostridium beijerinckii* CECT 508. Mediante regresión lineal se obtuvo exitosamente un modelo matemático que se representó mediante la metodología de superficie de respuesta, donde se estimó una producción máxima de butanol en 12,6 g/L para las condiciones óptimas de las variables independientes estudiadas.

Se llevó a cabo una fermentación a las condiciones optimizadas de pH 7, concentración de carbonato de calcio de 8 g/L y temperatura de 30 °C, donde se alcanzó una concentración de butanol de  $11,46 \pm 0,07$  g/L lo que demostró el buen nivel de predicción del modelo estudiado con un error de 4,98%. La causa principal de que estas circunstancias favorecieran la síntesis del alcohol es evitaron el *acid crash* y permitieron una apropiada transición entre la fase acidogénica y solventogénica. Se logró realizar un seguimiento al cultivo para los parámetros de pH, biomasa, ácidos y solventes, lo que permitió conocer y evaluar el desarrollo de la fermentación en diferentes momentos. De forma adicional, se concluye que el monitoreo del lactato y la producción de gas aporta información valiosa sobre la evolución del cultivo a través de métodos analíticos sencillos y baratos.

Se comprobó que las condiciones estudiadas fueran verdaderos óptimos mediante la realización de experimentos complementarios a condiciones fuera de la región estudiada predichos por la metodología *steepest ascent*. A partir de dichos resultados se observó que no se produjo un incremento en la variable respuesta, lo que confirma la ubicación del máximo. De esta forma, es posible afirmar que se logró el objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Máster.

El hidrolizado de bagazo de manzana demostró ser un sustrato apropiado para la producción de butanol mediante la fermentación ABE al mostrar resultados similares al control en medio sintético y los encontrados en bibliografía, ya que la concentración alcanzada se encontró dentro del límite máximo de inhibición de este compuesto (11-15 g/L). A pesar de que existen importantes desafíos a resolver, estos resultados demostraron el claro potencial de esta biomasa lignocelulósica para ser revalorizado en una biorefinería multicomponente que genere compuestos nutraceuticos, enzimas y biocombustible.

Como proyecciones de este estudio se plantea la realización de un diseño experimental que permita evaluar la posible reducción de la concentración de carbonato de calcio utilizada sin afectar de forma significativa la producción de butanol. Además, se propone estudiar mejores pretratamientos, la composición detallada del hidrolizado de bagazo de manzana utilizado, y la evolución del consumo de los diferentes tipos de azúcar durante el cultivo, ya que dicha dinámica podría explicar varios de los fenómenos observados en la fermentación. Finalmente, sería conveniente evaluar la modalidad de cultivo *feed-batch* o implementar técnicas de separación *in-situ*, como la fermentación extractiva, en medio HBS con el fin de mitigar el efecto inhibitorio del butanol lo que permitiría potenciar su producción.

## 6. Referencias

1. BP. Statistical Review of World Energy globally consistent data on world energy markets and authoritative publications in the field of energy. 2020, no. 69th edition, p. 66. Disponible en: <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2020-full-report.pdf>.
2. Höök, M. y Tang, X. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change-A review. *Energy Policy*. Elsevier, 2013, vol. 52, p. 797-809. DOI 10.1016/j.enpol.2012.10.046.
3. Capellán-Pérez, I. et al. Fossil fuel depletion and socio-economic scenarios: An integrated approach. *Energy*. Elsevier Ltd, 2014, vol. 77, p. 641-666. DOI 10.1016/j.energy.2014.09.063.
4. Escobar, J.C. et al. Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon, 2009, vol. 13, no. 6-7, p. 1275-1287. DOI 10.1016/j.rser.2008.08.014.
5. IPCC. *Preguntas frecuentes Cambio climático 2013 Bases físicas Resumen para responsables de políticas*. 2013. ISBN 9789291693382. Disponible en: [https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/WG1AR5\\_SummaryVolume\\_FINAL\\_SPANISH.pdf](https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/WG1AR5_SummaryVolume_FINAL_SPANISH.pdf).
6. PE. Los europeos creen que el cambio climático debe ser la primera prioridad del PE | Noticias | Parlamento Europeo. En: *Noticias Parlamento Europeo*. 2019. [consulta: 18 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.europarl.europa.eu/news/es/press-room/20191129IPR67710/los-europeos-creen-que-el-cambio-climatico-debe-ser-la-primera-prioridad-del-pe>.
7. PE. Reducir las emisiones de los automóviles: nuevos objetivos de CO2 | Noticias | Parlamento Europeo. En: *Noticias Parlamento Europeo*. 2018. [consulta: 18 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.europarl.europa.eu/news/es/headlines/society/20180920STO14027/reducir-las-emisiones-de-los-automoviles-nuevos-objetivos-de-co2>.
8. Naciones Unidas. Convenio sobre la diversidad biológica naciones unidas 1992. En: [en línea]. 1992, Disponible en: <https://www.cbd.int/programmes/outreach/awareness/publications.shtml>.
9. NSF - OLPA - Dr. Rita R. Colwell's- «The Flag of Biotechnology,» US-EC Task Force on Biotechnology Research, Arlington, Virginia, June 25, 2003. [consulta: 18 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.nsf.gov/news/speeches/colwell/rc030625usctask.htm>.
10. Heux, S. et al. White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 2015, vol. 33, no. 8, p. 1653-1670. DOI 10.1016/j.biotechadv.2015.08.004.
11. Bazzanella, A. SusChem reaction & Process Design-Sustainable and Competitive Chemicalproduction in Europe. *ChemSusChem*. 2008, vol. 1, no. 8-9, p. 775-776. DOI 10.1002/cssc.200800131.
12. Clark, J. y Deswarte, F. The Biorefinery Concept: An Integrated Approach. En: *Introduction to Chemicals from Biomass: Second Edition*. Wiley Blackwell, 2015, p. 1-29. ISBN 9781118714478. DOI 10.1002/9781118714478.ch1.
13. Kamm, B. y Kamm, M. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer, 2004, vol. 64, no. 2, p. 137-145. DOI 10.1007/s00253-003-1537-7.

