



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**INGENIERIA**

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**Facultad de Ciencias**  
**Facultad de Ingeniería**

Tesis para optar al título de  
Licenciado en Bioquímica:

**Producción de Isopropanol-Butanol-Etanol como combustible  
utilizando *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 a partir de jugos  
industriales de caña de azúcar y sorgo dulce**

**Mauricio Fabián Ávila Araujo**

Tutoras: Dra. Ing. Claudia Lareo, Ing. Eloísa Rochón

Departamento de Bioingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UdelaR

Montevideo, Uruguay  
2018

# PÁGINAS PRELIMINARES

Mauricio Fabián  
Ávila Araujo



FACULTAD DE  
CIENCIAS



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE



INGENIERIA

1

Producción de Isopropanol-Butanol-Etanol como combustible utilizando  
*Clostridium beijerinckii* DSM 6423 a partir de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce

Mauricio Fabián Ávila Araujo

# Agradecimientos

A todo el departamento de Bioingeniería y al de Biotecnología de Procesos para el Ambiente de Facultad de Ingeniería, por la grata experiencia en ambos y el vasto aprendizaje técnico-científico, así como social y moral en los mismos.

A mis tutoras Claudia Lareo y Eloísa Rochón por su paciencia, dedicación y en especial, su capacidad de transmisión de información en todo el proceso.

A la Facultad de Ciencias por haber permitido mi formación de manera gratuita, al máximo nivel y con un excelente cuerpo docente.

A mi familia: mis hermanos, mis madres y mi sobrino.

A mis amigos, y todos los que siempre me dieron *pa' delante* y me *aguantaron la cabeza*, en este arduo proceso.

# Índice de contenidos

## 1. Introducción

1.1.	Energías renovables y alternativas	11
1.1.1.	Introducción	11
1.1.2.	Concepción histórica	11
1.1.3.	Amenazas para el medio ambiente y el ser humano del petróleo y sus derivados	12
1.1.4.	Reservas y previsión de fuentes	12
1.2.	Biocombustibles	13
1.2.1.	Definición	13
1.2.2.	Antecedentes y perspectivas	14
1.2.3.	Biocombustibles en Uruguay	14
1.3.	Biobutanol	17
1.3.1.	Definición	17
1.3.2.	Historia	17
1.3.3.	Ventajas frente al bioetanol	18
1.3.4.	Potencial y alcance	19
1.4.	Producción de Biobutanol	19

## 2. Objetivos

2.1.	Objetivo general	25
2.2.	Objetivos específicos	25

## 3. Materiales y métodos

3.1.	Materia Prima	27
3.2.	Ensayos de Fermentación	27
3.2.1.	Desarrollo de inóculo	27
3.2.2.	Evaluación de la toxicidad del butanol sobre el crecimiento y la producción de solventes de <i>C. beijerinckii</i> DSM 6423	27
3.2.3.	Evaluación de la toxicidad del antiespumante sobre el crecimiento y la producción de solventes de <i>C. beijerinckii</i> DSM 6423	28
3.2.4.	Evaluación del agregado de ácido butírico como precursor de butanol	28
3.2.5.	Evaluación del efecto del agregado de CSL como nutriente al medio de fermentación	28
3.2.6.	Evaluación del efecto de la concentración de azúcares iniciales en la cinética de fermentación	29
3.2.7.	Evaluación de la concentración de CSL del medio de fermentación	30
3.3.	Determinaciones analíticas	30
3.3.1.	Determinación de azúcares	31
3.3.2.	Determinación de solventes	31
3.3.3.	Determinación de biomasa	31
3.4.	Análisis estadístico	32
3.5.	Cálculos	32

<b>4.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	
4.1.	Evaluación de la toxicidad de la cepa frente a butanol	35
4.2.	Evaluación del agregado de ácido butírico como precursor	40
4.3.	Evaluación del agregado de CSL como nutriente al medio de fermentación	46
4.4.	Evaluación de la concentración de azúcares iniciales del medio de fermentación	53
4.5.	Evaluación de la concentración de CSL del medio de fermentación	57
<b>5.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Anexo</b>	
7.1.	Composición soluciones stock	74
7.2.	Curva de calibración para la determinación de la biomasa	76
7.3.	Resultados del análisis estadístico	77
7.3.1.	Evaluación de la toxicidad de la cepa frente a butanol	77
7.3.2.	Evaluación del agregado de ácido butírico como precursor	81
7.3.3.	Evaluación del agregado de CSL como nutriente al medio de fermentación	85
7.3.4.	Evaluación de la concentración de azúcares iniciales del medio de fermentación	89
7.3.5.	Evaluación de la concentración de CSL del medio de fermentación	93
7.4.	Parámetros del análisis estadístico	97

# Índice de figuras

<b>Figura 1:</b>	Producción de biocombustibles por continente en millones de toneladas. Producción de etanol y biodiesel entre 2006 y 2016 dividida por continente	<b>13</b>
<b>Figura 2:</b>	Vías metabólicas en <i>C. acetobutylicum</i> y <i>C. beijerinckii</i>	<b>21</b>
<b>Figura 3:</b>	Diagrama esquemático de las rutas metabólicas de <i>C. acetobutylicum</i> modificadas genéticamente para la producción de IBE	<b>23</b>
<b>Figura 4:</b>	Perfiles de biomasa, ácidos, azúcares y solventes, ante el agregado de butanol en concentraciones de 0,3 y 3,0 g/L	<b>36</b>
<b>Figura 5:</b>	Perfiles de biomasa, ácidos, azúcares y solventes, ante el agregado de butanol en concentraciones de 5,3 y 7,5 g/L	<b>37</b>
<b>Figura 6:</b>	Perfiles de biomasa, ácidos, azúcares y solventes, ante el agregado de antiespumante, 1% (v/v)	<b>38</b>
<b>Figura 7:</b>	Perfiles de biomasa, ácidos, azúcares y solventes, ante el agregado de ácido butírico en concentraciones de 0,5 y 1,5 g/L	<b>42</b>
<b>Figura 8:</b>	Perfiles de biomasa, ácidos, azúcares y solventes, ante el agregado de ácido butírico en concentraciones de 2,2 y 4,8 g/L	<b>43</b>
<b>Figura 9:</b>	Perfiles de biomasa, ácidos, azúcares y solventes, ante el agregado de ácido butírico a una concentración de 6,5 g/L	<b>44</b>
<b>Figura 10:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, cuando todos los nutrientes del medio (buffer, minerales, vitaminas y extracto de levadura) son sustituidos por CSL	<b>47</b>
<b>Figura 11:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes en presencia de buffer, minerales, vitaminas y extracto de levadura y ausencia de CSL.	<b>48</b>
<b>Figura 12:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, cuando la complejo polivitamínico B Dispert® y el extracto de levadura del medio se sustituyen por CSL	<b>49</b>
<b>Figura 13:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, cuando la complejo polivitamínico B Dispert® se sustituye por CSL	<b>50</b>
<b>Figura 14:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, cuando el extracto de levadura del medio se sustituye por CSL	<b>51</b>
<b>Figura 15:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes a concentraciones iniciales de azúcares de 39 y 68 g/L	<b>54</b>
<b>Figura 16:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes a concentraciones iniciales de azúcares de 89 y 113 g/L	<b>55</b>

<b>Figura 17:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes a una concentración de CSL de 0 g/L	<b>58</b>
<b>Figura 18:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes a una concentración de CSL de 5 g/L	<b>59</b>
<b>Figura 19:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes a una concentración de CSL de 10 g/L	<b>60</b>
<b>Figura 20:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes a una concentración de CSL de 15 g/L	<b>61</b>
<b>Figura 21:</b>	Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes a una concentración de CSL es de 20 g/L	<b>62</b>
<b>Figura 22:</b>	Curva de calibración que relaciona la absorbancia (600nm) con la la biomasa	<b>76</b>

# Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b>	Propiedades físicas de gasolina, butanol y etanol	<b>18</b>
<b>Tabla 2:</b>	Combinaciones estudiadas en la sustitución de nutrientes por CSL	<b>29</b>
<b>Tabla 3:</b>	Curva de temperatura en función de tiempo utilizada para la determinación de solventes y ácidos en GC	<b>31</b>
<b>Tabla 4:</b>	Parámetros de fermentación de <i>C. beijerinckii</i> DSM 6423 para diferentes concentraciones de butanol y agregado de antiespumante	<b>35</b>
<b>Tabla 5:</b>	Parámetros determinados del ensayo de fermentación, en el cual se varió la concentración inicial de ácido butírico.	<b>41</b>
<b>Tabla 6:</b>	Parámetros determinados del ensayo de fermentación, en el cual se sustituyeron diversos nutrientes por CSL	<b>46</b>
<b>Tabla 7:</b>	Parámetros determinados del ensayo de fermentación, en el cual se varió la concentración inicial de azúcares	<b>53</b>
<b>Tabla 8:</b>	Parámetros determinados del ensayo de fermentación, en el cual se varió la concentración de CSL a t = 48h.	<b>57</b>
<b>Tabla 9:</b>	Composición de jugo concentrado de caña de azúcar y sorgo dulce	<b>75</b>
<b>Tabla 10:</b>	Relación entre absorbancia (600nm) con la concentración de la biomasa (en g/L)	<b>76</b>

# Palabras clave

ABE, Biocombustibles, butanol, *Clostridium beijerinckii*, etanol, fermentación batch, fermentación IBE, IBE, isopropanol,.

ABE, batch fermentation, biofuel, butanol, *Clostridium beijerinckii*, ethanol, IBE, IBE fermentation, isopropanol.

# Resumen

El aumento en los niveles de dióxido de carbono atmosférico y la disminución en las fuentes de petróleo disponibles han llevado la atención a la producción de biocombustibles incluyendo biodiesel, bioalcoholes, biogás y biocombustibles sólidos, así como de otros compuestos químicos de fuentes renovables.

El butanol es un bioalcohol atractivo como combustible para el transporte debido a sus propiedades similares a la gasolina de automóviles, como octanaje, contenido energético y densidad energética. Además su baja higroscopicidad y presión de vapor, previenen el incremento en el contenido de humedad en el butanol haciéndolo un biocombustible seguro.

La producción de biocombustibles tiene como principales factores de costo, la materia prima y la demanda de energía. Por tanto, es necesario contar con materias primas con alto contenido de carbohidratos y procesos de transformación eficientes. La caña de azúcar y el sorgo dulce tienen gran potencial como materias primas para la producción de biocombustibles debido a su alto contenido de azúcares.

La producción de butanol con *Clostridium spp.* se basa en las fermentaciones bifásicas ABE (acetona-butanol-etanol) o IBE (isopropanol-butanol-etanol). En la primera etapa de éstas, se producen mayoritariamente los ácidos acético y butírico, junto con CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (acidogénesis) y el pH disminuye drásticamente. En una segunda etapa los ácidos se convierten en butanol, acetona o isopropanol y etanol (solventogénesis). Sin embargo, la coproducción de acetona en la fermentación ABE es considerada indeseable, debido a su corrosividad a las partes de goma de los motores y a su pobre capacidad como combustible. Algunas cepas de *Clostridium beijerinckii* producen isopropanol en lugar de acetona en la etapa solventogénica, junto al butanol y etanol, de manera que el producto de fermentación puede ser utilizado directamente como un biocombustible, considerado un “solvente verde”. En el presente trabajo se realizaron ensayos de fermentación a partir de una mezcla industrial de 75% de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y 25% sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) utilizando *C. beijerinckii* DSM 6423 para la obtención de IBE. Se evaluó la toxicidad de la cepa ante el butanol. Se observó que cuando la concentración fue de 7,5 g/L hubo inhibición por producto. A pesar de que esta no fue total, resultó en menor concentración de butanol y de solventes producidos, conversión de azúcares y crecimiento de la biomasa.

También se evaluó el agregado de ácido butírico al medio de cultivo sobre la producción de butanol e IBE. Se observó que las condiciones ensayadas (0,5 - 6,5 g/L) no mejoraron el rendimiento de la fermentación ni la producción de solventes.

Se estudió el agregado de licor macerado de maíz como nutriente al medio de fermentación en sustitución de vitaminas y extracto de levadura, con el objetivo de reducir el costo del medio de cultivo. Se evaluó la concentración mínima para poder utilizarlo como sustituyente y se obtuvo que una concentración de CSL de 5 g/L fue suficiente para obtener los rendimientos, productividades y concentraciones finales de butanol y solventes comparables a las del medio definido con vitaminas y extracto de levadura.

Por último, se evaluó el efecto de la concentración de sustrato (39 - 113 g/L) sobre la cinética de fermentación. Se observó que a mayor concentración de sustrato, la cinética de fermentación fue más lenta. La mejor cinética de fermentación se obtuvo cuando la concentración de azúcares iniciales fue de 39 g/L, donde a las 48 horas se alcanzaron concentraciones finales de 6,9 y 11,2 g/L de butanol y solventes respectivamente.

# INTRODUCCIÓN

Mauricio Fabián  
Ávila Araujo



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
INGENIERIA

10

Producción de Isopropanol-Butanol-Etanol como combustible utilizando  
*Clostridium beijerinckii* DSM 6423 a partir de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce

Mauricio Fabián Ávila Araujo

# 1.1 - Energías renovables y alternativas

## **1.1.1 Introducción:**

Se denomina energía renovable a la energía que se sustituye luego de su uso dentro de un período de tiempo de escala (dimensión) humana. Entre las energías renovables se cuentan la eólica, geotérmica, hidroeléctrica, mareomotriz, solar, undimotriz, la biomasa y los biocombustibles (Casas et al., 2007).

El consumo de energía es uno de los grandes medidores del progreso y bienestar de una sociedad. El concepto de crisis energética aparece cuando las fuentes de energía de las que se abastece la sociedad se agotan o se encarecen drásticamente. Un modelo económico como el actual, cuyo funcionamiento depende de un continuo crecimiento, exige también una demanda igualmente creciente de energía. Puesto que las fuentes de energía fósil y nuclear son finitas, es inevitable que en un determinado momento la demanda no pueda ser abastecida y todo el sistema colapse, salvo que se descubran y desarrollen otros nuevos métodos para obtener energía (<https://www.petrolnews.net/noticia.php?ID=qjcpbonl&r=13257> acceso: 2018/09/19).

## **1.1.2 Concepción histórica:**

Las energías renovables han constituido una parte importante de la energía utilizada por los humanos desde tiempos remotos, especialmente la solar, la eólica y la hidráulica. La navegación a vela, los molinos de viento o de agua y las disposiciones constructivas de los edificios para aprovechar la del sol, son buenos ejemplos de ello.

Con el invento de la máquina de vapor por James Watt, se van abandonando estas formas de aprovechamiento y se utilizan cada vez más los motores térmicos y eléctricos, en una época en que el todavía relativamente escaso consumo, no hacía prever un agotamiento de las fuentes, ni otros problemas ambientales que más tarde se presentaron.

Hacia la década de años 1970 las energías renovables se consideraron una alternativa a las energías tradicionales, tanto por su disponibilidad presente y futura garantizada como por su menor impacto ambiental en el caso de las energías limpias. Nace entonces el concepto de *energía alternativa*, cuando empieza a tenerse en cuenta la posibilidad de que las energías tradicionalmente usadas, energías de procedencia fósil, se agotaran en un plazo más o menos corto (idea especialmente extendida a partir de la publicación, en 1972, del informe al Club de Roma: *Los límites al crecimiento*) y era necesario encontrar alternativas más duraderas (Casas et al., 2007).

El Club de Roma encargó el conocido informe *Los límites al crecimiento* al Massachusetts Institute of Technology, el cual fue publicado en 1972, poco antes de la primera crisis del petróleo y que ha tenido varias actualizaciones. La conclusión del informe de 1972 fue la siguiente: “*si el actual incremento de la población mundial, la industrialización, la contaminación, la producción de alimentos y la explotación de los recursos naturales se mantiene sin variación, alcanzará los límites absolutos de crecimiento en la Tierra durante los próximos cien años*” (Meadows et al., 1972).

### **1.1.3 Amenazas para el medio ambiente y el ser humano del petróleo y sus derivados**

#### *Contaminación:*

El petróleo tiene el problema de ser insoluble en agua y, por lo tanto, difícil de limpiar en caso de derrames. Los derrames de hidrocarburos afectan profundamente a la fauna y vida del lugar, razón por la cual la industria petrolera mundial debe cumplir normas y procedimientos estrictos en materia de protección ambiental. Los derrames de petróleo representan una de las mayores causas de la contaminación oceánica. Ocasionan gran mortandad de aves acuáticas, peces y otros seres vivos de los océanos, alterando el equilibrio del ecosistema. En las zonas afectadas, se vuelven imposibles la pesca, la navegación y el aprovechamiento de las playas con fines recreativos.

Además, la combustión de sus derivados produce productos residuales: partículas, CO<sub>2</sub>, SO<sub>x</sub> (óxidos de azufre), NO<sub>x</sub> (óxidos nitrosos), etc.

#### *Cambio climático:*

La combustión de los derivados del petróleo es una de las principales causas de emisión de CO<sub>2</sub>, cuya acumulación en la atmósfera favorece el cambio climático.

#### *Conflictos geopolíticos:*

El control del petróleo se ha vinculado a diversos conflictos bélicos, desde la Segunda Guerra Mundial hasta los más recientes en Irak (guerra del Golfo de 1991 y guerra de Irak de 2003).