14. Biorefinery for apple pomace: nutraceuticals, enzymes and biofuels (ULTREIA) | Group of Environmental Biotechnology. [consulta: 19 mayo 2021]. Disponible en: <https://biogroup.usc.es/ultreia>.
15. Perussello, C.A. et al. Valorization of Apple Pomace by Extraction of Valuable Compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Blackwell Publishing Inc., 2017, vol. 16, no. 5, p. 776-796. DOI 10.1111/1541-4337.12290.
16. Okoli, C.O. y Adams, T.A. Design and Assessment of Advanced Thermochemical Plants for Second Generation Biobutanol Production Considering Mixed Alcohols Synthesis Kinetics. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2017, vol. 56, no. 6, p. 1543-1558. DOI 10.1021/acs.iecr.6b03196.
17. FAOSTAT. En: [en línea]. 2021. [consulta: 21 mayo 2021]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
18. Waldbauer, K., Mckinnon, R. y Kopp, B. Apple Pomace as Potential Source of Natural Active Compounds. *Planta Med*. 2017, vol. 83, no. 12-13, p. 994-1010. DOI 10.1055/s-0043-111898.
19. Vendruscolo, F. et al. Apple Pomace : A Versatile Substrate for Biotechnological Applications Apple Pomace : A Versatile Substrate for Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008, vol. 28, p. 1-13. DOI 10.1080/07388550801913840.
20. Sudha, M.L. Apple Pomace (By-Product of Fruit Juice Industry) as a Flour Fortification Strategy. *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., 2011, p. 395-405. DOI 10.1016/B978-0-12-380886-8.10036-4.
21. Dhillon, G.S., Kaur, S. y Brar, S.K. Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon, 2013, vol. 27, p. 789-805. DOI 10.1016/j.rser.2013.06.046.
22. Nigam, P.S. y Singh, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*. Pergamon, 2011, vol. 37, no. 1, p. 52-68. DOI 10.1016/j.pecs.2010.01.003.
23. Bórawski, P. et al. Development of renewable energy sources market and biofuels in The European Union. *Journal of Cleaner Production*. Elsevier Ltd, 2019, vol. 228, p. 467-484. DOI 10.1016/j.jclepro.2019.04.242.
24. EU. Directive 2009/28/EC of The European Parliament and of The Council of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/ 30/EC. En: *Off J European Union* [en línea]. 2009. [consulta: 25 mayo 2021]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32009L0028&from=EN>.
25. OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026 : BIOFUEL - OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026. En: [en línea]. [consulta: 25 mayo 2021]. Disponible en: <https://stats.oecd.org/index.aspx?queryid=76849>.
26. Trindade, W.R. da S. y Santos, R.G. dos. Review on the characteristics of butanol, its production and use as fuel in internal combustion engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd, 2017, vol. 69, p. 642-651. DOI 10.1016/j.rser.2016.11.213.
27. Green, E.M. Fermentative production of butanol-the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Current Trends, 2011, vol. 22, no. 3, p. 337-343. DOI 10.1016/j.copbio.2011.02.004.

28. Heaton, C.A. *The Chemical Industry* [en línea]. Boston, MA: Springer US, 1991. ISBN 978-0-216-91803-0. [consulta: 27 mayo 2021]. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-8541-1>.
29. Amiri, H. y Karimi, K. Biobutanol production. *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts: Technologies and Approaches for Scale-Up and Commercialization*. Elsevier, 2019, p. 109-133. DOI 10.1016/B978-0-12-817941-3.00006-1.
30. Bankar, S.B. et al. Biobutanol: The outlook of an academic and industrialist. *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 2013, vol. 3, no. 47, p. 24734-24757. DOI 10.1039/c3ra43011a.
31. Yoo, M., Nguyen, N.-P.-T. y Soucaille, P. Trends in Systems Biology for the Analysis and Engineering of *Clostridium acetobutylicum* Metabolism. *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 2020, vol. 28, no. 2, p. 118-140. DOI 10.1016/j.tim.2019.09.003.
32. Lütke-Eversloh, T. y Bahl, H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: Recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Current Trends, 2011, vol. 22, no. 5, p. 634-647. DOI 10.1016/j.copbio.2011.01.011.
33. Su, Z. et al. Reassessment of the role of CaCO<sub>3</sub> in n-butanol production from pretreated lignocellulosic biomass by *Clostridium acetobutylicum*. *Scientific Reports*. Nature Research, 2020, vol. 10, no. 1, p. 1-10. DOI 10.1038/s41598-020-74899-9.
34. Yang, X. et al. A comparison of three pH control methods for revealing effects of undissociated butyric acid on specific butanol production rate in batch fermentation of *Clostridium acetobutylicum*. *AMB Express*. Springer Nature, 2013, vol. 3, no. 1, p. 3. DOI 10.1186/2191-0855-3-3.
35. Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I. y Díez-Antolínez, R. Biobutanol production from apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag, 2017, vol. 101, no. 21, p. 8041-8052. DOI 10.1007/s00253-017-8522-z.
36. Jin, Q. et al. Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation of soluble and hydrolyzed sugars in apple pomace by *Clostridium beijerinckii* P260. *Fuel*. Elsevier Ltd, 2019, vol. 244, p. 536-544. DOI 10.1016/j.fuel.2019.01.177.
37. Maiti, S. et al. Hydrolytic pre-treatment methods for enhanced biobutanol production from agro-industrial wastes. *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 2018, vol. 249, p. 673-683. DOI 10.1016/j.biortech.2017.09.132.
38. Peñas González, H. Solvent-based approaches to evaluate the ABE extractive fermentation. Tesis doctoral, Dept. Enxeñaría Química, Universidade de Santiago de Compostela En: [en línea]. 2019. [consulta: 17 junio 2021]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10347/20522>.
39. Botana, N. Utilización de biomasa pretratada mediante o proceso Organosolv como sustrato en cultivos *Clostridium* para a produción de ABE por fermentación extractiva. Trabajo de Fin de Máster, Dept. Enxeñaría Química, Universidade de Santiago de Compostela . 2017.
40. Prado, I. Utilización de bagazo de manzana para la extracción de compuestos fenólicos y para la produción de ABE en cultivos *Clostridium*. Trabajo de Fin de Máster, Dept. Enxeñaría Química, Universidade de Santiago de Compostela. 2021.
41. Al-Shorgani, N.K.N. et al. Process optimization of butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) using palm oil mill effluent in acetone-butanol-ethanol fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 2015, vol. 4, no.

2, p. 244-249. DOI 10.1016/j.bcab.2015.02.004.

42. Narueworanon, P. et al. Impacts of initial sugar, nitrogen and calcium carbonate on butanol fermentation from sugarcane molasses by *Clostridium beijerinckii*. *Energies*. MDPI AG, 2020, vol. 13, no. 3, p. 694. DOI 10.3390/en13030694.

43. Lin, Y.S. et al. Optimization of butanol production from corn straw hydrolysate by *Clostridium acetobutylicum* using response surface method. *Chinese Science Bulletin*. Springer, 2011, vol. 56, no. 14, p. 1422-1428. DOI 10.1007/s11434-010-4186-0.

44. Wang, Y. y Blaschek, H.P. Optimization of butanol production from tropical maize stalk juice by fermentation with *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Bioresource Technology*. Elsevier, 2011, vol. 102, no. 21, p. 9985-9990. DOI 10.1016/j.biortech.2011.08.038.

45. Wang, Q. et al. Optimization of biobutanol production from poplar wood hydrolysate using a mutant of *Clostridium saccharobutylicum*. *BioResources*. North Carolina State University, 2016, vol. 11, no. 2, p. 2998-3012. DOI 10.15376/biores.11.2.2998-3012.

46. Wood, I.P. et al. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*. Pergamon, 2012, vol. 44, p. 117-121. DOI 10.1016/j.biombioe.2012.05.003.

47. Shao, Y. y Lin, A.H.M. Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 2018, vol. 240, p. 898-903. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.07.083.