### **1.1.4 Reservas y previsión de fuentes**

Las reservas mundiales probadas de petróleo en 2017 disminuyeron ligeramente en 0.5 mil millones de barriles (-0.03%) a 1696.6 mil millones de barriles, lo que sería suficiente para cumplir con 50.2 años de producción mundial en los niveles de 2017. El aumento de las reservas en Venezuela (hasta 1.4 mil millones de barriles) fue superado por disminuciones en Canadá (-1.6 mil millones de barriles) y otras más pequeñas en países no pertenecientes a la OPEP. Los países de la OPEP actualmente poseen el 71.8% de las reservas probadas globales. (<https://www.bp.com/en/global/corporate/energy-economics/statistical-review-of-world-energy/oil-reserves.html> acceso: 2018/10/18)

Debido a la proximidad inminente del agotamiento de fuentes de energía no renovables, así como las amenazas al ser humano y al medio ambiente, nos compromete a la labor científica en lo que respecta a las fuentes renovables de energía, y en particular en este caso, el biocombustible, como ser: el biobutanol.

# 1.2 - Biocombustibles

## 1.2.1 Definición:

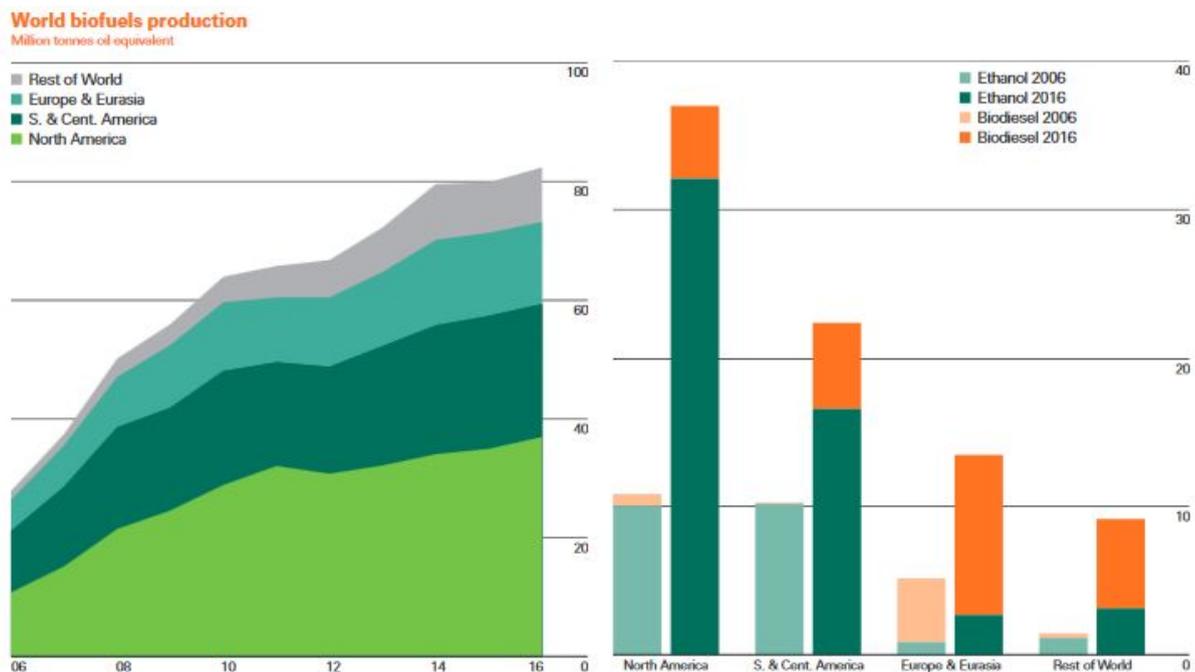
Los biocombustibles se obtienen a partir de biomasa; la materia orgánica originada en un proceso biológico, utilizable como fuente de energía.

Estos materiales reducen considerablemente el dióxido de carbono que es enviado a la atmósfera terrestre ya que lo van absorbiendo a medida que se van desarrollando.

Los biocarburantes más usados y desarrollados son el bioetanol y el biodiesel. El bioetanol, se produce por fermentación alcohólica de azúcares de diversas plantas como la caña de azúcar, maíz, remolacha, melaza o sorgo dulce. El biodiesel, se fabrica a partir de aceites vegetales. En este último caso se suele usar colza, canola, soja o jatrofa, los cuales son cultivados para este propósito.

La producción mundial de bioetanol y biodiésel en 2016 alcanzó 80,024 millones de litros (<https://www.bp.com/content/dam/bp/en/corporate/pdf/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2018-full-report.pdf> acceso: 2018/09/19).

La distribución por continentes es la siguiente:



**Figura 1:** Izquierda: producción de biocombustibles por continente en millones de toneladas.

Derecha: diferencia en la producción de etanol y biodiesel entre 2006 y 2016 dividida por continente.

(<https://www.bp.com/content/dam/bp/en/corporate/pdf/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2018-full-report.pdf> acceso: 2018/09/19)

Otras alternativas, como el **biobutanol**, son menos populares. Sin embargo este ha ganado una gran atención debido a sus beneficios ambientales y superiores propiedades comparado con el etanol (Xue et al., 2017).

### **1.2.2 Antecedentes y perspectivas**

Rudolf Diesel creó hace más de 100 años un prototipo de motor que utilizaba aceite de maní el cual derivó en el gasoil. Debido a que obtener petróleo era más fácil y económico, se comenzó a utilizar este combustible fósil.

En sus principios (1908) el modelo T de Ford usaba etanol. En el período comprendido entre 1920 y 1924 la compañía *Standard oil*, vendía gasolina con un 25% de etanol. Sin embargo, los altos costos del maíz volvieron inviable económicamente este producto.

En la década del 30, Henry Ford y otros construyeron una planta en Kansas que elaboraba alrededor de 38.000 litros diarios de etanol en base al uso del maíz como materia prima, tratando de reflowar la fabricación de biocombustibles. En esta época más de 2000 estaciones de servicio vendían este producto. Luego, en la década de los años 40, tuvieron que cerrarla, ya que no competía con los precios del petróleo.

A partir de la década del 70, EEUU comienza nuevamente a mezclar gasolina y etanol dando un importante auge a los biocombustibles en consecuencia de la crisis del petróleo. Esta tendencia no ha parado de crecer desde estos años hasta la actualidad tanto en EEUU como en Europa.

A mediados de los 80, diversos sectores advirtieron el peligro de utilizar alimentos para fabricar biocombustibles, ya que el trabajo y la experimentación en biocombustibles de primera generación son basados en cultivos alimenticios. A raíz de estas preocupaciones comienzan a surgir los biocombustibles de segunda y tercera generación, que se basan en materias primas alternativas que no afecten la seguridad alimentaria como la biomasa lignocelulósica (en el caso de los biocombustibles de segunda generación), algas y otras vegetales no comestibles (tercera generación) (<https://www.renovablesverdes.com/origenes-e-historia-de-los-biocombustibles/> acceso: 2018/09/19).

En los últimos años, e impulsados principalmente por políticas de ayuda a la producción y consumo de biocombustibles, los biocombustibles líquidos basados en productos básicos agrícolas para el transporte han registrado un crecimiento rápido. Varios países en desarrollo también están aplicando políticas que fomentan los biocombustibles. La expansión de los biocombustibles se prevé que prosiga, aunque la contribución de los biocombustibles líquidos para el transporte es limitada. No obstante, los biocombustibles tienen una importante repercusión en los mercados agrícolas mundiales, el medio ambiente y la seguridad alimentaria.

La seguridad energética, la mitigación del cambio climático mediante la reducción de los gases de efecto invernadero y la colaboración con la agricultura son los principales factores que han impulsado las políticas de ayuda a los biocombustibles. En la actualidad, sin embargo, la función de la agricultura a la hora de abordar estos problemas, incluyendo las políticas adecuadas que deben ser aplicadas, está siendo sometida a estudios más detallados (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, 2008).

### **1.2.3 Biocombustibles en Uruguay**

Uruguay presenta una alta dependencia energética de los combustibles fósiles importados. El sector transporte depende casi exclusivamente de combustibles derivados del petróleo (Balance Energético Nacional 2017, Dirección Nacional de Energía, Ministerio de Industria Energía y Minería, disponible online <http://www.ben.miem.gub.uy/index.html>, acceso: 2018/10/24). En el 2007 se aprobó la Ley de Agrocombustibles (Ley Nº 18.195) que tiene por objeto el fomento y la regulación de la producción, comercialización y utilización de biocombustibles, establece horizontes de

sustitución de combustibles fósiles por combustibles nacionales y requisitos medioambientales para la producción.

En la actualidad los emprendimientos más importantes desde el punto de vista de las inversiones realizadas y capacidad de producción se desarrollan en la órbita pública-privada. Estos son, los complejos agroindustriales de Alcoholes del Uruguay (ALUR), ubicados en Montevideo, Paysandú y Artigas. En estos, trabajan más de 4.000 personas en forma directa e indirecta con una capacidad de producción de 100 millones de litros al año, utilizando sorgo BT y caña de azúcar como materias primas principales. A su vez, existen desde hace algunos años un conjunto de emprendimientos privados para la producción de biodiesel y más recientemente para la generación de energía eléctrica con biomasa, así como emprendimientos públicos y público-privados en desarrollo y proyectados (<http://www.alur.com.uy/empresa/que-es-ALUR.php> acceso: 2019/09/19).

El desarrollo productivo de los biocombustibles en el país, relativamente reciente, tiene presente tanto la producción directa en sus distintas etapas, así como la integración territorial con recuperación de áreas excluidas del relativo desarrollo nacional. Asimismo, comprende la introducción de nuevos cultivos y mejoramiento de los ya existentes, aumento del área sembrada y futuras investigaciones en materia de biotecnología (Bittencourt y Reig, 2009).

ALUR, como empresa agroindustrial sustentable, genera un alto impacto económico y social a través de la producción de biodiesel, bioetanol, productos químicos, alimento animal, energía y azúcar.

En 2006, ALUR toma la actividad del ingenio azucarero de CALNÚ en Bella Unión, que entonces era una empresa que procesaba caña de azúcar para producir únicamente azúcar para consumo humano. Desde entonces comenzó a multiplicar su producción y puso en marcha nuevas cadenas agroindustriales, recuperando en materia económica y social a una región deprimida como Bella Unión, en el extremo norte del país, en frontera con Brasil y muy cercano a la frontera con Argentina. Cuando se comenzó a diseñar el programa de biocombustibles por parte de ANCAP, existían unas 3 mil hectáreas plantadas de caña de azúcar, propiedad de un grupo de productores en muy malas condiciones de producción y económicas. La adquisición por parte de ANCAP del ingenio azucarero permitió darle continuidad a la producción e implementar un plan para producir etanol a partir de la caña de azúcar. La extensión del área agrícola es de aproximadamente 10.000 hectáreas de caña (las cuales pueden llegar a complementarse con 4 mil hectáreas de sorgo dulce) (Bittencourt y Reig, 2009).

Estas industrias utilizan materia prima de origen nacional, lo que ha permitido la plantación de cultivos en varios departamentos. ALUR realiza una fuerte apuesta por generar una cadena inclusiva que integre como abastecedores de materias primas tanto a grandes empresas como a medianos y pequeños productores.

Actualmente ALUR procesa más de ocho materias primas, desde cultivos como cereales u oleaginosos, biomasa forestal, hasta aceite reciclado y grasa animal, obteniendo al menos doce productos distintos como biodiesel, bioetanol, harinas proteicas (alimento animal), energía eléctrica, glicerina y azúcar (<http://www.alur.com.uy/empresa/que-es-ALUR.php> acceso: 2019/09/19). (<http://www.alur.com.uy/productos/biocombustibles.php> acceso: 2018/09/19).

Para la producción de biodiesel, las materias primas utilizadas mayoritariamente son los aceites vegetales y el sebo vacuno, la capacidad instalada de producción es baja (se estima que se estaría ubicando en 10 toneladas diarias promedio aproximadamente), y la mayoría de las inversiones realizadas son de poca magnitud y de origen nacional. Asimismo, la mayoría estos emprendimientos se desarrollan en un entorno geográfico-social particular del país que condiciona el funcionamiento de cada uno de ellos por separado. En general, los mismos son

poco demandantes de empleo directo y utilizan una tecnología de producción por lote (con excepción del Polo Tecnológico de Pando) (Bittencourt y Reig, 2009).

Su viabilidad económica se encuentra fuertemente ligada a la evolución del precio de las materias primas, por lo cual si el precio de los insumos como oleaginosas y sebo mantiene su tendencia alcista a nivel internacional, varios de los emprendimientos no podrían mantener la producción de forma continua y permanente. Además interesa señalar que la mayor utilización de las materias primas para este destino afecta los precios de otros recursos naturales, en particular el precio de la tierra, en la medida que la mayor demanda por tierra disponible para cultivos destinados a la producción de biodiesel presiona al alza su precio y puede generar en el futuro desplazamientos de otros sectores productivos (Bittencourt y Reig, 2009).

ALUR tiene una capacidad de producción anual de 83 millones de litros en sus dos complejos agroindustriales ubicados en Capurro y Paso de la Arena. Las materias primas utilizadas pueden tener origen vegetal, utilizando soja y canola; animal, utilizando sebo vacuno; o reciclado, mediante el uso de aceite usado de fritura. Esto origina diferentes clases de biodiesel, que son valorizados de manera heterogénea a nivel internacional.

El biodiesel es suministrado a ANCAP para la mezcla en gasoil y se ha desarrollado la venta de biodiesel a flotas cautivas como es el caso de CUTCSA. (<http://www.alur.com.uy/productos/biocombustibles.php> acceso: 2019/09/19).

# 1.3 - Biobutanol

## 1.3.1 Definición

El butanol es un alcohol lineal de cuatro carbonos, uno de los alcoholes de cadena más larga (junto con el 2,3-butanodiol) que se encuentra como el principal producto final natural de la fermentación microbiana. Es un compuesto ampliamente utilizado en la industria como solvente para productos químicos y farmacéuticos, como intermediario en síntesis química (en particular para acetato de butilo) y como biocombustible líquido destinado al transporte (López-Contreras et al., 2012).

Básicamente hay dos grandes líneas de producción de butanol: a partir de biomasa, conocido como biobutanol, y de combustibles fósiles, conocido como petrobutanol. La mayor parte del butanol producido hoy en día es a través de síntesis química. El butanol se obtiene mediante la hidroformilación de propileno, conocido como proceso Oxo. Representa la ruta química más común e implica la reacción de propileno con monóxido de carbono e hidrógeno en presencia de un catalizador apropiado, que luego se hidrogena a los alcoholes n- e iso-butílicos correspondientes y se destila para recuperar butanol en la calidad requerida (García et al., 2011).

El biobutanol se produce de forma anaeróbica mediante la fermentación de azúcares por varias especies de Clostridios, concomitantemente con acetona y etanol. Por tanto, este proceso se conoce generalmente como fermentación ABE (acetona-butanol-etanol). Alternativamente, algunas cepas que realizan la fermentación ABE reducen la acetona directamente a isopropanol, dando como resultado el proceso de fermentación IBE (Jones y Woods, 1986).

## 1.3.2 Historia

La historia del proceso de fermentación industrial de acetona, butanol y etanol (ABE) se remonta a antes de la Primera Guerra Mundial. Debido a la escasez de caucho natural, la firma inglesa *Strange and Graham* investigó la posibilidad de fabricar caucho sintético. Se decidió que la mejor ruta para la producción de butadieno o isopreno, los precursores del caucho sintético, era a partir de butanol o alcohol isoamílico. Por lo tanto, el profesor Perkins y su asistente Jaim Weizmann (quien más tarde se convertiría en el primer Presidente de Israel) fueron reclutados para investigar los procesos de la producción química involucrados. Aunque entrenado como químico, Weizmann concluyó que la clave para el éxito de un proceso de fabricación de caucho sintético era la producción de butanol o alcohol isoamílico por fermentación. Por lo tanto, cambió de campo y se entrenó para convertirse en microbiólogo. Entre 1912 y 1914 detectó varias cepas bacterianas y logró aislar una cepa, inicialmente denominada BY, que posteriormente se llamó *Clostridium acetobutylicum*. Esta bacteria produjo los rendimientos más altos de acetona y butanol a partir de una variedad de sustratos amiláceos (Woods, 1995).

El posterior desarrollo del proceso de fermentación ABE se vio alterado dramáticamente por el estallido de la Primera Guerra Mundial en agosto de 1914. Se requirió *cordita* (pólvora blanca) en grandes cantidades para la fabricación de municiones; se usó acetona como disolvente coloidal para nitrocelulosa, que se usó para fabricar *cordita*. Winston Churchill, como Primer Lord del Almirantazgo, le encargó a Weizmann el desarrollo de la fermentación industrial ABE. Al final de la Primera Guerra Mundial, la fermentación ABE, que se había establecido en Canadá y EEUU, se continuó como un emprendimiento comercial. La industria automotriz estadounidense, que se expandía rápidamente, requería una laca de secado rápido que diera un buen acabado a las

carrocerías. El butanol y el acetato de butilo demostraron ser los disolventes ideales para estas lacas (Woods, 1995).

La Segunda Guerra Mundial dio lugar a una mayor demanda de acetona y, como el maíz se estaba volviendo demasiado caro, el sustrato para la fermentación ABE se cambió a melaza, que fue sobreproducida y relativamente barata en la década de 1930. Después de la Segunda Guerra Mundial, la fermentación ABE disminuyó con el advenimiento de la producción de solventes a partir del petróleo mediante procesos sintéticos. Al mismo tiempo, el costo de la melaza escaló y, en 1960, la producción de solventes por fermentación prácticamente había cesado en los EEUU y el Reino Unido (Woods, 1995).

### **1.3.3 Ventajas frente al bioetanol**

En comparación con el bioetanol, el biobutanol es indudablemente superior como combustible o aditivo debido a la mayor similitud en sus propiedades y su mayor compatibilidad respecto a la gasolina (Xue et al., 2017).

El butanol posee mayor poder calorífico, punto de fusión, punto de ebullición, punto de ignición, menor inflamabilidad, volatilidad, presión de vapor, corrosividad y calor de vaporización que el etanol. A su vez, el butanol se puede mezclar a una mayor concentración con la gasolina (85% butanol/gasolina) y se puede utilizar en motores de gasolina sin modificar. Contiene un 22% de oxígeno, por lo que quema más limpio que el etanol. El butanol, tiene una mayor densidad energética, reduce la viscosidad de los aceites vegetales y tiene la capacidad de disolverse en aceites vegetales en cualquier proporción. Además, es convertible en combustible para aviones, se mezcla con gasolina y también actúa como un rico extensor de combustible. Como aditivo, cuando el butanol se mezcla con gasolina y se utiliza en la combustión interna, solo produce dióxido de carbono, lo que lo convierte en un biocombustible amigable con el medio ambiente. En la **Tabla 1** se presentan las propiedades físicas del butanol, etanol y gasolina (Bharathiraja et al., 2017).

**Tabla 1:** Propiedades físicas de gasolina, butanol y etanol (Bharathiraja et al., 2017).

<b>Propiedades</b>	<b>Gasolina</b>	<b>Butanol</b>	<b>Etanol</b>
Punto de fusión (°C)	-57.1 a -56.6	-89.3	-114
Temperatura de ignición (°C)	422.7	35 a 37	276 a 456
Temperatura de autoignición (°C)	246–280	343 a 345	422
Punto de inflamación (°C)	13	25 a 29	12.77
Punto de ebullición (°C)	27 a 221	117 a 118	78
Densidad a 20 °C (g/mL)	0.7 a 0.8	0.8098	0.7851
Solubilidad en 100 g de agua	inmiscible	inmiscible	miscible
Densidad de energía (MJ/L)	32	27 a 29.2	19.6
Calor de vaporización (MJ/kg)	0.36	0.43	0.92
Capacidad de calor líquido (Cp) a PTN (kJ/kmol K)	160 a 300	178	112.3
Número de octanaje de investigación (RON)	91 a 99	96	129
Número de octanaje del motor (MON)	81 a 89	78	102
Viscosidad (x10 <sup>-3</sup> Pa.s)	0.24 a 0.32	2,593	1,078

### 1.3.4 Potencial y alcance

Según las estimaciones de *Nexant y Chemical Strategies*, el mercado global de butanol fue de US\$ 5.900 millones en 2011 y se espera que alcance los US\$ 9.900 millones en 2020. Asia representa aproximadamente el 47% del mercado mundial de butanol, y China es el principal consumidor (34%). La Unión Europea y América del Norte presentan aproximadamente el 25% y el 24% del mercado, respectivamente (Wang et al., 2017).

El butanol se utiliza como fuente de energía alternativa en los EEUU, Europa occidental y Japón, representando el 33%, el 19% y el 8% de su suplemento energético total. En la actualidad, se permiten mezclas de biobutanol hasta en un 16% en los EEUU y un 15% en Europa (Wang et al., 2017).

## 1.4 - Producción de biobutanol

El butanol se puede producir por una variedad de clostridios por las fermentaciones denominadas ABE (acetona-butanol-etanol) e IBE (isopropanol-butanol-etanol). Además, los clostridios pueden producir productos quirales que son difíciles de fabricar por síntesis química (Rogers, 1986) y degradan una serie de sustancias químicas tóxicas (Francis et al., 1994; Spain, 1995).

Los clostridios solventogénicos pueden utilizar una gran variedad de sustratos desde monosacáridos (incluyendo muchas pentosas y hexosas) a polisacáridos (Jones y Woods, 1986). La materia prima utilizada en la producción de biobutanol es uno de los principales factores de costo en su producción. Se necesitan materias primas con alto contenido de carbohidratos y una fuente de energía accesible y de bajo costo (Rochón et al., 2017). Las cepas productoras de butanol utilizan de manera eficiente varios azúcares como glucosa, sacarosa, fructosa, xilosa y arabinosa. Permiten así, el uso de fuentes de carbono derivadas de materias primas de bajo costo, como residuos agrícolas y desechos industriales (Wang et al., 2014). Tanto la caña de azúcar como el sorgo dulce pueden ofrecer más ventajas que otros cultivos, ya que contienen grandes cantidades de azúcares fermentables y producen un residuo (bagazo) que puede quemarse para la producción de vapor para satisfacer la demanda energética de los procesos industriales. El sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) posee grandes cantidades de azúcares fermentables fácilmente solubles, muestra altos rendimientos, tolerancia a la sequía y tienen la capacidad de crecer en una amplia gama de condiciones ambientales (Lauradie et al., 2016). Actualmente, en el norte de Uruguay, se produce bioetanol combustible, principalmente a partir de la caña de azúcar. El jugo de sorgo dulce, sólo o mezclado con jugo de caña de azúcar, se usa para extender el tiempo de trabajo en la planta industrial. Dado que tanto el biobutanol como el bioetanol podrían producirse a partir de la misma materia prima, su producción podría realizarse en la misma planta industrial utilizando equipos similares (Rochón et al., 2017).

Generalmente, son necesarias fuentes de nitrógeno complejas como extracto de levadura para un buen crecimiento y producción de solventes. Sin embargo, los requerimientos de nutrientes para el crecimiento de clostridios son bastante simples (Monot et al., 1982). Como se muestra en la **Figura 2**, los clostridios requieren un alto potencial redox para producir butanol (y etanol) y el suministro de poder reductor adicional da como resultado una mayor formación de butanol y etanol con una reducción en la formación de acetona (Mitchell, 1998). Entre los clostridios solventogénicos, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* y *C. saccharoperbutylacetonicum* son los principales productores de solventes (Dürre, 1996). Debe mencionarse que *C. beijerinckii* NCIMB

8052, *C. saccharobutylicum* y *C. saccharoperbutylacetonicum* se designaron originalmente como *C. acetobutylicum* (Dürre, 1996).

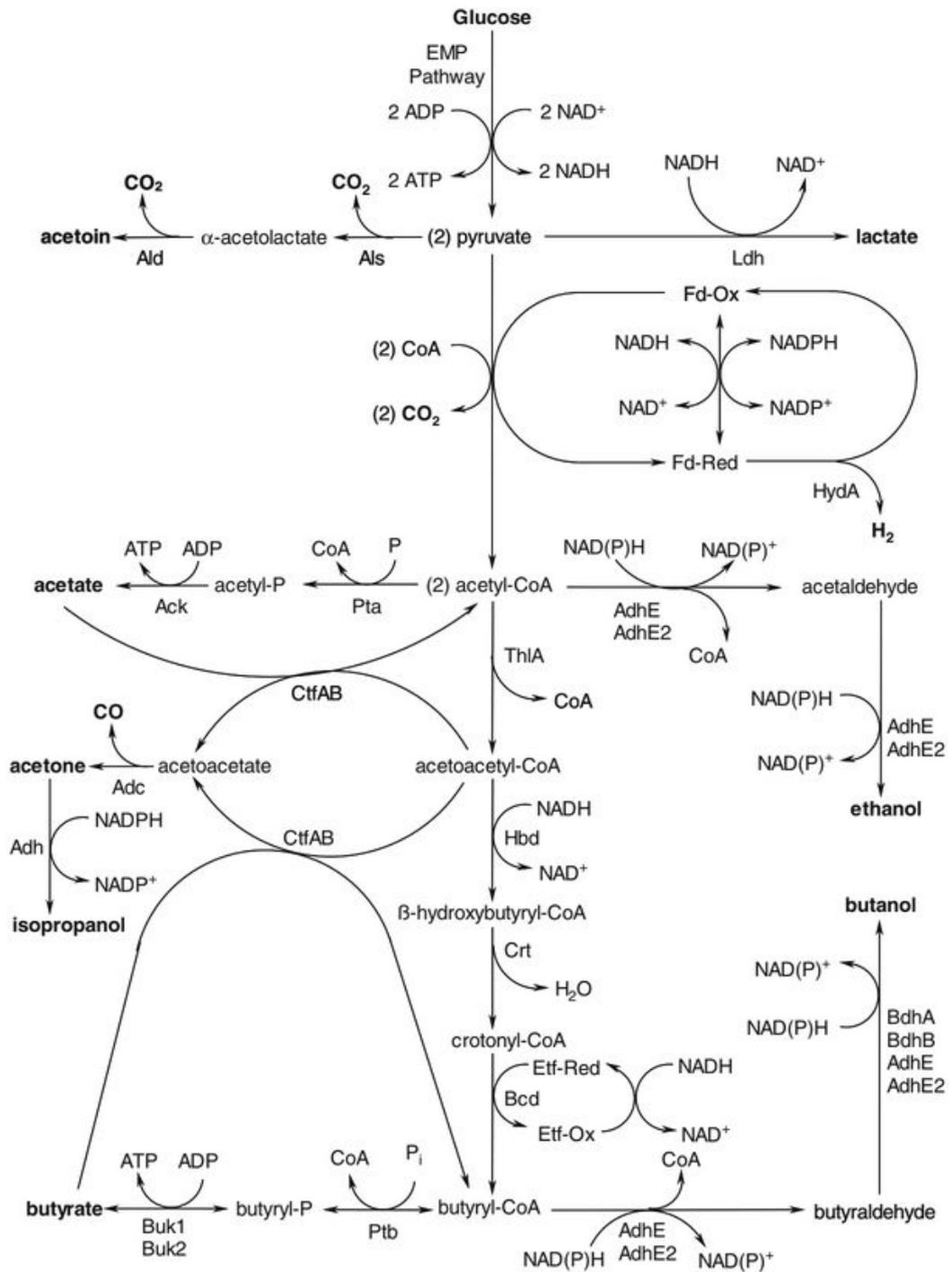
Una característica típica de la producción de solventes por clostridios es la fermentación bifásica. La primera fase es la acidogénica, durante la cual se activan las vías de formación de ácidos y se producen ácido acético, ácido butírico, hidrógeno y dióxido de carbono como productos principales. Esta fase acidogénica generalmente ocurre durante la fase de crecimiento exponencial (Andersch et al., 1983, Hartmanis, 1984). La segunda fase es la solventogénica durante la cual los ácidos se reasimilan y se utilizan en la producción de acetona, butanol y etanol (o isopropanol en lugar de acetona en algunas cepas de *C. beijerinckii*) (ver **Figura 2**).

La transición de la fase acidogénica a la fase solventogénica es el resultado de un cambio drástico en el patrón de expresión génica (Dürre et al., 1987). La solventogénesis está estrechamente relacionada con la esporulación (Paredes et al., 2005). El factor de transcripción responsable del inicio de la esporulación (Spo0A) también inicia la producción de solvente en *C. acetobutylicum* (Bahl et al., 1995) al activar la transcripción de los genes de acetoacetato decarboxilasa (*adc*), alcohol deshidrogenasa (*adhE*) y CoA transferasa (*ctfAB*) (Sullivan, 2006). Los mutantes con delección en el gen Spo0A son muy deficientes en la producción de solventes y no esporulan, mientras que las cepas con el gen Spo0A amplificado, sobreexpresan genes solventogénicos pero no producen más solvente debido a un proceso de esporulación acelerado (Harris et al., 2002).

Spo0A es un regulador multifuncional que también participa en la formación de solventes y esporulación en *C. beijerinckii*, aunque el control de la formación de solventes implica diferentes mecanismos que en *C. acetobutylicum* (Harris et al., 2002; Thormann et al., 2002). Se propuso que el gen *abrB<sub>310</sub>* podría actuar como un regulador en la transición entre las fases acidogénica y solventogénica (Scotcher et al., 2005). El efecto de Spo0A en la formación de solvente es un equilibrio de la regulación de la esporulación frente a la expresión génica de enzimas relacionadas a la solventogénesis (Harris et al., 2002).

El uso de exceso de carbono bajo limitación de nitrógeno es necesario para lograr altos niveles de producción de solvente (Madihah et al., 2001). El hierro es un suplemento mineral importante ya que la conversión de piruvato en acetyl-CoA implica una proteína ferredoxin oxidoreductasa hierro-azufre (Kim et al., 1988).

El requerimiento nutricional basal para *Clostridium aceticum* es el siguiente:  $K_2HPO_4$ ,  $(NH_4)SO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaSO_4$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , tioglicolato de sodio,  $Na_2CO_3$ . Si al requerimiento basal se añade extracto de malta y extracto de levadura, se obtiene un crecimiento apreciable. El extracto de malta puede ser reemplazado por glucosa sin mucha reducción en el crecimiento, y el extracto de levadura puede ser sustituido satisfactoriamente por hidrolizado de caseína más una mezcla de diez factores de crecimiento del complejo B. Los factores de crecimiento necesarios se han identificado como: biotina, piridoxamina y ácido pantoténico (Karlsson, et al., 1948).



**Figura 2:** Vías metabólicas en *C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii* (López-Contreras et al., 2010).

Los clostridios pueden perder la capacidad de producir solventes durante el cultivo. Este fenómeno de degeneración se debe a la pérdida del megaplásmido pSOL1 en *C. acetobutylicum*, que podría prevenirse bajo condiciones limitadas de fosfato (Wilkinson y Young, 1995). *C. beijerinckii* NCIMB 8052 no posee tal plásmido, pero la degeneración igualmente se produce, y puede prevenirse mediante la adición de acetato de sodio (Chen y Blaschek, 1999).

El pH del medio es muy importante para la fermentación bifásica de acetona y butanol. En la acidogénesis (durante la cual el crecimiento celular es exponencial) se produce la formación rápida

de ácidos acético y butírico (concomitantemente a la formación de ATP), lo que provoca una disminución del pH. Cuando el pH alcanza un punto crítico comienza la solventogénesis, en la cual el crecimiento celular entra en fase estacionaria y los ácidos orgánicos son reasimilados, produciéndose butanol y acetona, lo que da como resultado un aumento del pH del medio (Tashiro et al., 2004). Por lo tanto, el pH bajo es un prerrequisito para la producción de solventes (Kim et al., 1984). Sin embargo, si el pH disminuye por debajo de 4,5 antes de que se formen suficientes ácidos, la solventogénesis será breve e improductiva. La adición de ácidos orgánicos al medio de crecimiento ha demostrado estimular la producción de solventes. Se ha sugerido que los ácidos orgánicos del medio desencadenan un cambio metabólico de acidogénesis a solventogénesis, aunque el mecanismo exacto aún es desconocido (Tashiro et al., 2004). El aumento de la capacidad de amortiguación del medio es una forma simple de aumentar el crecimiento y la utilización de carbohidratos, así como la producción de butanol (Bryant y Blaschek, 1988).

Se necesitan de 2 a 6 días para completar una fermentación batch dependiendo de la cepa, condición y el tipo de sustrato empleado. La concentración total final de disolventes producidos varía de 12 a 20 g/L en la fermentación batch, que puede, en una etapa posterior, separarse del medio de fermentación por destilación. Las fermentaciones fed-batch y continua no parecen ser económicamente factibles, debido a la toxicidad del solvente y la naturaleza bifásica de la fermentación de acetona-butanol, respectivamente. Para superar este problema, el fed-batch se acopla a un proceso de remoción *in situ* del producto para mitigar el efecto tóxico del butanol (Ezeji et al., 2004; Rochón et al., 2017).

La coproducción de acetona del proceso ABE se considera indeseable debido a su corrosividad para las piezas de goma de los motores además de sus pobres propiedades como combustible (Bankar et al., 2012, 2013; Dusséaux et al., 2013; Lee et al., 2012). Algunas cepas naturales de *Clostridium beijerinckii* (George et al., 1983) producen isopropanol, en lugar de acetona, junto con butanol y etanol para producir una mezcla de alcohol y biocombustible que se considera un "solvente verde", el cual es una mezcla que puede ser utilizada directamente como combustible (fermentación IBE). *Clostridium beijerinckii* DSM 6423, un productor natural de IBE, posee una alcohol deshidrogenasa primaria/secundaria (ADH) que cataliza la reducción dependiente de NADPH de acetona a isopropanol (Ismail et al., 1993).

Los estudios genéticos de *C. acetobutylicum* ATCC 824 han tenido éxito para mejorar los rendimientos del solvente ABE (Lehmann y Lütke-Eversloh, 2011; Soucaille et al., 2006; Yu et al., 2011). Por lo tanto, esta variedad industrialmente factible tiene un gran interés en transformarse en un productor eficiente de IBE. El gen que codifica la ADH de *C. beijerinckii* puede introducirse en *C. acetobutylicum* para reducir la acetona a isopropanol. El aumento en la concentración de butanol y solventes, como de los rendimientos en butanol y solventes se deben optimizar durante la economía de proceso de la fermentación IBE.