48. SPINREACT, S.A. /S. A.. Glucose-TR. Enzymatic colorimetric. 2013. [consulta: 8 junio 2021]. Disponible en: [http://www.spinreact.com/files/Inserts/inserts\\_portugues/BSIS17-P\\_GLUCOSE-TR\\_02-2013.pdf](http://www.spinreact.com/files/Inserts/inserts_portugues/BSIS17-P_GLUCOSE-TR_02-2013.pdf).

49. SPINREACT, S.A. /S. A.. Lactate LO-POD. Enzymatic colorimetric. 2013. [consulta: 12 junio 2021]. Disponible en: [https://www.spinreact.com/assets/files/Inserts/Bioquimica/BSIS26\\_Lactato-2016.pdf](https://www.spinreact.com/assets/files/Inserts/Bioquimica/BSIS26_Lactato-2016.pdf).

50. Seo, S.O. et al. Characterization of a *Clostridium beijerinckii* spo0A mutant and its application for butyl butyrate production. *Biotechnology and Bioengineering*. John Wiley and Sons Inc., 2017, vol. 114, no. 1, p. 106-112. DOI 10.1002/bit.26057.

51. El Kanouni, A. et al. The improvement of glucose/xylose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* using calcium carbonate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, 1998, vol. 14, no. 3, p. 431-435. DOI 10.1023/A:1008881731894.

52. Mee, R. y Xiao, J. Steepest Ascent for Multiple-Response Applications on JSTOR. *Technometrics*. 2008, vol. 50, n, p. 371-382. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/25471497?seq=1>.

53. Sirisantimethakom, L. et al. Improvement of butanol production from sweet sorghum juice by *Clostridium beijerinckii* using an orthogonal array design. *Industrial Crops and Products*. Elsevier B.V., 2016, vol. 79, p. 287-294. DOI 10.1016/j.indcrop.2015.11.012.

54. Guan, W. et al. Acetone-butanol-ethanol production from Kraft paper mill sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 2016, vol. 200, p. 713-721. DOI 10.1016/j.biortech.2015.10.102.

55. Zhang, J. y Jia, B. Enhanced butanol production using *Clostridium beijerinckii* SE-2 from the waste of corn processing. *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 2018, vol. 115, p. 260-266. DOI 10.1016/j.biombioe.2018.05.012.

56. Qureshi, N. et al. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresource Technology*. 2008, vol. 99, no. 13, p. 5915-5922. DOI 10.1016/j.biortech.2007.09.087.
57. Haus, S. et al. A systems biology approach to investigate the effect of pH-induced gene regulation on solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *BMC Systems Biology*. 2011, vol. 5, no. 10. DOI 10.1186/1752-0509-5-10.
58. Han, B. et al. Use of proteomic analysis to elucidate the role of calcium in acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, vol. 79, no. 1, p. 282-293. DOI 10.1128/AEM.02969-12.
59. Maddox, I. et al. The cause of “Acid crash” and “Acidogenic fermentations” during the batch Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation process. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* [en línea]. 2000, vol. 2, no. 1, p. 95-100. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10937493/>.
60. Wang, Y. et al. Development of a gene knockout system using mobile group II introns (Targetron) and genetic disruption of acid production pathways in *Clostridium beijerinckii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, vol. 79, no. 19, p. 5853-5863. DOI 10.1128/AEM.00971-13.
61. González-Peñas, H. et al. Organosolv pretreated beech wood as a substrate for acetone butanol ethanol extractive fermentation. *Holzforschung*. De Gruyter, 2019, vol. 73, no. 1, p. 55-64. DOI 10.1515/hf-2018-0098.
62. Veza, I., Muhamad Said, M.F. y Latiff, Z.A. Recent advances in butanol production by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 2021, vol. 144, p. 105919. DOI 10.1016/j.biombioe.2020.105919.
63. Ezeji, T.C., Qureshi, N. y Blaschek, H.P. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer, 2003, vol. 19, no. 6, p. 595-603. DOI 10.1023/A:1025103011923.
64. Ni, Y., Wang, Y. y Sun, Z. Butanol production from cane molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: Batch and semicontinuous fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Springer, 2012, vol. 166, no. 8, p. 1896-1907. DOI 10.1007/s12010-012-9614-Y.
65. Youn, S.H. et al. Effective isopropanol–butanol (IB) fermentation with high butanol content using a newly isolated *Clostridium* sp. A1424. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, vol. 9, no. 1, p. 230. DOI 10.1186/s13068-016-0650-7.
66. Dai, Z. et al. Introducing a single secondary alcohol dehydrogenase into butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum* Rh8 switches ABE fermentation to high level IBE fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central, 2012, vol. 5, no. 1, p. 1-10. DOI 10.1186/1754-6834-5-44.
67. Vieira, C.F. dos S. et al. Sugarcane bagasse hydrolysates as feedstock to produce the isopropanol-butanol-ethanol fuel mixture: Effect of lactic acid derived from microbial contamination on *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 2021, vol. 319, p. 124140. DOI 10.1016/j.biortech.2020.124140.
68. Sonomoto, K. et al. Efficient conversion of lactic acid to butanol with pH-stat continuous lactic acid and glucose feeding method by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer, 2010, vol. 87, no. 3, p. 1177-1185. DOI

10.1007/s00253-010-2673-5.