Lee et al., (2012) utilizando una cepa inactivada en el gen *buk* y con los genes *adc* (acetoacetato descarboxilasa), *ctfAB* (coenzima A transferasa) y *adh*<sup>B-593</sup> (alcohol deshidrogenasa primaria/secundaria) sobreexpresados, obtuvieron como resultado una mejor producción en IBE en *C. beijerinckii* NRRL B-593 (**Figura 3**).

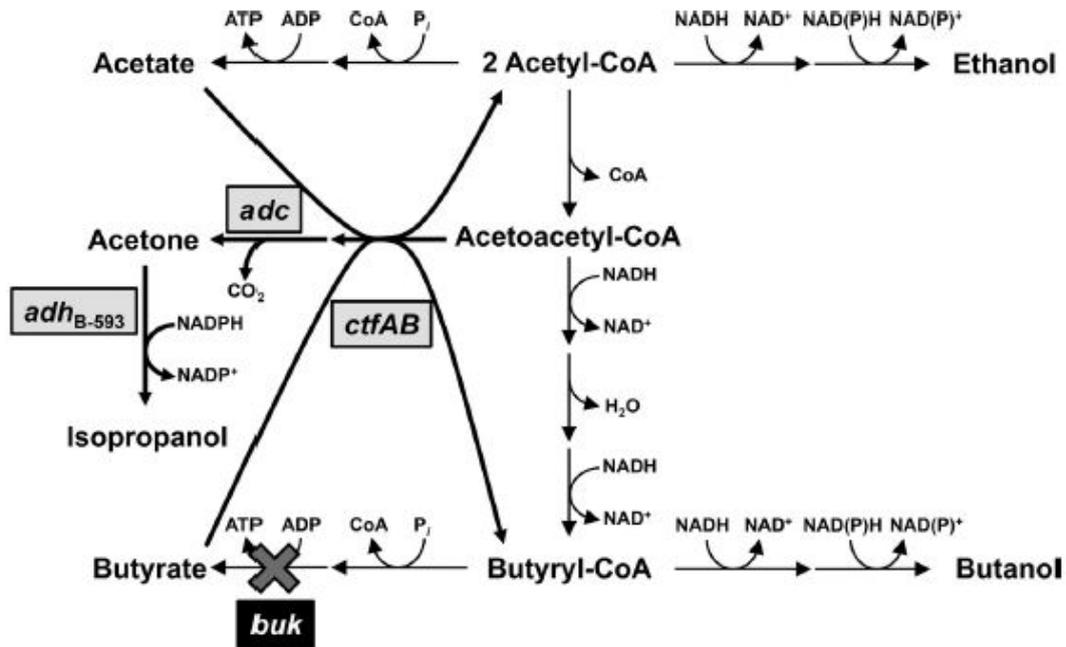


Figura 3: Rutas metabólicas de cepas de *C. acetobutylicum* modificadas genéticamente (Lee et al., 2012).

# OBJETIVOS

Mauricio Fabián  
Ávila Araujo



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

24



FACULTAD DE

INGENIERIA

Producción de Isopropanol-Butanol-Etanol como combustible utilizando  
*Clostridium beijerinckii* DSM 6423 a partir de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce

Mauricio Fabián Ávila Araujo

# 2 - Objetivos

## 2.1 Objetivo general

- Evaluación de la producción de la mezcla de solventes Isopropanol-Butanol-Etanol para su utilización como combustible a partir de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce utilizando *Clostridium beijerinckii* DSM 6423.

## 2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la toxicidad de *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 al butanol.
- Evaluar el efecto del agregado de ácido butírico como precursor de la producción de butanol.
- Evaluar el efecto del agregado de CSL como nutriente sobre la producción de butanol e IBE.
- Evaluar el efecto de la concentración de azúcares iniciales en la cinética de fermentación sobre la producción de butanol e IBE.

# MATERIALES Y MÉTODOS

Mauricio Fabián  
Ávila Araujo



FACULTAD DE  
CIENCIAS



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
INGENIERIA

26

Producción de Isopropanol-Butanol-Etanol como combustible utilizando  
*Clostridium beijerinckii* DSM 6423 a partir de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce

Mauricio Fabián Ávila Araujo

# 3.1 - Materia Prima

La producción de butanol se realizó a partir de una mezcla de jugos industriales compuesta por: 75% de jugo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y 25% de jugo de sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) provisto por Alur SA cuya concentración de azúcares totales fue de 83% (m/m). La misma se almacenó a 5 °C. La composición se detalla en el anexo, **Tabla 9**.

## 3.2 - Ensayos de Fermentación

Se realizaron ensayos de fermentación, en botellas de 250 mL en modalidad batch. En todos los casos se utilizó la cepa *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 y una mezcla de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce cuya concentración inicial de azúcares se logró mediante dilución del concentrado descrito en el punto **3.1**.

### **3.2.1 Desarrollo de inóculo**

Un cultivo stock fue mantenido en medio RCM (*Reinforced Clostridial Medium*) a 4 °C. Se preparó un pre cultivo inoculando 10 mL de cultivo stock a una botella de 250 mL conteniendo 90 mL de medio RCM y se incubó a 35 °C por 24 a 48 h en shaker orbital a 150 rpm hasta observar crecimiento activo (turbidez y septo hinchado debido a la producción de gases durante la fermentación).

Una vez observado el crecimiento, se inoculó en una botella de 250 mL conteniendo 100 mL de medio similar al que se utilizó en el ensayo de fermentación. Se utilizó la mezcla de jugos industriales de caña/sorgo cuya concentración de azúcares iniciales (30-40 g/L) fue la mitad que la del medio de fermentación al cual se le agregó buffer, minerales y vitaminas P2 (1% (v/v)). La composición de dichas soluciones se detalla en el anexo, **Punto 7.1**.

### **3.2.2 Evaluación de la toxicidad del butanol sobre el crecimiento y la producción de solventes de *C. beijerinckii* DSM 6423**

Se realizaron fermentaciones con diferentes concentraciones iniciales de butanol, estas fueron: 0,3; 3,0; 5,3 y 7,5 g/L. El medio, cuya concentración inicial de azúcares fue de aproximadamente 50 g/L se suplementó con extracto de levadura 1 g/L, soluciones stock de buffer y minerales P2 al 1% (v/v) y un complejo polivitamínico B de Dispert® al 1 % (v/v). La composición de las mismas se detalla en el anexo, **Punto 7.1**.

El O<sub>2</sub> del medio fue desplazado mediante gaseo con N<sub>2</sub> durante aproximadamente 3 min, a través de la cabeza de las botellas y luego selladas con septo. Luego, las mismas fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 15 min. Una vez a 37 °C, se agregaron con jeringas estériles las soluciones de buffer, minerales y vitaminas stock P2 (previamente esterilizadas mediante filtración por membrana hidrófila de 0,22 µm). De igual manera, se agrega butanol en cantidad suficiente para obtener las concentraciones iniciales a estudiar y el inóculo (10% (v/v)) a través del septo de las botellas ya selladas, en cámara de flujo laminar.

Las botellas fueron incubadas en shaker orbital con agitación a 150 rpm y temperatura 35°C.

Se tomaron muestras a las 0, 25, 48 y 72 horas para análisis de ácidos, azúcares, biomasa, pH y solventes.

El progreso de la fermentación fue monitoreado por °Brix para estimar el contenido de azúcares y absorbancia a 600 nm para determinar la concentración de biomasa. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

### **3.2.3 Evaluación de la toxicidad del antiespumante sobre el crecimiento y la producción de solventes de *C. beijerinckii* DSM 6423**

Se realizó un ensayo en el mismo medio de cultivo, tiempos de muestreo, procedimiento y condiciones discutidas en 3.2.2 con el agregado de antiespumante al 1% (v/v).

### **3.2.4 Evaluación del agregado de ácido butírico como precursor de butanol**

Se realizaron fermentaciones con diferentes concentraciones iniciales de ácido butírico. El medio, cuya concentración inicial de azúcares fue de aproximadamente 65 g/L se suplementó con extracto de levadura 1 g/L, soluciones stock de buffer y minerales P2 al 1% (v/v) y un complejo polivitamínico B de Dispert® al 1% (v/v). La composición de las mismas se detalla en el anexo, **Punto 7.1**.

Las concentraciones iniciales de ácido butírico estudiadas fueron en el rango de 1,5 a 6,5 g/L. También se realizó un ensayo control sin agregado de ácido butírico, cuya concentración inicial fue de 0,5 g/L, proveniente del inóculo.

Los ensayos con concentraciones iniciales de ácido butírico de 0,5; 4,8 y 6,5 g/L fueron realizados por duplicado, mientras que los de 1,5 y 2,2 g/L no tuvieron réplica.

El pH inicial se verificó, registrándose un valor de  $(6,0 \pm 0,1)$ . El O<sub>2</sub> del medio fue desplazado mediante gaseo con N<sub>2</sub> durante aproximadamente 3 min a través de la cabeza de las botellas y luego selladas con septo. Luego, las mismas fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 15 min. Una vez a 37 °C, se agregaron con jeringas estériles las soluciones de buffer, minerales y vitaminas stock P2 (previamente esterilizadas mediante filtración por membrana hidrófila de 0,22 µm). De igual manera, se agrega ácido butírico en cantidad suficiente para obtener las concentraciones iniciales a estudiar y el inóculo (10% (v/v)) a través del septo de las botellas ya selladas, en cámara de flujo laminar.

Las botellas fueron incubadas en shaker orbital con agitación a 150 rpm y temperatura 35°C.

Se tomaron muestras a las 0, 7, 20, 24, 32, 44, 48, 55, 70 y 134 horas para análisis de ácidos, azúcares, biomasa, pH y solventes.

El progreso de la fermentación fue monitoreado por °Brix para estimar el contenido de azúcares y absorbancia a 600 nm para determinar la concentración de biomasa.

### **3.2.5 Evaluación del efecto del agregado de CSL como nutriente al medio de fermentación**

Se estudió la sustitución de nutrientes por licor macerado de maíz (CSL) a una concentración de 20 g/L, adquirido de *Sigma-Aldrich*®. La preparación del mismo para su utilización como nutriente en el medio de fermentación se realizó según lo reportado por Maddipatti et al. (2011), que consiste en centrifugar a 13.000 g por 10 min para separar sólidos, conservando la fase líquida. Luego con la densidad reportada por Humbird et al. (2011) se calculó el volumen de fracción líquida a utilizar para que la concentración final fuera de 20 g/L.

El medio, cuya concentración inicial de azúcares fue de aproximadamente 65 g/L se suplementó con extracto de levadura 1 g/L, soluciones stock de buffer y minerales P2 al 1% (v/v) y un complejo polivitamínico B de Dispert® al 1 % (v/v). La composición de las mismas se detalla en el anexo, **Punto 7.1**.

El pH inicial se verificó, registrándose un valor de (6,1 ± 0,1). El O<sub>2</sub> del medio fue desplazado mediante gaseo con N<sub>2</sub> durante aproximadamente 3 min a través de la cabeza de las botellas y luego selladas con septo. Luego, las mismas fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 15 min. Una vez a 37 °C, se agregaron con jeringas estériles las soluciones de buffer, minerales, vitaminas stock P2 (previamente esterilizadas mediante filtración por membrana hidrófila de 0,22 µm) y el inóculo (10% (v/v)) a través del septo de las botellas ya selladas, en cámara de flujo laminar.

La sustitución de nutrientes por el licor macerado de maíz se realizó según las 5 combinaciones que se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2:** Condiciones experimentales estudiadas

	Sólo CSL	Control	Sin complejo polivitamínico B ni extracto de levadura	Sin complejo polivitamínico B	Sin extracto de levadura
Buffer y minerales P2	X	V	V	V	V
Complejo polivitamínico	X	V	X	X	V
Extracto de levadura	X	V	X	V	X
Macerado de maíz	V	X	V	V	V

Las botellas fueron incubadas en shaker orbital con agitación a 150 rpm y temperatura 35°C.

Se tomaron muestras a las 1, 8, 22, 32, 48, 57 y 73 horas para el análisis de ácidos, azúcares, biomasa, pH y solventes.

El progreso de la fermentación fue monitoreado por °Brix para estimar el contenido de azúcares y absorbancia a 600 nm para determinar la concentración de biomasa. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

### **3.2.6 Evaluación del efecto de la concentración de azúcares iniciales en la cinética de fermentación**

Se realizaron fermentaciones con diferentes concentraciones iniciales de azúcares, las cuales fueron: 39, 68, 89 y 113 g/L. El medio de fermentación se suplementó con extracto de levadura 1 g/L, soluciones stock de buffer y minerales P2 al 1% (v/v) y un complejo polivitamínico B de Dispert® al 1 % (v/v). La composición de las mismas se detalla en el anexo, **Punto 7.1**.

El pH inicial se verificó, registrándose un valor de (5,8 ± 0,1). El O<sub>2</sub> del medio fue desplazado mediante gaseo con N<sub>2</sub> durante aproximadamente 3 min a través de la cabeza de las botellas y luego selladas con septo. Luego, las mismas fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 15 min. Una vez a 37 °C, se agregaron con jeringas estériles las soluciones de buffer, minerales, vitaminas stock P2 (previamente esterilizadas mediante filtración por membrana hidrófila de 0,22 µm) y el inóculo (10% (v/v)) a través del septo de las botellas ya selladas, en cámara de flujo laminar.

Las botellas fueron incubadas en shaker orbital con agitación a 150 rpm y temperatura 35°C. Se tomaron muestras a las 1, 8, 22, 32, 48, 57 y 73 horas para análisis de ácidos, azúcares, biomasa, pH y solventes.

El progreso de la fermentación fue monitoreado por °Brix para estimar el contenido de azúcares y absorbancia a 600 nm para determinar la concentración de biomasa. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

### **3.2.7 Evaluación de la concentración de CSL del medio de fermentación**

Se realizaron fermentaciones con diferentes concentraciones de CSL, a una concentración inicial de azúcares de aproximadamente 65 g/L. Al igual que en el punto 3.2.4 la preparación del mismo para su utilización como nutriente en el medio de fermentación se realizó según lo reportado por Maddipatti et al. (2011) y luego con la densidad reportada por Humbird et al. (2011) se calculan los volúmenes de fracción líquida a utilizar para que las concentraciones finales fuesen de 0, 5, 10, 15, y 20 g/L. Los datos del ensayo control -0 g/L- y del ensayo con agregado de 20 g/L de CSL fueron los obtenidos en el ensayo 3.2.4. El ensayo control se realizó con agregado buffer, y minerales P2 al 1% (v/v), complejo polivitamínico B polivitamínico comercial Dispert® al 1% (v/v) y extracto de levadura 1 g/L.

El pH inicial se verificó, registrándose un valor de  $(5,9 \pm 0,2)$ . El O<sub>2</sub> del medio fue desplazado mediante gaseo con N<sub>2</sub> durante aproximadamente 3 min a través de la cabeza de las botellas y luego selladas con septo. Luego, las mismas fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 15 min. Una vez a 37 °C, se agregaron con jeringas estériles las soluciones de buffer, minerales stock P2 (previamente esterilizadas mediante filtración por membrana hidrófila de 0,22 μm) y el inóculo (10% (v/v)) a través del septo de las botellas ya selladas, en cámara de flujo laminar.

Las botellas fueron incubadas en shaker orbital con agitación a 150 rpm y temperatura 35°C.

Se tomaron muestras a las 1, 8, 22, 32, 48, 57 y 73 horas para el análisis de ácidos, azúcares, biomasa, pH y solventes.

El progreso de la fermentación fue monitoreado por °Brix para estimar el contenido de azúcares y absorbancia a 600 nm para determinar la concentración de biomasa. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

## **3.3 - Determinaciones analíticas**

En todas las fermentaciones los métodos analíticos utilizados fueron:

- HPLC para determinar las concentraciones de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa)
- GC para la determinación de ácidos orgánicos (acético y butírico) y solventes (acetona, etanol, isopropanol y butanol)
- Turbidimetría a 600 nm para determinar la concentración de biomasa

### 3.3.1 Determinación de azúcares

Previo a la determinación de azúcares, las muestras fueron tratadas con 10 µL ácido sulfosalicílico cada 4 mL de muestra, para precipitar las proteínas contenidas en la misma. Una vez concluida la precipitación, se centrifugó durante 10 min, a 6500 rpm y 4°C, y se conservó el sobrenadante, del cual se determinaron los azúcares.

Los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando el cromatógrafo Shimadzu® a 45°C de temperatura y un flujo de 0,3 mL/min. La corrida fue de 35 min. Se utilizó la columna Shodex SUGAR Series® KS-801 para el ensayo en el que se estudió el agregado de diferentes concentraciones de butanol y la columna Bio-RAD® Aminex HPX-87H para el resto de los ensayos de fermentación. La detección de los mismos se hizo con un detector de índice de refracción.

### 3.3.2 Determinación de solventes

Previo a la determinación de ácidos y solventes, las muestras fueron tratadas con 10 µL ácido sulfosalicílico cada 4 mL de muestra, precipitando así las proteínas contenidas en la misma. Una vez concluida la precipitación, se centrifugó durante 10 min, a 6500 RPM y 4°C, y se conservó el sobrenadante, del cual se determinaron ácidos y solventes por cromatografía de gas.