69. Yoshida, T., Tashiro, Y. y Sonomoto, K. Novel high butanol production from lactic acid and pentose by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Elsevier, 2012, vol. 114, no. 5, p. 526-530. DOI 10.1016/j.jbiosc.2012.06.001.

70. Zhou, Q., Liu, Y. y Yuan, W. Kinetic modeling of lactic acid and acetic acid effects on butanol fermentation by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Fuel*. Elsevier Ltd, 2018, vol. 226, p. 181-189. DOI 10.1016/j.fuel.2018.04.019.

71. Du, G.Q. et al. Design of online off-gas analysis system for anaerobic ABE fermentation and the strategy for improving biobutanol production. *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 2016, vol. 51, no. 5, p. 555-560. DOI 10.1016/j.procbio.2016.02.010.

72. Kudahettige-Nilsson, R.L. et al. Biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum* using xylose recovered from birch Kraft black liquor. *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 2015, vol. 176, p. 71-79. DOI 10.1016/j.biortech.2014.11.012.

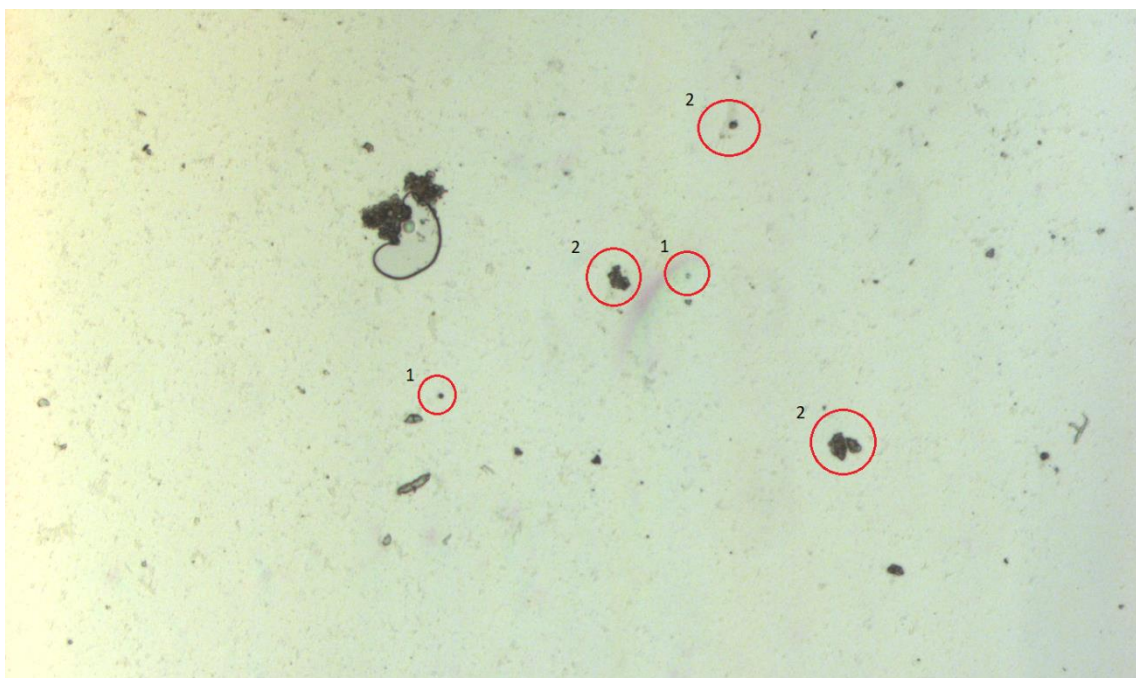
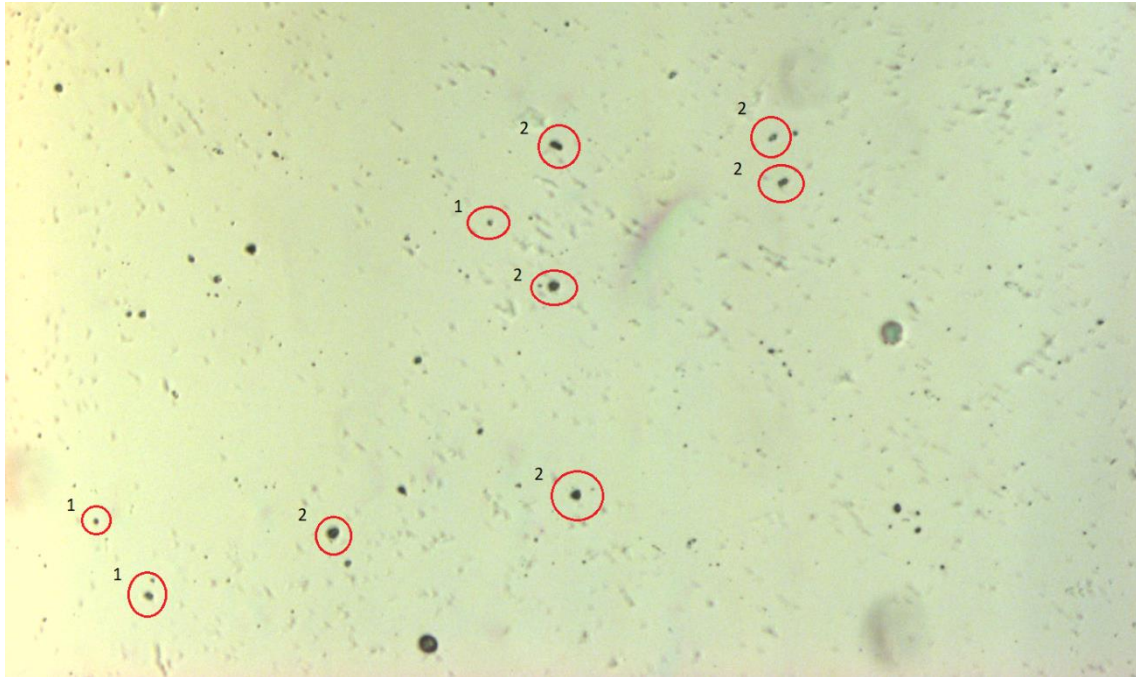
73. Outram, V. et al. A comparison of the energy use of in situ product recovery techniques for the Acetone Butanol Ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 2016, vol. 220, p. 590-600. DOI 10.1016/j.biortech.2016.09.002.