El contenido de ácidos acético, butírico, acetona, isopropanol, butanol y etanol se determinó por cromatografía gaseosa, en un equipo Shimadzu® modelo GC 2010. Se utilizó una columna RTX-Wax 1053025, 0,5 mm (0,32 mm x 30 m), con un detector FID y el inyector automático (AOC-20i) en modo de inyección split. Las condiciones fueron: temperatura del detector 250°C, temperatura de inyección 250°C, volumen de inyección: 1 mL, relación de split 35. Se usó hidrógeno como gas carrier (presión 23,1 kPa) y nitrógeno como make up (flujo 30 mL/min).

Las corridas cromatográficas se realizaron según la curva de temperatura que se aprecia en la **Tabla 3**. El tiempo total de cada corrida fue de 17 min.

**Tabla 3:** Curva de temperatura en función de tiempo utilizada para la determinación de solventes y ácidos.

Pendiente	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
-	50,0	2,0
0,5	50,5	1,0
15,0	100,0	0,0
50,0	200,0	8,0

El análisis de los cromatogramas para la determinación de las concentraciones de solventes y ácidos fue realizado con el software *GC Solution 2.41.00* del paquete *LabSolutions*© de Shimadzu®.

### 3.3.3 Determinación de biomasa

Se determinó la biomasa presente en las muestras mediante la absorbancia a 600 nm.

Se separó una fracción de muestra la cual se centrifugó durante 10 min, a 6500 RPM y 4°C, y se conservó el sobrenadante para su uso como blanco.

Para la obtención de los valores de biomasa, expresada en g/L, se utilizó una curva de calibración previamente determinada por peso seco la cual se aprecia en el Anexo: **Punto 7.2**. La curva de ajuste fue:  $y = 0,3x - 0,00962$ ,  $r^2 = 0,995$ , siendo  $x$  la absorbancia determinada a 600 nm (UA) e  $y$  la concentración de biomasa (g/L).

## 3.4 Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) de los datos experimentales se realizó utilizando el software InfoStat (versión 2017, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, <http://www.infostat.com.ar>). Las diferencias entre las medias fueron evaluadas mediante el test de Tukey, considerándose diferencias significativas aquellas en que el  $p$ -valor;  $p > 0,05$ .

## 3.5 Cálculos

A continuación se presentan los cálculos utilizados para la determinación de los distintos parámetros en las fermentaciones:

$$[Azúcares\ totales] = [Sacarosa] \times 1.05 + [Glucosa] + [Fructosa] \quad (\text{ec. 1})$$

$$Y_{BuOH} = \frac{[BuOH]_t - [BuOH]_0}{[Azúcares\ totales]_0 - [Azúcares\ totales]_t} \quad (\text{ec. 2})$$

$$Y_{IBE} = \frac{[IBE]_t - [IBE]_0}{[Azúcares\ totales]_0 - [Azúcares\ totales]_t} \quad (\text{ec. 3})$$

$$Q_{BuOH} = \frac{[BuOH]_t - [BuOH]_0}{t} \quad (\text{ec. 4})$$

$$Q_{IBE} = \frac{[IBE]_t - [IBE]_0}{t} \quad (\text{ec. 5})$$

$$x_S (\%) = \frac{[Azúcares\ totales]_0 - [Azúcares\ totales]_t}{[Azúcares\ totales]_0} \times 100 \quad (\text{ec. 6})$$

Dónde:

- [Sacarosa], [Glucosa] y [Fructosa], son las concentraciones (expresadas en gramos por litro) de sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente.
- [Azúcares totales] es la concentración en gramos por litro de equivalentes de glucosa.
- $Y_{BuOH}$  e  $Y_{IBE}$  son los rendimientos de butanol y solventes totales expresados como gramos de butanol producidos por gramos de equivalentes de glucosa consumidos y gramos de IBE producidos por gramos de equivalentes de glucosa consumidos respectivamente.
- $Q_{BuOH}$  y  $Q_{IBE}$  son las productividades de butanol y solventes totales expresados como gramos de butanol e IBE producidos por litro y hora respectivamente.
- $[BuOH]_t$  es la concentración en gramos por litro de butanol a tiempo  $t$ .
- $[BuOH]_0$  es la concentración en gramos por litro de butanol a tiempo 0.
- $[Azúcares\ totales]_t$  es la concentración en gramos por litro de equivalentes de glucosa a tiempo  $t$ .
- $[Azúcares\ totales]_0$  es la concentración en gramos por litro de equivalentes de glucosa a tiempo 0.
- $x_s$  es la conversión de azúcares a tiempo  $t$ , expresada porcentualmente.
- $t$  es el tiempo transcurrido de la fermentación expresado en horas.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mauricio Fabián  
Ávila Araujo



FACULTAD DE  
CIENCIAS



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE



INGENIERIA

33

Producción de Isopropanol-Butanol-Etanol como combustible utilizando  
*Clostridium beijerinckii* DSM 6423 a partir de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce

Mauricio Fabián Ávila Araujo

# 4 - Resultados y discusión

## 4.1 Evaluación de la toxicidad de la cepa frente a butanol y antiespumante

Se evaluó el efecto de distintas concentraciones iniciales de butanol sobre y el crecimiento y la producción de solventes de la cepa de *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. Las concentraciones de butanol evaluadas se basaron en trabajos previos del grupo de trabajo (*Departamento de Bioingeniería*), en los cuales se observó inhibición de la cepa a concentraciones de butanol de aproximadamente 6,5 g/L.

Se evaluó también el agregado de antiespumante debido a que en experiencias previas en el grupo de trabajo se había observado inhibición de la fermentación luego del agregado de antiespumante al biorreactor de laboratorio. Ezeji et al., (2005) observaron que la productividad se redujo como resultado de la adición de una cantidad excesiva de antiespumante, lo que sugirió que la fermentación se vio afectada negativamente por el antiespumante.

En la **Tabla 4** se presentan los parámetros obtenidos de la fermentación a las 48 horas y en las **Figuras 4 a 6** se presentan los perfiles de biomasa, ácidos, azúcares y solventes.

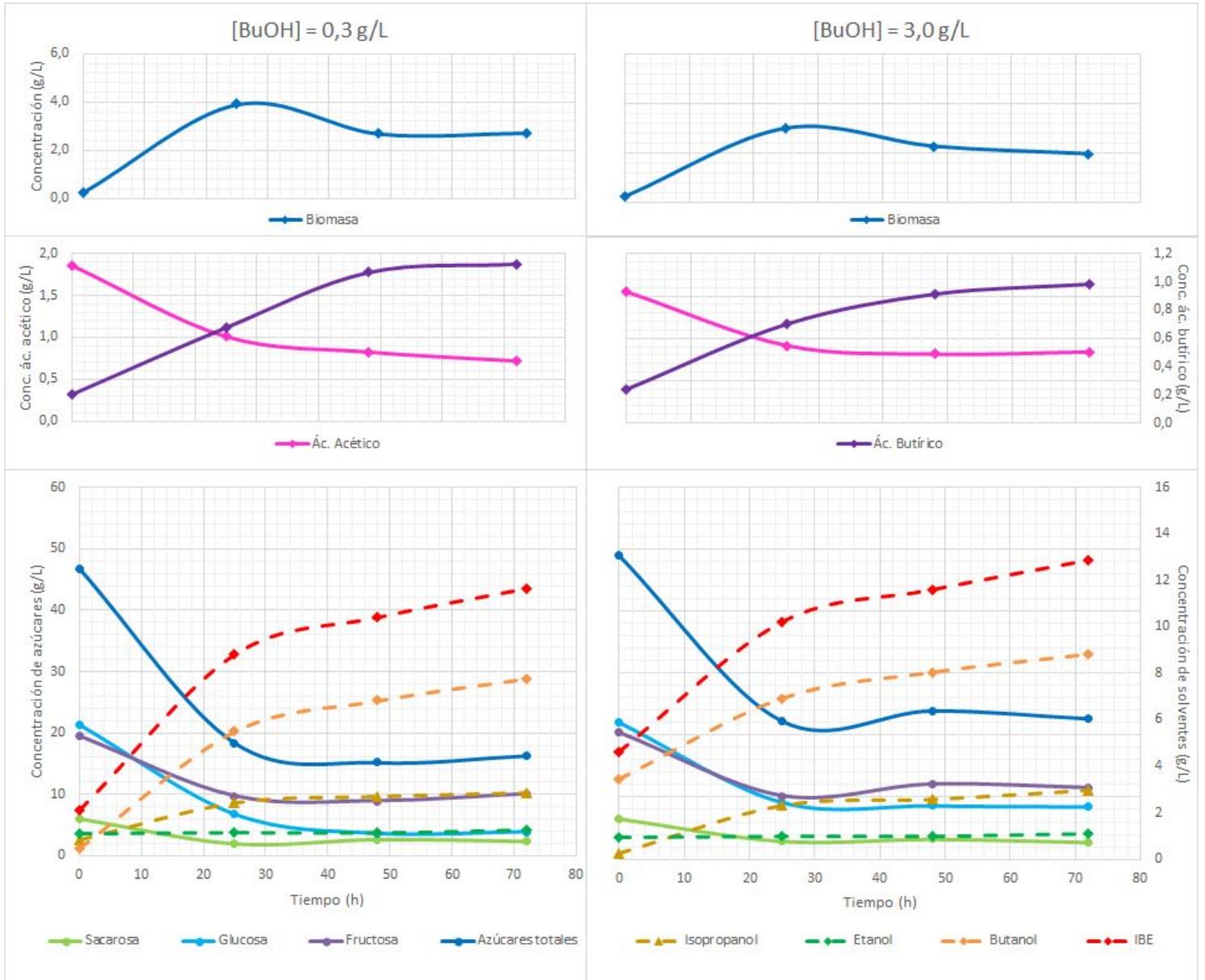
**Tabla 4:** Parámetros de fermentación de *C. beijerinckii* DSM 6423 para diferentes concentraciones iniciales de butanol y agregado de antiespumante.

Parámetro	Unidad	Concentración inicial de butanol (g/L)				Antiespumante
		0,3	3,0	5,3	7,5	
Azúcares iniciales	g/L	47 ± 1	49 ± 1	50 ± 1	52 ± 1	52 ± 1
Sacarosa	g/L	2,6 ± 0,0	3,2 ± 0,4	2,7 ± 0,3	4,1 ± 0,4	6,6 ± 0,1
Glucosa	g/L	3,6 ± 0,3	8,6 ± 0,5	12,9 ± 0,7	17,3 ± 0,1	24,6 ± 0,3
Fructosa	g/L	9 ± 1	12 ± 1	13 ± 0	16 ± 0	23 ± 0
Azúcares totales <sup>1</sup>	g/L	15 ± 1	24 ± 2	28 ± 1	37 ± 1	54 ± 1
Acetona	g/L	0,14 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Isopropanol	g/L	2,6 ± 0,0	2,6 ± 0,2	2,7 ± 0,3	1,7 ± 0,2	0,1 ± 0,0
Etanol	g/L	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0
Butanol inicial	g/L	0,3 ± 0,0	3,0 ± 0,4	5,3 ± 0,7	7,5 ± 0,3	0,3 ± 0,0
Butanol producido	g/L	6,4 ± 0,0 <sup>c</sup>	4,6 ± 0,1 <sup>bc</sup>	3,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Solventes totales producidos	g/L	8,3 ± 0,8 <sup>b</sup>	7,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	6,3 ± 0,7 <sup>b</sup>	3,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Ácido acético	g/L	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,1	2,6 ± 0,2
Ácido butírico	g/L	1,1 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1	5,9 ± 0,2
Rendimiento butanol <sup>2</sup>	$g_{\text{Butanol}}/g_{\text{Az}}$	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>
Rendimiento solvente total <sup>3</sup>	$g_{\text{IBE}}/g_{\text{Az}}$	0,27 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,29 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,03 ± 0,02 <sup>a</sup>
Productividad butanol <sup>4</sup>	g/Lh	0,13 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>bc</sup>	0,07 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Productividad solvente total <sup>5</sup>	g/Lh	0,17 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Biomasa	g/L	2,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
Conversión azúcares <sup>6</sup>	%	67 ± 2 <sup>d</sup>	51 ± 5 <sup>c</sup>	43 ± 2 <sup>c</sup>	29 ± 3 <sup>b</sup>	0 ± 2 <sup>a</sup>

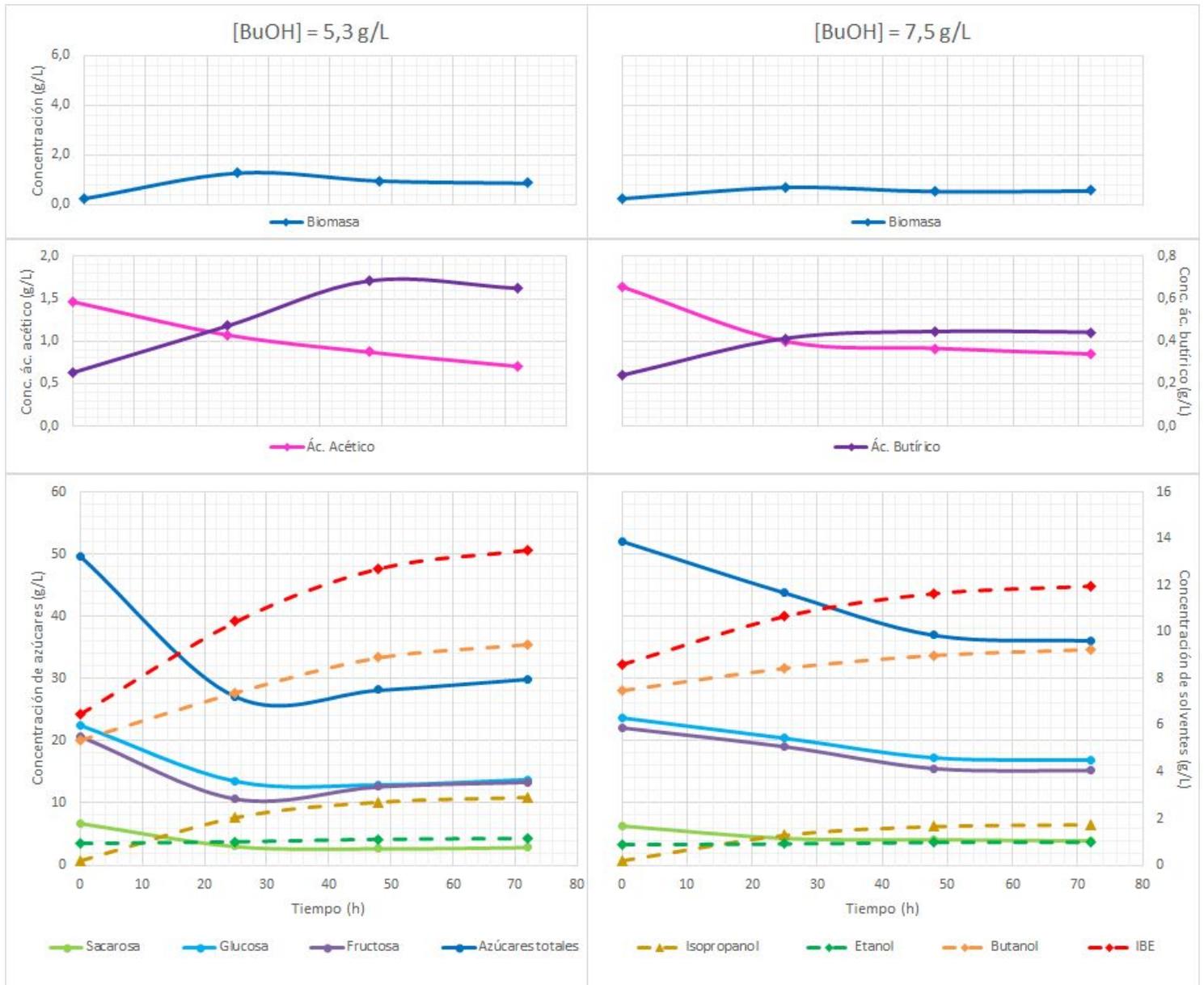
<sup>1, 2, 3, 4, 5 y 6</sup> Determinados según las ecuaciones 1 a 6 respectivamente (Punto 3.5 Cálculos).

$g_{\text{Az}}$ : gramos de azúcares totales definidos como equivalentes de glucosa (Punto 3.5 Cálculos eq. 1).

Parámetros en una misma fila cuyo superíndice presenta diferente letra, presentan diferencias significativas en cuanto al análisis de varianza (ANOVA) ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4:** Perfiles de biomasa, ácidos, azúcares y solventes, para una concentración inicial de butanol agregado de 0,3 y 3,0 g/L respectivamente.



**Figura 5:** Perfiles de biomasa, ácidos, azúcares y solventes, para un concentración inicial de butanol agregado de 5,3 y 7,5 g/L respectivamente.