74. Mayank, R., Ranjan, A. y Moholkar, V.S. Mathematical models of ABE fermentation: Review and analysis. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2013, vol. 33, no. 4, p. 419-447. DOI 10.3109/07388551.2012.726208.

## Anexos

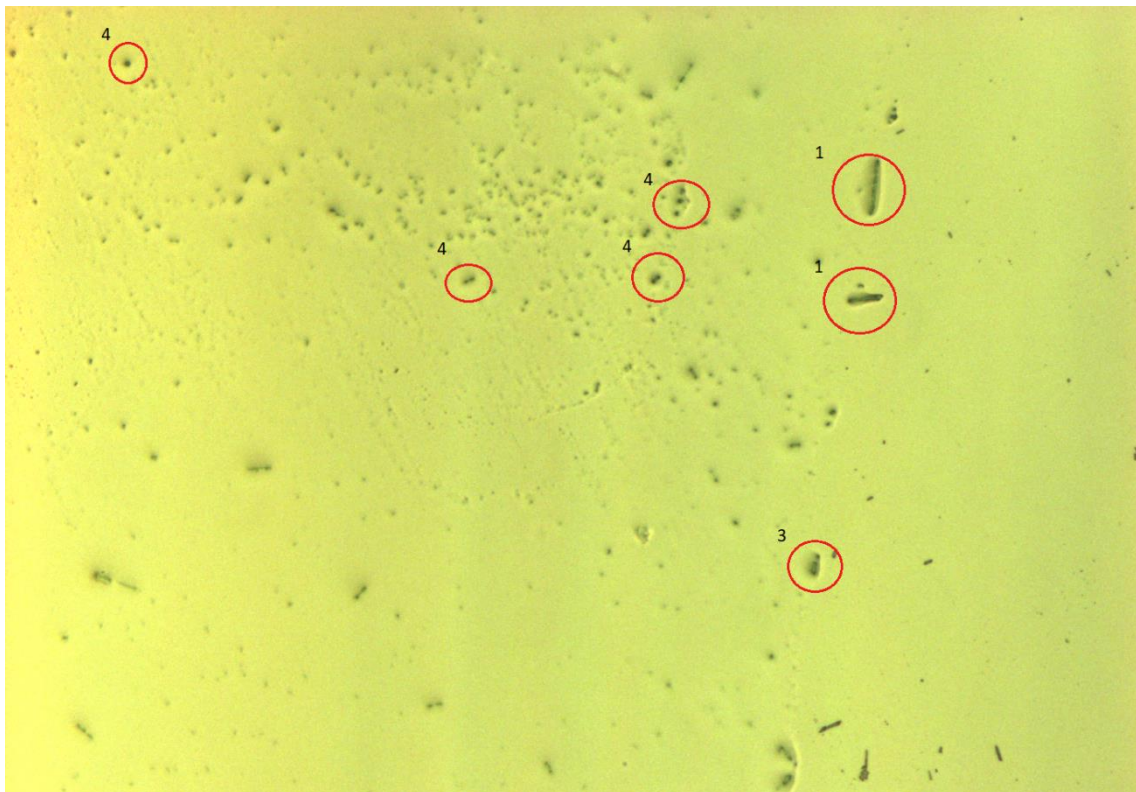
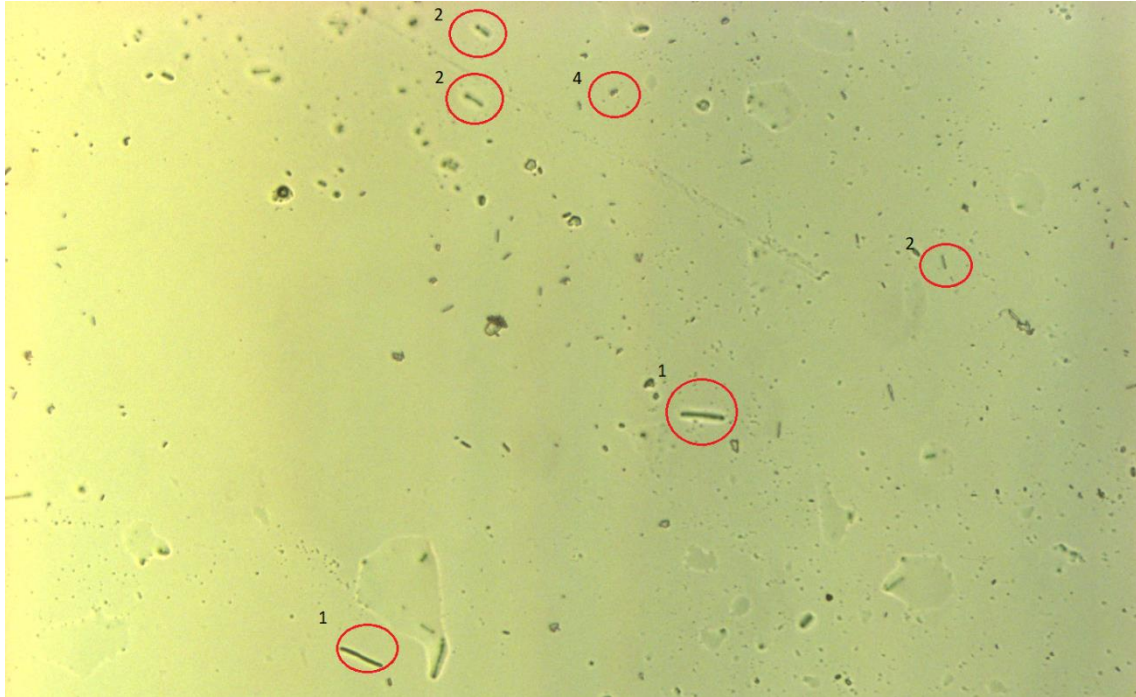
### Anexo A. Fotografías de cultivos en placa

Se realizaron empleando un microscopio microscopio óptico Nikon Labophot, equipado con una cámara Nikon asociada al software Nis Elements D 4.40.000 con un aumento de 10x. Permiten comprobar la presencia de esporas de *Clostridium beijerinckii* en los cultivos en placa de Petri. Nomenclatura: 1, esporas individuales; 2, agregados celulares de esporas.



## Anexo B. Fotografías de cultivos en medio de reactivación

Se realizaron empleando un microscopio microscopio óptico Nikon Labophot, equipado con una cámara Nikon asociada al software Nis Elements D 4.40.000, con un aumento de 10x. Permiten comprobar la presencia de diversas morfologías celulares de *Clostridium beijerinckii* en los cultivos de crecimiento con medio de reactivación ATCC 2107. Nomenclatura: 1, células vegetativas; 2, células con morfología clostridia; 3, endoesporas; 4, esporas individuales o agregadas.