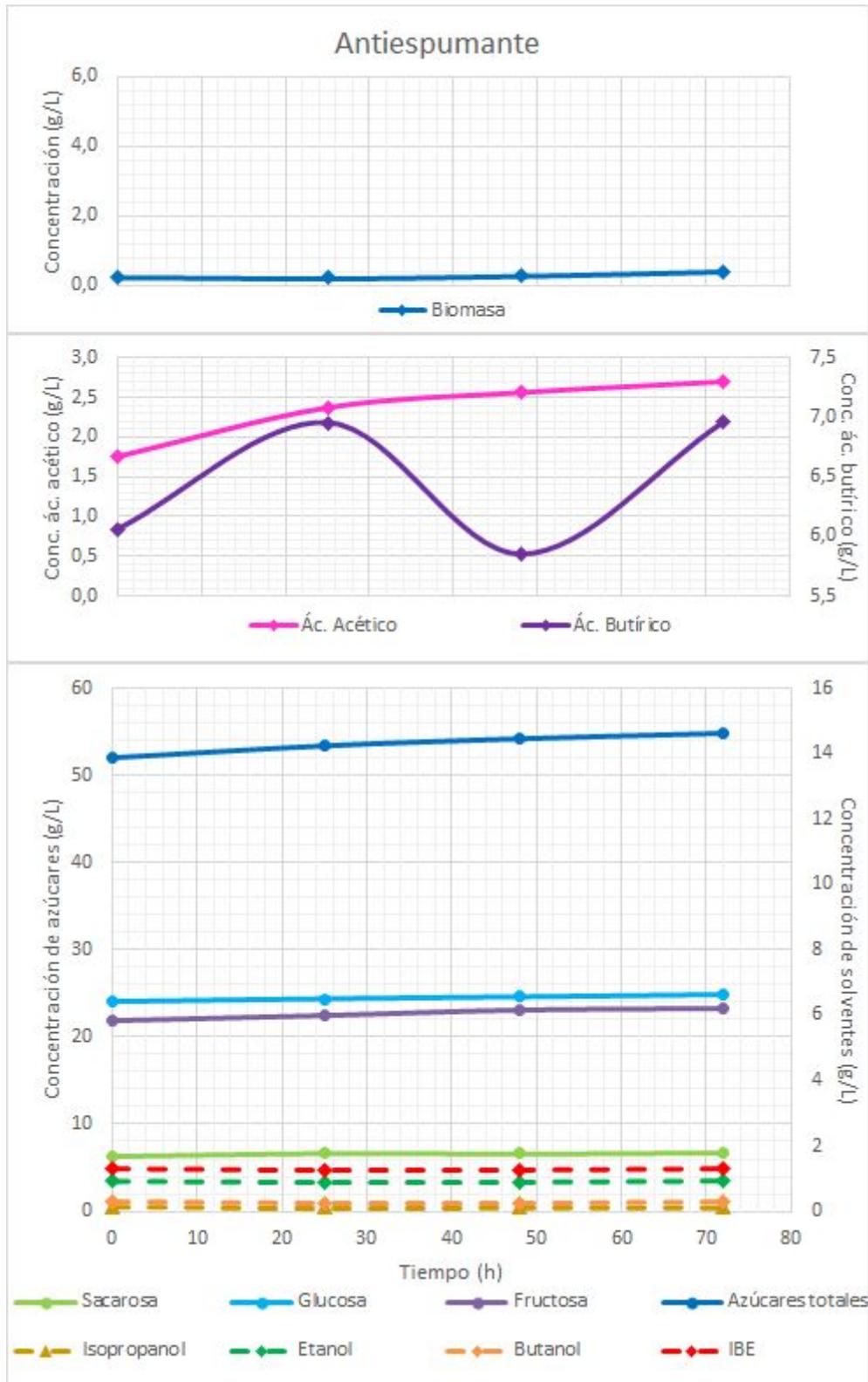


Figura 6: Perfiles de biomasa, ácidos, azúcares y solventes, en un medio conteniendo antiespumante 1% (v/v).

De la **Tabla 4** y de las **Figuras 4** hasta **6** se puede apreciar que la cinética tanto del consumo de azúcares como de la producción de butanol estuvo influenciada por la concentración de butanol inicial de manera que a medida que la concentración de butanol inicial agregado externamente aumentó, la producción del mismo disminuyó, al igual que el consumo de azúcares. Esto era de esperar, ya que la producción de butanol inhibe las vías metabólicas del microorganismo, debido a que es tóxico para el mismo (Kumar et al., 2011). La alta concentración de butanol induce un cambio adverso en la composición de fosfolípidos y ácidos grasos de membrana. Este cambio disminuye la relación de ácidos grasos saturados e insaturados (relación *unsaturated fatty acids/saturated fatty acids*: U/S) y también disminuye la interacción específica del alcohol con componentes individuales de los lípidos (determinado para *C. acetobutylicum*: Lepage et al. (1987). El butanol, además de alterar la estructura de la membrana, interrumpe una serie de características fisicoquímicas tales como el transporte facilitado de solutos, la permeabilidad de membrana, el mantenimiento de la fuerza protón-motriz (o mantenimiento del pH intracelular), el nivel de ATP intracelular, la captación de glucosa y la conformación y actividad de proteínas de membrana. Se ha observado un incremento de 20-30% de fluidez en la membrana con una exposición de sólo 1% de butanol (Bowles et al., 1985; Vollherbst-Schneck et al., 1984).

Se observó una disminución en la producción de butanol y solventes, en la cinética del consumo de azúcares y producción de solventes a medida que el butanol se agregó externamente. La inhibición de las vías metabólicas productoras de butanol frente al agregado externo del mismo fue casi total, cuando el mismo se agregó a una concentración de 7,5 g/L. Esto se vió reflejado en una menor concentración de butanol 1,5 g/L y solventes producidos 3,0 g/L, menor conversión de azúcares 29 % y crecimiento de la biomasa 0,5 g/L. Para obtener la concentración de butanol a la cual la inhibición de las vías solventogénicas es **total**, se debería profundizar en futuros estudios a concentraciones externas de butanol agregado superiores a 7,5 g/L. No se observaron diferencias significativas entre el control y los ensayos cuyo agregado externo de butanol fue a concentraciones de 3,5 y 5,3 g/L en cuanto al butanol producido. El rendimiento tanto de butanol como de solventes totales, a todas las concentraciones iniciales de butanol estudiadas fueron comparables.

Como se esperaba, la productividad de butanol fue menor cuando mayor fue la concentración de butanol agregada externamente. La productividad de solventes totales fue comparable entre el control y los ensayos cuyas concentraciones de butanol agregado fue de 3,5 y 5,3 g/L. Cuando la concentración de butanol agregado fue de 7,5 g/L, la productividad fue menor al resto de las condiciones (0,06 g/Lh).

Se observó que a las 24 h de fermentación el consumo de azúcares llegó a su punto final. El azúcar consumido preferencialmente fue la glucosa.

Respecto al agregado de antiespumante, no se está aún en posición de concluir respecto a la afectación de los parámetros cinéticos, ya que el mismo se agregó a concentración fija relativamente alta (1% v/v). Es por tanto, que resulta conveniente ampliar esta experiencia en futuros ensayos a concentraciones iniciales menores de antiespumante, en pos de determinar la mínima concentración en el cual el antiespumante es tóxico para *C. beijerinckii* DSM 6423.

## **4.2 Evaluación del agregado de ácido butírico como precursor**

Una característica típica de la producción de solventes por clostridios es la fermentación bifásica. La primera fase es la acidogénica, durante la cual se producen ácido acético, ácido butírico, hidrógeno y dióxido de carbono como productos principales (Andersch et al., 1983; Hartmanis et al., 1984). La segunda fase es la solventogénica durante la cual los ácidos se reasimilan y se utilizan en la producción de acetona (o isopropanol en algunas cepas de *C. beijerinckii*), butanol y etanol (Dürre et al., 1987). Por esta razón, se estudió si el agregado inicial de ácido butírico tenía un efecto positivo sobre la producción de butanol. En la **Tabla 5** se presentan los parámetros obtenidos de la fermentación a las 48 horas, y en las **Figura 7 a 9** se presentan los perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes.

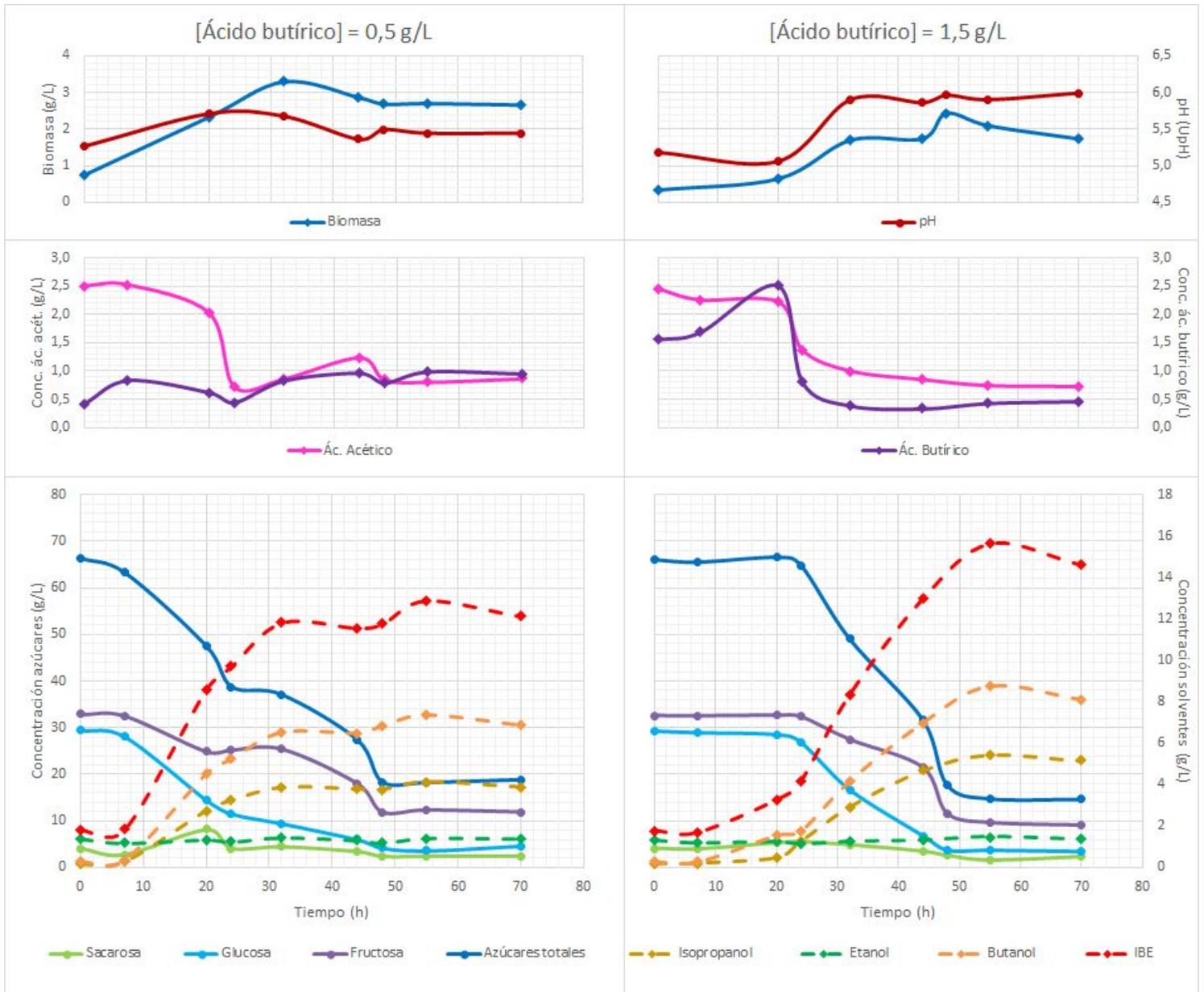
**Tabla 5** - Parámetros de fermentación de *C. beijerinckii* DSM 6423 para diferentes concentraciones iniciales de ácido butírico.

Parámetro	Unidad	Concentración inicial de ácido butírico (g/L)				
		0,5	1,5	2,2	4,8	6,5
Azúcares iniciales	g/L	66 ± 0	66 ± 0	64 ± 0	66 ± 2	64 ± 2
Sacarosa	g/L	2,3 ± 0,0	2,6 ± 0,0	4,8 ± 0,0	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1
Glucosa	g/L	4,2 ± 0,0	3,6 ± 0,0	12,9 ± 0,7	14,9 ± 0,6	14,4 ± 0,1
Fructosa	g/L	11,8 ± 0,0	11,6 ± 0	16,5 ± 0,0	17,0 ± 0,6	16,6 ± 0,1
Azúcares totales <sup>1</sup>	g/L	18 ± 0	18 ± 0	38 ± 0	35 ± 1	34 ± 0
Acetona	g/L	0,24 ± 0,08	0,10 ± 0,05	0,1 ± 0,03	0,10 ± 0,05	0,06 ± 0,00
Isopropanol	g/L	3,8 ± 0,0	4,1 ± 0,3	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Etanol	g/L	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2
Butanol producido	g/L	6,5 ± 0,5 <sup>b</sup>	6,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,05 <sup>a</sup>
Solventes totales	g/L	11,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	12,0 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,3 <sup>a</sup>
Ácido acético	g/L	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,3 ± 0,2
Ácido butírico	g/L	0,8 ± 0,3	0,3 ± 0,0	2,2 ± 0,1	4,1 ± 0,1	6,6 ± 0,3
Ácido butírico inicial	g/L	0,4 ± 0,2	1,6 ± 0,3	2,2 ± 0,5	4,8 ± 1,0	6,5 ± 1,3
Rendimiento butanol <sup>2</sup>	$g_{\text{Butanol}} / g_{\text{Az}}$	0,12 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>	-	-	-
Rendimiento solvente total <sup>3</sup>	$g_{\text{IBE}} / g_{\text{Az}}$	0,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,05 <sup>b</sup>	-	-	-
Productividad butanol <sup>4</sup>	g/Lh	0,14 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>b</sup>	-	-	-
Productividad solvente total <sup>5</sup>	g/Lh	0,21 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	-	-	-
Biomasa	g/L	2,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	2,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,03 <sup>a</sup>
Conversión azúcares <sup>6</sup>	%	72 ± 0 <sup>c</sup>	73 ± 0 <sup>c</sup>	46 ± 3 <sup>b</sup>	4 ± 1 <sup>b</sup>	3 ± 0 <sup>a</sup>

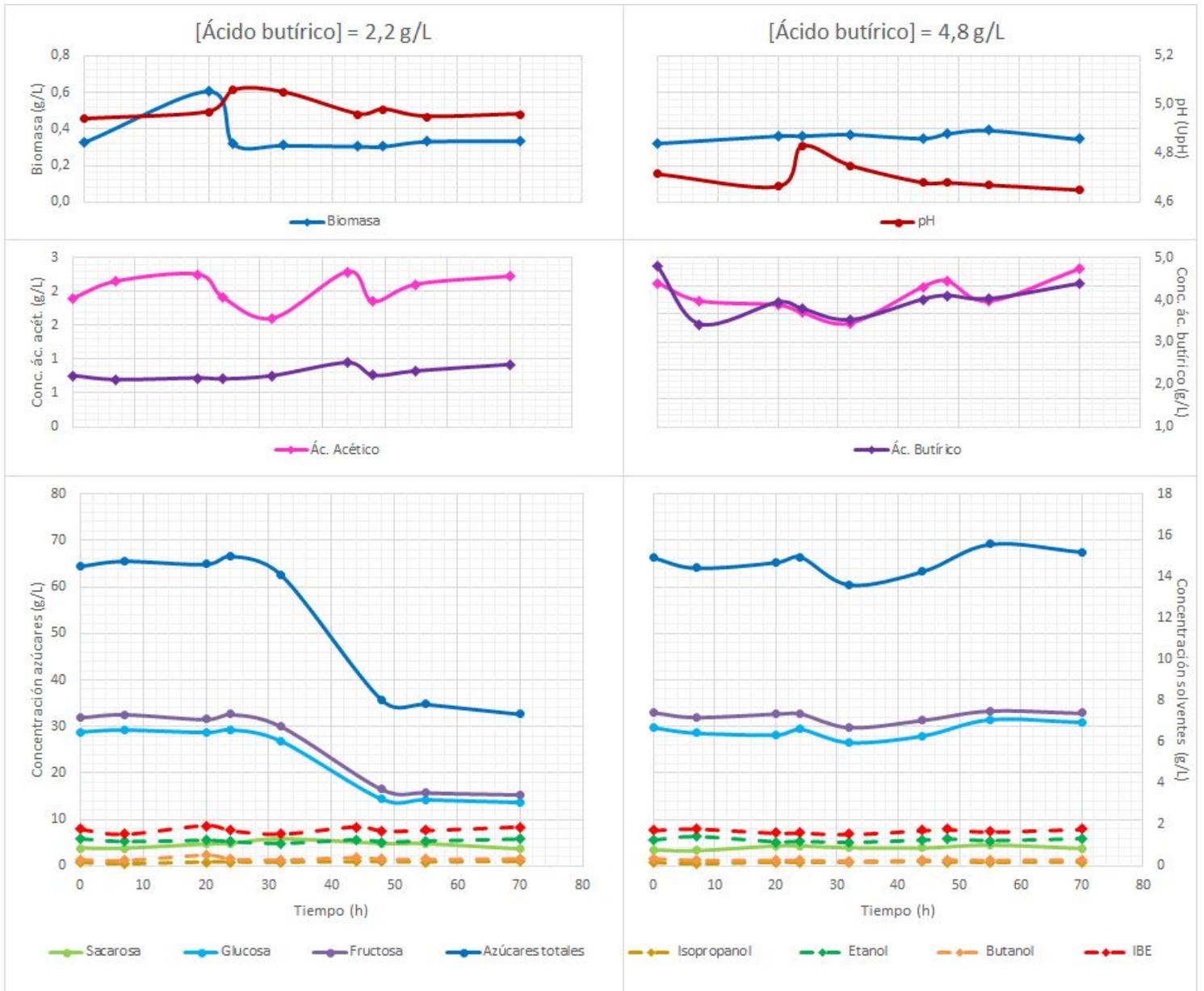
<sup>1, 2, 3, 4, 5 y 6</sup> Determinados según las ecuaciones 1 a 6 respectivamente (Punto **3.5 Cálculos**).

$g_{\text{Az}}$ : gramos de azúcares totales definidos como equivalentes de glucosa (Punto **3.5 Cálculos** eq. 1).

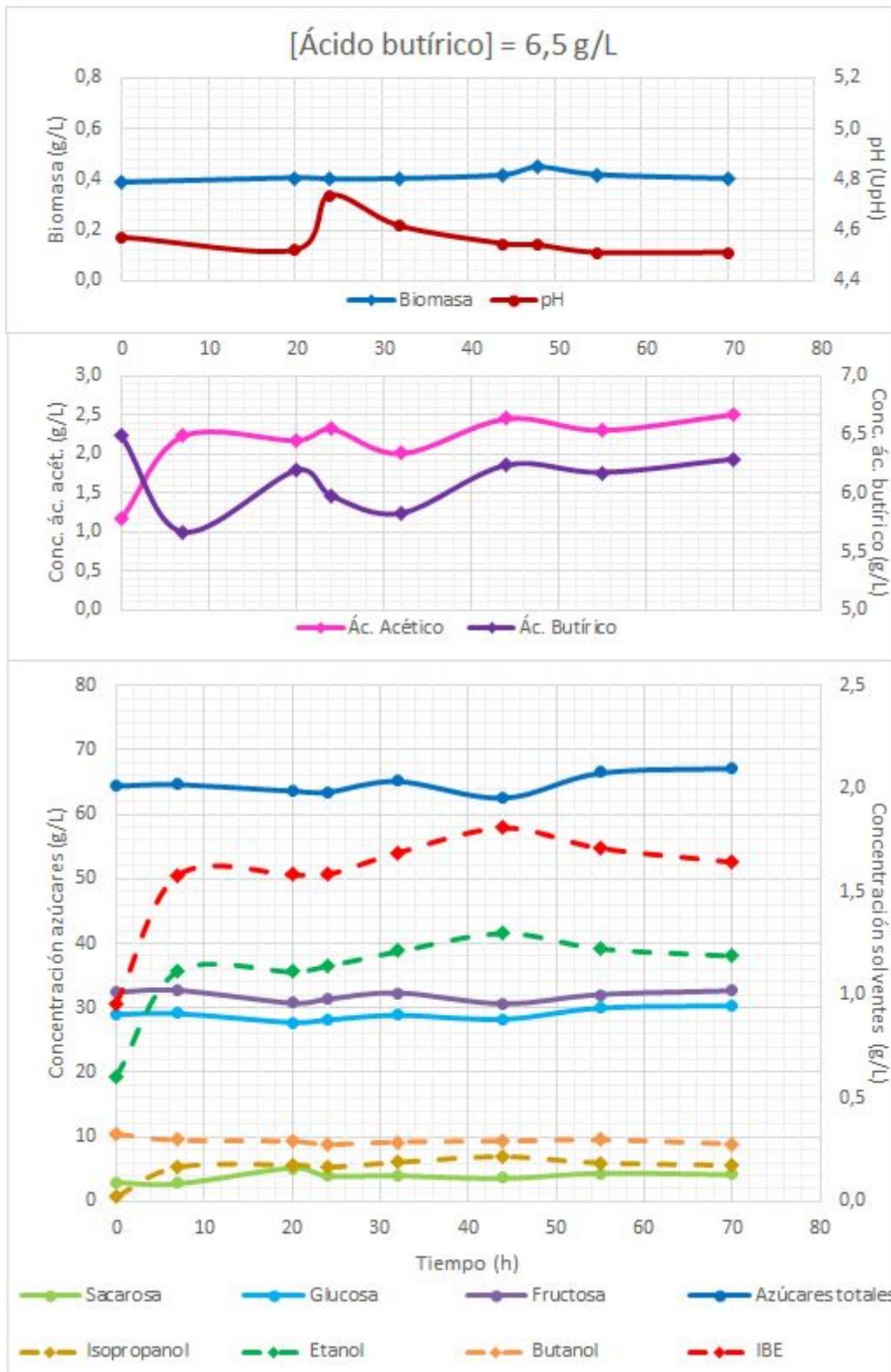
Parámetros en una misma fila cuyo superíndice presenta diferente letra, presentan diferencias significativas en cuanto al análisis de varianza (ANOVA) ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, cuando la concentración inicial de ácido butírico es de 0,5 y 1,5 g/L respectivamente.



**Figura 8:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, cuando la concentración inicial de ácido butírico es de 2,2 y 4,8 g/L respectivamente.



**Figura 9:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, cuando la concentración inicial de ácido butírico es de 6,5 g/L.

De la **Tabla 5** y de las **Figuras 7 a 9** se pudo apreciar que la conversión de azúcares cuando no hay agregado de ácido butírico inicial y cuando el mismo se agregó a una concentración de 1,5 g/L, fue ampliamente mayor al resto de las condiciones. Se observó que la biomasa producida cuando no hubo agregado de ácido butírico inicial (2,7 g/L) fue levemente mayor (2,4 g/L) que cuando se agrega el mismo a una concentración de 1,5 g/L y ampliamente mayor que en el resto de las condiciones (menores a 0,4 g/L).

El rendimiento y la productividad (tanto de butanol como de IBE) solo fueron determinados para aquellas concentraciones iniciales de 0,5 y 1,5 g/L de ácido butírico. Los resultados de ambos ensayos fueron comparables. En cuanto a la producción de solventes, se obtuvo una concentración de butanol de 6,5 y de 6,6 g/L y una concentración de IBE de 11,8 y 12,0 g/L cuando la concentración inicial de ácido butírico fue de 0,5 y 1,5 g/L respectivamente.

En lo que respecta a la cinética del consumo de azúcares así como de la producción de butanol e IBE, se pudo apreciar que ambas se ralentizan al agregar ácido butírico externo (1,5 g/L frente a ensayo control). Esto se traduce a una mayor fase de latencia (*lag*) antes del inicio del consumo de azúcares así como de producción de solventes, de acuerdo a la concentración de ácido butírico agregado externamente (ver **Figura 7**, para solventes y azúcares). Esto se puede asociar a que durante la fase solventogénica los ácidos se reasimilan y se usan en la producción de isopropanol, butanol y etanol. La transición de la fase acidogénica a la fase solventogénica es el resultado de un cambio drástico en el patrón de expresión génica (Bahl et al., 1995). Por tanto es esperable que exista esa fase *lag*, asociada al cambio en el patrón de la expresión génica para preparar a *C. beijerinckii* para la reasimilación de los ácidos.

Por todo esto se puede apreciar que las mejores condiciones se obtuvieron cuando no hay agregado de ácido butírico o cuando el mismo fue de 1,5 g/L. Este resultado se contrapone a lo reportado previamente por Wang et al. (2013), en el cual se complementó el medio de fermentación con ácido butírico (en forma de butirato de sodio) en la fermentación ABE con *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 y se obtuvo que la producción de solvente se completó en menor tiempo con la adición de butirato (en  $t < 50$  h) frente al control ( $t > 90$  h). La suplementación con butirato condujo a una mejora del 31% en la concentración, del 58% en el rendimiento y del 133% en la productividad de butanol respectivamente.

Tashiro et al. (2004) estudiaron en modalidad fed-batch, alimentado con ácido butírico y glucosa en fermentación ABE usando *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. Obtuvieron un aumento en la tasa específica de producción de butanol de 0,10 g de butanol/g de células/h (control), a 0,42 g de butanol/g de células/h con agregado de 5,0 g/L de ácido butírico ante el agregado de ácido butírico.

### 4.3 Evaluación del agregado de CSL como nutriente al medio de fermentación

Se evaluó la sustitución de distintos componentes del medio de cultivo por licor macerado de maíz (CSL), con el objetivo de reducir el costo de producción del butanol e IBE. En la **Tabla 6** se presentan los parámetros obtenidos de la fermentación a las 48 horas y en las **Figuras 10 a 14** se presentan los perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes.

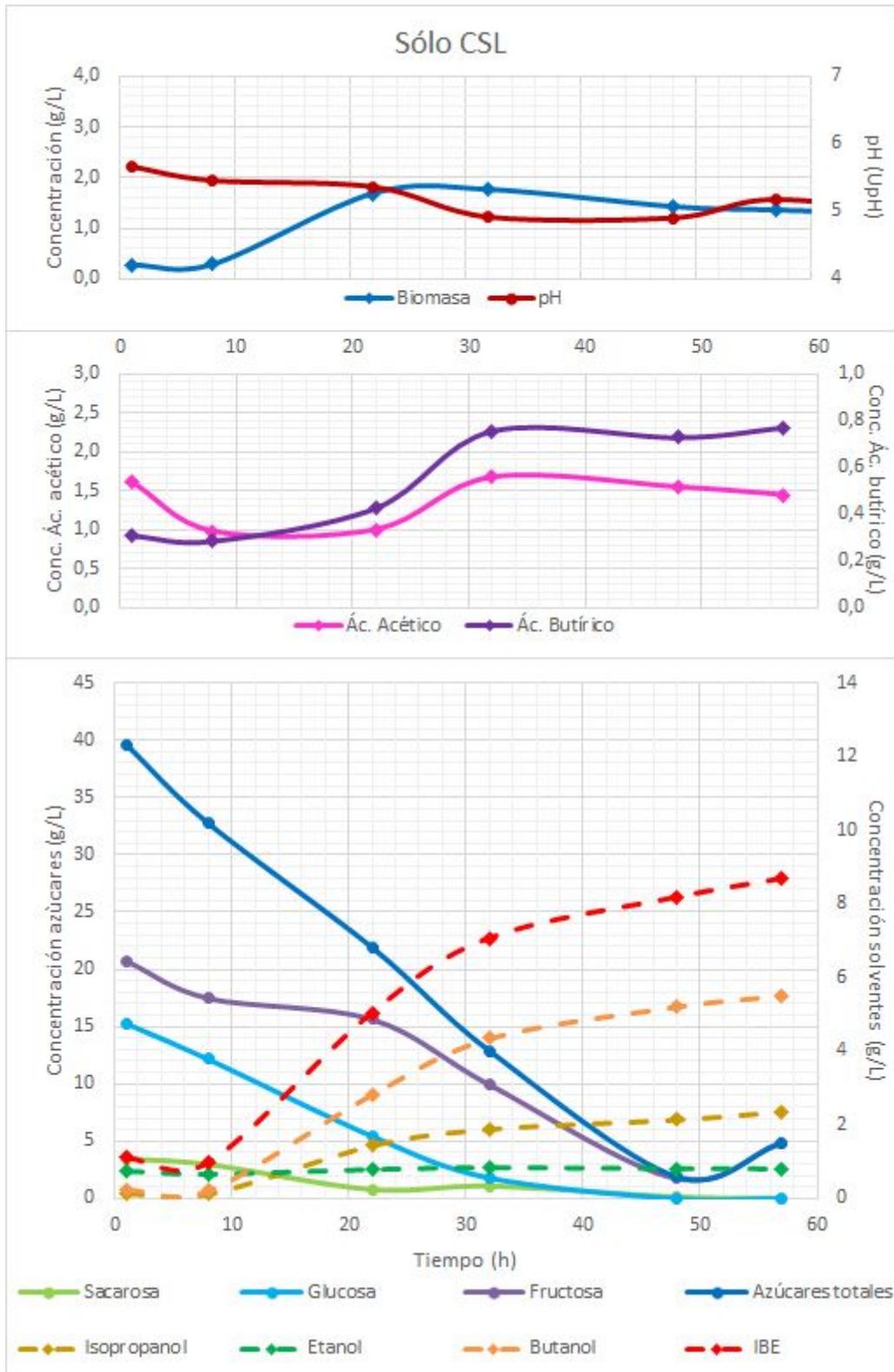
**Tabla 6** - Parámetros determinados del ensayo de fermentación, para *C. beijerinckii* DSM 6423: evaluación del agregado de CSL como nutriente.

Parámetro	Unidad	Sólo CSL	Control	Sin CB* ni YE <sup>†</sup>	Sin CB*	Sin YE <sup>†</sup>
Azúcares iniciales	g/L	39 ± 1	39 ± 3	41 ± 1	39 ± 1	39 ± 1
Sacarosa	g/L	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0
Glucosa	g/L	ND <sup>§</sup>	ND	ND	ND	ND
Fructosa	g/L	1,8 ± 0,4	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Azúcares totales <sup>1</sup>	g/L	1,9 ± 0,6	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,0
Acetona	g/L	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,00
Isopropanol	g/L	2,2 ± 0,1	3,4 ± 0,3	3,8 ± 0,1	3,5 ± 0,0	3,5 ± 0,1
Etanol	g/L	0,78 ± 0,03	0,83 ± 0,05	0,87 ± 0,02	0,82 ± 0,01	0,84 ± 0,04
Butanol	g/L	5,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	7,1 ± 0,5 <sup>b</sup>	7,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	7,3 ± 0,2 <sup>b</sup>
Solventes totales	g/L	8,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	11,2 ± 0,7 <sup>b</sup>	12,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	11,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	11,5 ± 0,4 <sup>b</sup>
Ácido acético	g/L	1,55 ± 0,06	1,19 ± 0,03	1,24 ± 0,04	1,27 ± 0,01	1,29 ± 0,02
Ácido butírico	g/L	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Rendimiento butanol <sup>2</sup>	g <sub>Butanol</sub> / g <sub>Az</sub>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>b</sup>
Rendimiento solvente total <sup>3</sup>	g <sub>IBE</sub> / g <sub>Az</sub>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>b</sup>
Productividad butanol <sup>4</sup>	g/Lh	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>b</sup>
Productividad solvente total <sup>5</sup>	g/Lh	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>b</sup>
Biomasa	g/L	1,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>bc</sup>	2,9 ± 0,0 <sup>bc</sup>	3,0 ± 0,1 <sup>c</sup>
Conversión azúcares <sup>6</sup>	%	95 ± 2 <sup>a</sup>	98 ± 0 <sup>b</sup>	99 ± 0 <sup>b</sup>	99 ± 0 <sup>b</sup>	99 ± 0 <sup>b</sup>

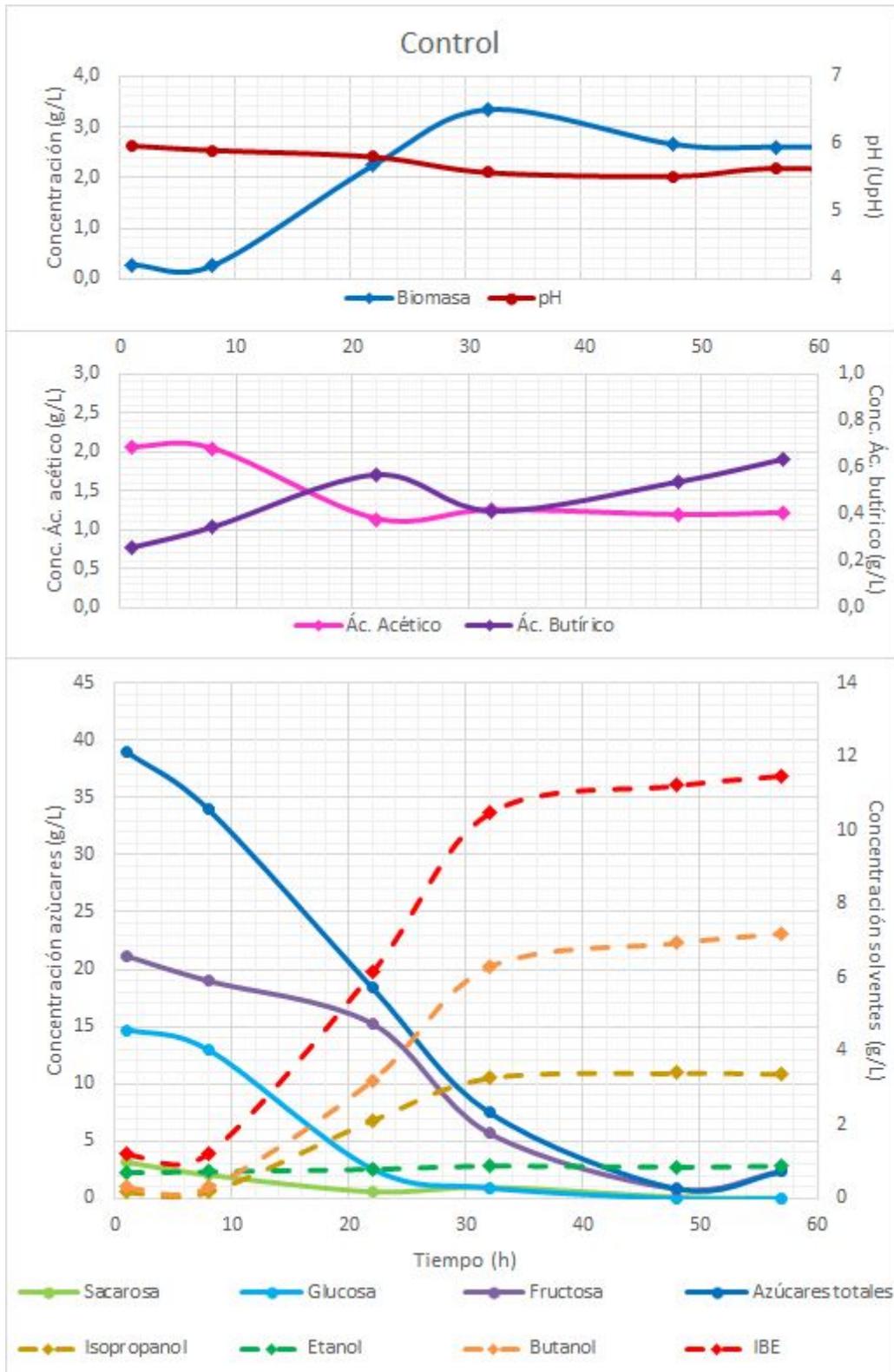
<sup>1, 2, 3, 4, 5 y 6</sup> Determinados según las ecuaciones 1 a 6 respectivamente (Punto 3.5 Cálculos).

g<sub>Az</sub>: gramos de azúcares totales definidos como equivalentes de glucosa (Punto 3.5 Cálculos eq. 1).