## Anexo C. Script utilizado en RStudio para la verificación del modelo matemático

Requiere las bibliotecas de superficie de respuesta "rsm" y de optimización "minqa".

```
# *****
# R-CRAN script
# Created by Thelmo A. Lu-Chau
# & edited by Javier Bravo Venegas
# vie 4 Jun 2021 20:01:53 CET
#
# -----
# Data from "headers// x1, x2, x3, block, Y ..." data file
# -----
#
# -----
# In MS Windows
# Include the R directory (e.g. "C:\Program Files\R\R-4.0.3\bin") in PATH
# Run the script as "R.exe CMD BATCH rsm-script.R" from the directory containing the "Y-
data.txt" file
# -----
#
library("rsm")
library("minqa")
#
n.line <-function(n)
{
  for (i in 1:n){cat("-")}
  cat("\n")
}
# Mean and diference values for coding Y data
xl <- c(1:6)
xl[1] <- 6
xl[2] <- 1
xl[3] <- 5
xl[4] <- 3
xl[5] <- 35
xl[6] <- 5
#
DataTable <- read.table("Y-data.txt", header = TRUE)
CR <- coded.data(DataTable, x1 ~ (pH - xl[1])/xl[2], x2 ~ (CaCO3 - xl[3])/xl[4], x3 ~ (T -
xl[5])/xl[6])
#
# CR <- coded.data(DataTable, x1 ~ (temp - 37.5)/12.5, x2 ~ (time - 135)/105, x3 ~ (LSR -
12.5)/7.5)
#
# -----
# rsm.1 -> First Order (FO) model
# CR.rsm1 <- rsm(Y ~ FO(x1, x2, x3), data = CR)
# summary (CR.rsm1)
# sa1 <- steepest(CR.rsm1)
# -----
#
# rsm.2 -> Second Order (SO) model
#
CR.rsm2 <- rsm(Y ~ SO(x1, x2, x3), data = CR)
sa1 <- steepest(CR.rsm2, dist=seq(0,3,by=0.1))
sa2 <- canonical.path(CR.rsm2, dist = seq(-2, 2, by = 0.2))
# -----
# maxf {1, 0} to {maximize, minimize}
#
maxf <- 1
p <- CR.rsm2[[1]]
#
# t <- c(1:17)
# for (n in 1:10) {t[n] <- p[n]}
```

```

# for (n in 1:6) {t[n+10] <- p[n]}
# write.table(t, file = "parameters.csv", sep = " ", col.names = NA, qmethod = "double")
#
# To remove a non-significant parameter from the FO change p[i] of that parameter to 0:
# p[i] <- 0
#
fr <- function(x) {
-maxf*( p[1] + p[2]*x[1] + p[3]*x[2] + p[4]*x[3] + p[5]*x[1]*x[2] + p[6]*x[1]*x[3] +
p[7]*x[2]*x[3] + p[8]*x[1]^2 + p[9]*x[2]^2 +p[10]*x[3]^2 )
}
#
xopt <- bobyqa(c(-1, -1, -1), fr, lower = c(-1, -1, -1), upper = c(1, 1, 1))
if (maxf == 1) {xopt.target <- xopt[[2]]*-1} else {xopt.target <- xopt[[2]]}
xopt[[2]] <- xopt.target
xopt.iterations <- xopt[[3]]
xopt.cod <- xopt[[1]]
xopt.dec <- code2val (c(x1=xopt[[1]][1], x2=xopt[[1]][2], x3=xopt[[1]][3]), codings =
codings(CR))
#
# -----
t <- c(1:17)
for (n in 1:10) {t[n] <- p[n]}
for (n in 1:6) {t[n+10] <- xl[n]}
t[17] <- xopt.target
write.table(t, file = "parameters.csv", sep = " ", col.names = NA, qmethod = "double")
#
#
out <- capture.output(cat("A) ORIGINAL DATA\n"), n.line(31), CR, file="rsm-output.txt")
out <- capture.output(cat("\n\nB) RSM ANALYSIS\n"), n.line(53), summary(CR.rsm2),
file="rsm-output.txt", append = TRUE)
out <- capture.output(cat("C) OPTIMAL VALUES\n"), file="rsm-output.txt", append = TRUE)
out <- capture.output(n.line(44), xopt, file="rsm-output.txt", append = TRUE)
out <- capture.output(cat("\nOptimal decoded values\n\n"), xopt.dec, file="rsm-output.txt",
append = TRUE)
out <- capture.output(cat("\n\nD) STEEPEST ASCENT\n"), n.line(60), sa1, file="rsm-
output.txt", append = TRUE)
out <- capture.output(cat("\n\nE) CANONICAL PATH\n"), n.line(72), sa2, file="rsm-
output.txt", append = TRUE)
#
pdf("rsm-Y.pdf")
# To print all RSMs ( ..., ~x1+x2+x3, ...)
#persp(CR.rsm2, x1 ~ x2, theta = 30, zlab = "Y", MAIN = NULL, col = rainbow(50), contours
= "colors", expand = 0.8)
persp(CR.rsm2, x1 ~ x2, theta = 30, zlab = "ButOH", MAIN = NULL, col = rainbow(50),
contours = "colors")
par(mfrow = c(2, 2))
plot(CR.rsm2)
#
plot(yhat ~ dist, data = sa1)
title(main="Steepest ascent")
#
plot(yhat ~ dist, data = sa2)
title(main="Canonical path")
dev.off()

```