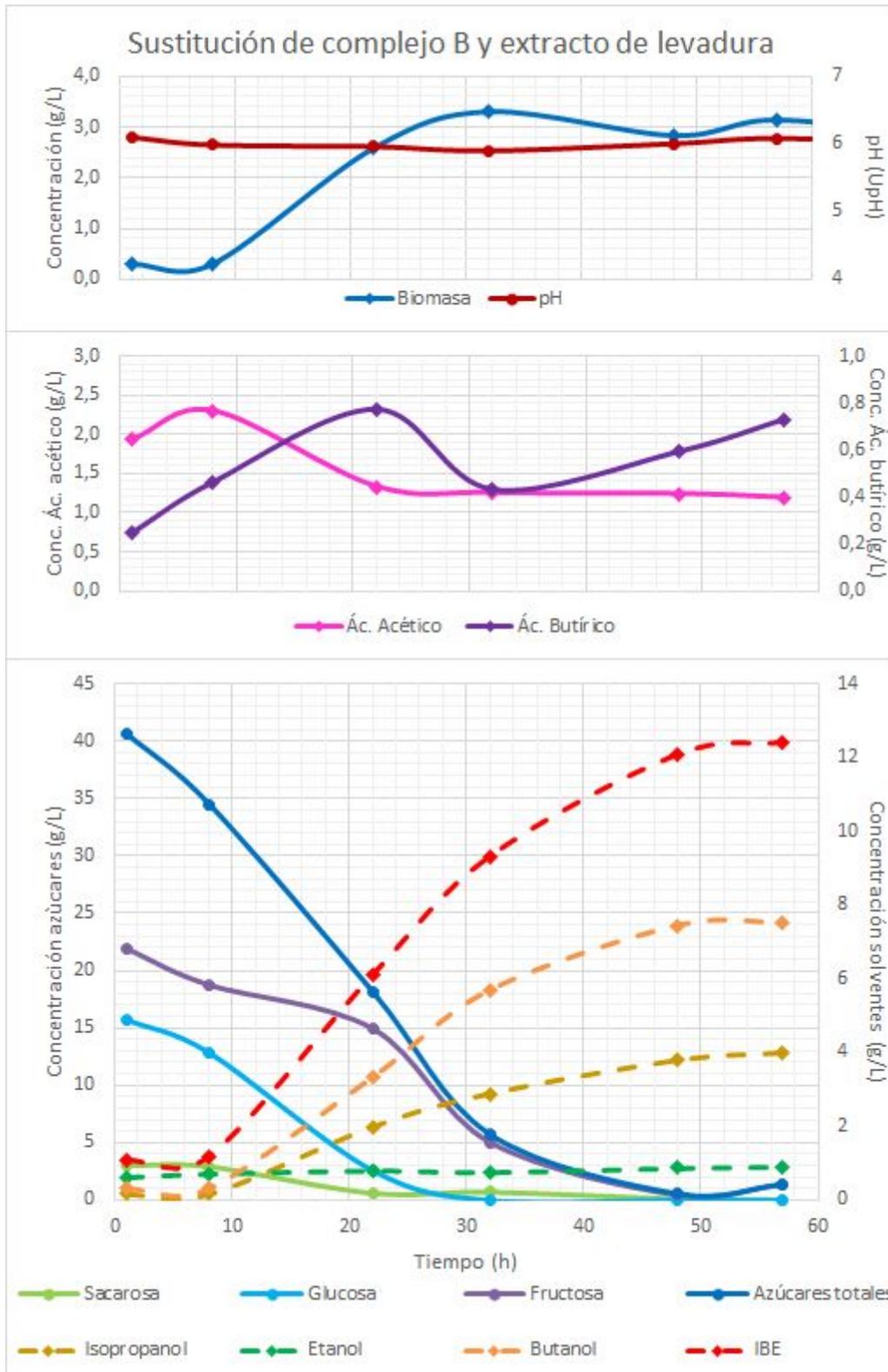
\*CB: Complejo polivitamínico B comercial Dispert<sup>®</sup> †YE: Yeast Extract (Extracto de levadura) §ND: No detectada en las condiciones experimentales. Parámetros en una misma fila cuyo superíndice presenta diferente letra, presentan diferencias significativas en cuanto al análisis de varianza (ANAVA) ( $p > 0,05$ ).



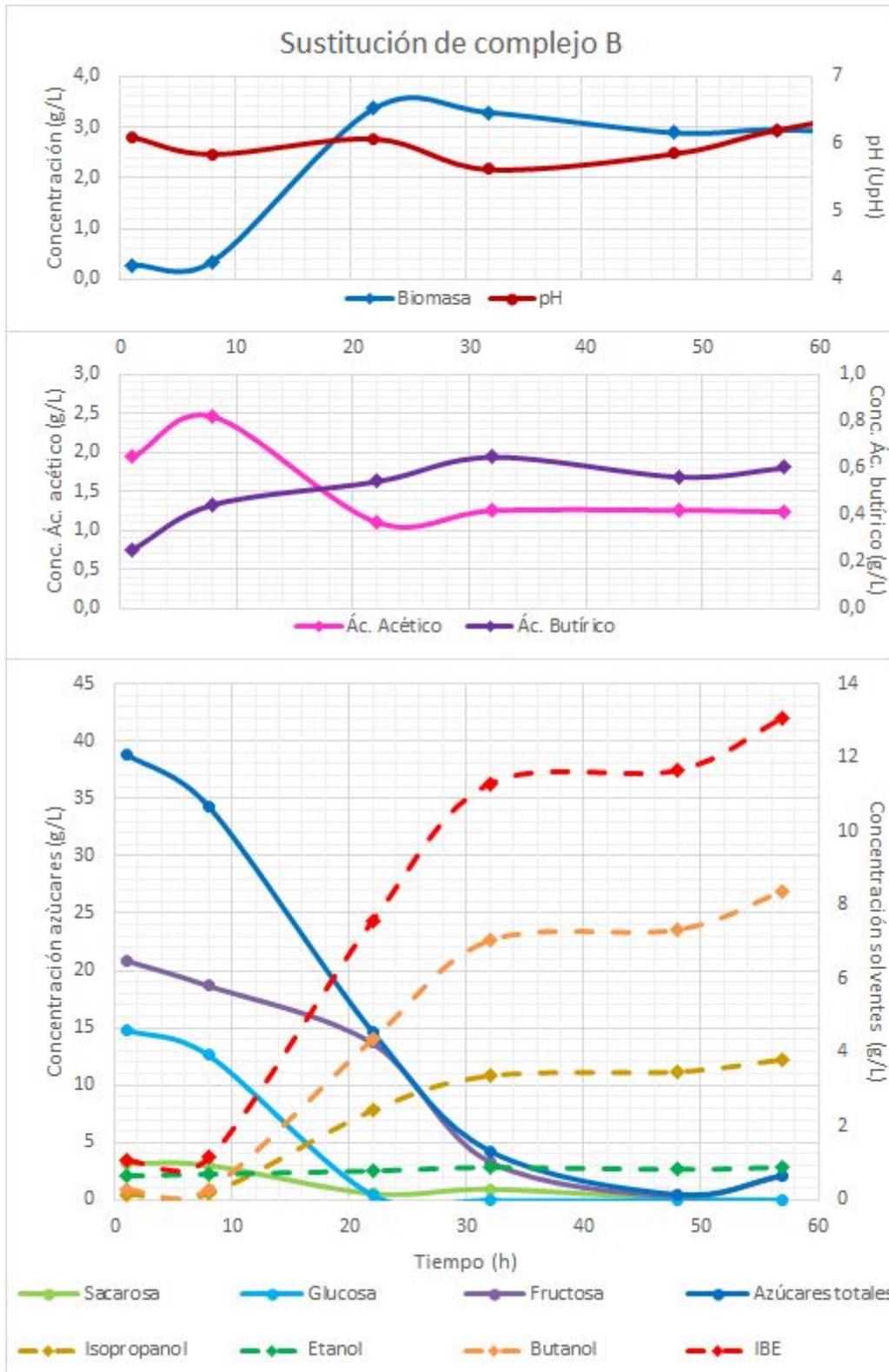
**Figura 10:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, cuando todos los nutrientes del medio (buffer, minerales, vitaminas y extracto de levadura) son sustituidos por CSL.



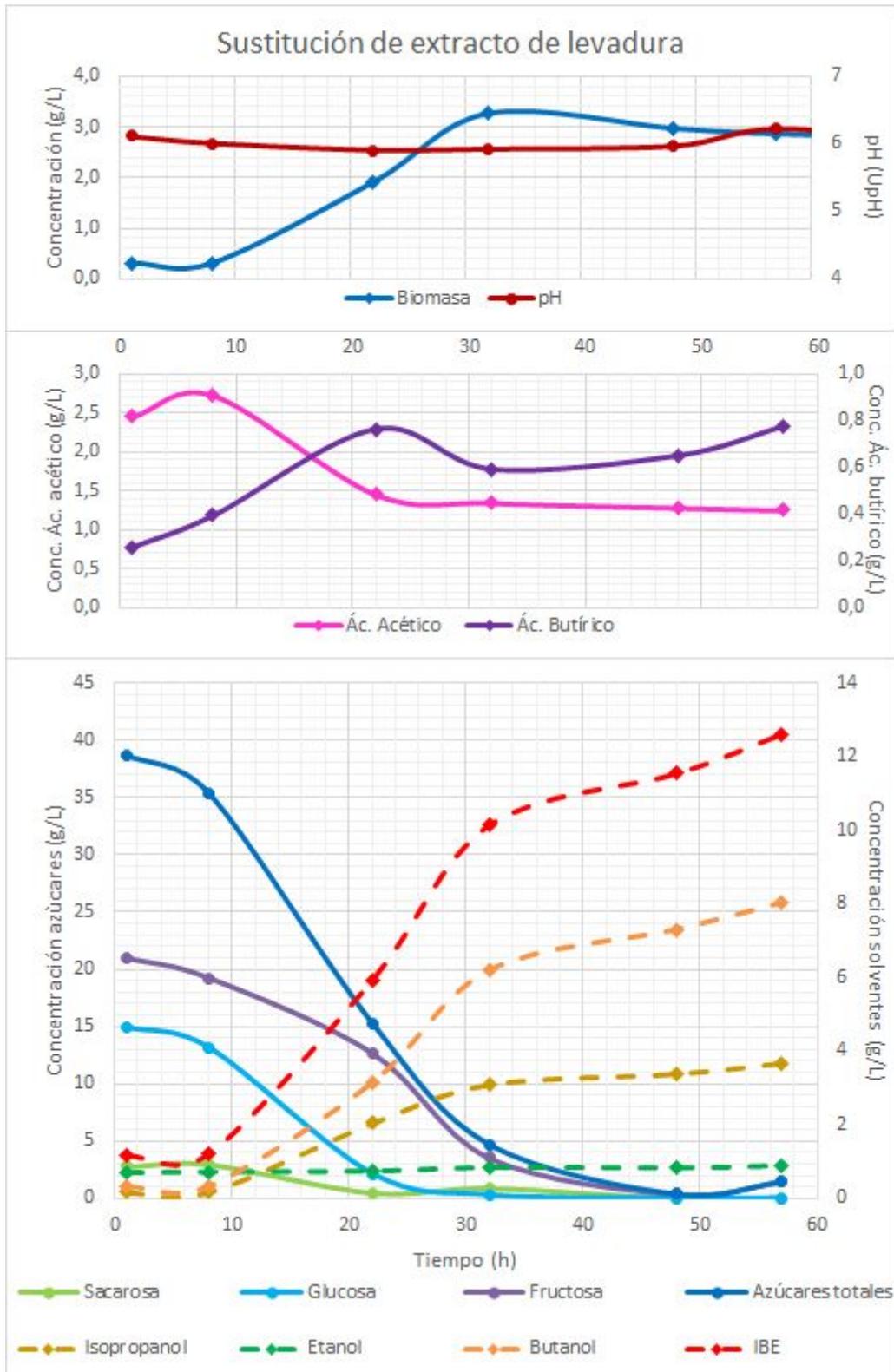
**Figura 11:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes en presencia de buffer, minerales, vitaminas y extracto de levadura y ausencia de CSL.



**Figura 12:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes en presencia de buffer, minerales y CSL (como sustituyente de extracto de levadura y complejo polivitamínico B).



**Figura 13:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes en presencia de buffer, minerales, extracto de levadura y CSL (como sustituyente del complejo polivitamínico B).



**Figura 14:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes en presencia de buffer, minerales, complejo polivitamínico B y CSL (como sustituyente de extracto de levadura).

Se ha reportado que el CSL puede actuar como fuente de bajo costo de nitrógeno y minerales dado que es un subproducto del proceso de la molienda húmeda de maíz, y por lo tanto, rico en proteínas, vitaminas y minerales (Humbird et al., 2011; Maddipati et al., 2011). Sin embargo, en el ensayo que tenía solamente CSL (sin agregado de buffer, minerales, vitaminas ni extracto de levadura) se obtuvo tanto un menor consumo de azúcares y crecimiento de biomasa, como menores valores de concentración, rendimientos y productividades de butanol e IBE que los demás ensayos.

Por otro lado, la sustitución del complejo polivitamínico B, del extracto de levadura, o ambos a la vez por CSL, no presentó diferencias significativas en la mayoría de los parámetros evaluados frente al control (**Tabla 6**). Los rendimientos y productividades del ensayo en que se sustituyó el complejo polivitamínico B y el extracto de levadura por CSL fueron de  $0,18 \text{ g}_{\text{Butanol}}/\text{g}_{\text{Az}}$  y  $0,27 \text{ g}_{\text{IBE}}/\text{g}_{\text{Az}}$ ,  $0,15 \text{ g}_{\text{Butanol}}/\text{Lh}$  y  $0,23 \text{ g}_{\text{IBE}}/\text{Lh}$  respectivamente, mientras que en el control fueron de  $0,17 \text{ g}_{\text{Butanol}}/\text{g}_{\text{Az}}$ ,  $0,26 \text{ g}_{\text{IBE}}/\text{g}_{\text{Az}}$ ,  $0,14 \text{ g}_{\text{Butanol}}/\text{Lh}$  y  $0,21 \text{ g}_{\text{IBE}}/\text{Lh}$ .

En cuanto a la producción de solventes, el ensayo en que se sustituyeron complejo polivitamínico B y extracto de levadura obtuvo una concentración de butanol de 7,1 g/L y una concentración de IBE de 12,1 g/L, frente a concentraciones de 6,7 g/L de butanol y 11,2 g/L de IBE del control.

Resultado similares fueron obtenidos por Maddipati et al. (2011) quienes estudiaron la viabilidad de reemplazar el extracto de levadura por CSL en la fermentación etanólica syngas utilizando *Clostridium ragsdalei*. Este grupo obtuvo aproximadamente un 32% más de etanol (1,7 g/L) cuando suplementó el medio con 20 g/L de CSL, en comparación con el medio suplementado con 1 g/L de YE después de 360 h.

Con la finalidad de mejorar la competitividad económica del proceso de fermentación ABE, Parekh et al. (1999) realizaron ensayos utilizando un medio medio glucosa/CSL a escala piloto para la producción de solventes. Compararon la producción de butanol por la cepa *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 y la mutante hiperproductora de solventes *Clostridium beijerinckii* BA101. En una fermentación con 5% de glucosa/CSL, utilizando *C. beijerinckii* 8052 este grupo obtuvo una concentración final de 8,5 g/L de butanol y 5 g/L de acetona, mientras que utilizando *C. beijerinckii* BA101 obtuvo una concentración final de 16 g/L de butanol y 7,5 g/L de acetona.

Por lo tanto, se concluyó que tanto las vitaminas (complejo polivitamínico B Dispert®) como el extracto de levadura, pueden ser sustituidos por CSL, siendo necesarios el agregado de buffer y minerales P2.

#### 4.4 Evaluación de la concentración de azúcares iniciales del medio de fermentación

Se evaluó el efecto de la concentración inicial de azúcares en la fermentación IBE. En la **Tabla 7** se presentan los parámetros obtenidos de la fermentación, y en las **Figuras 15** y **16** se presentan los perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes.

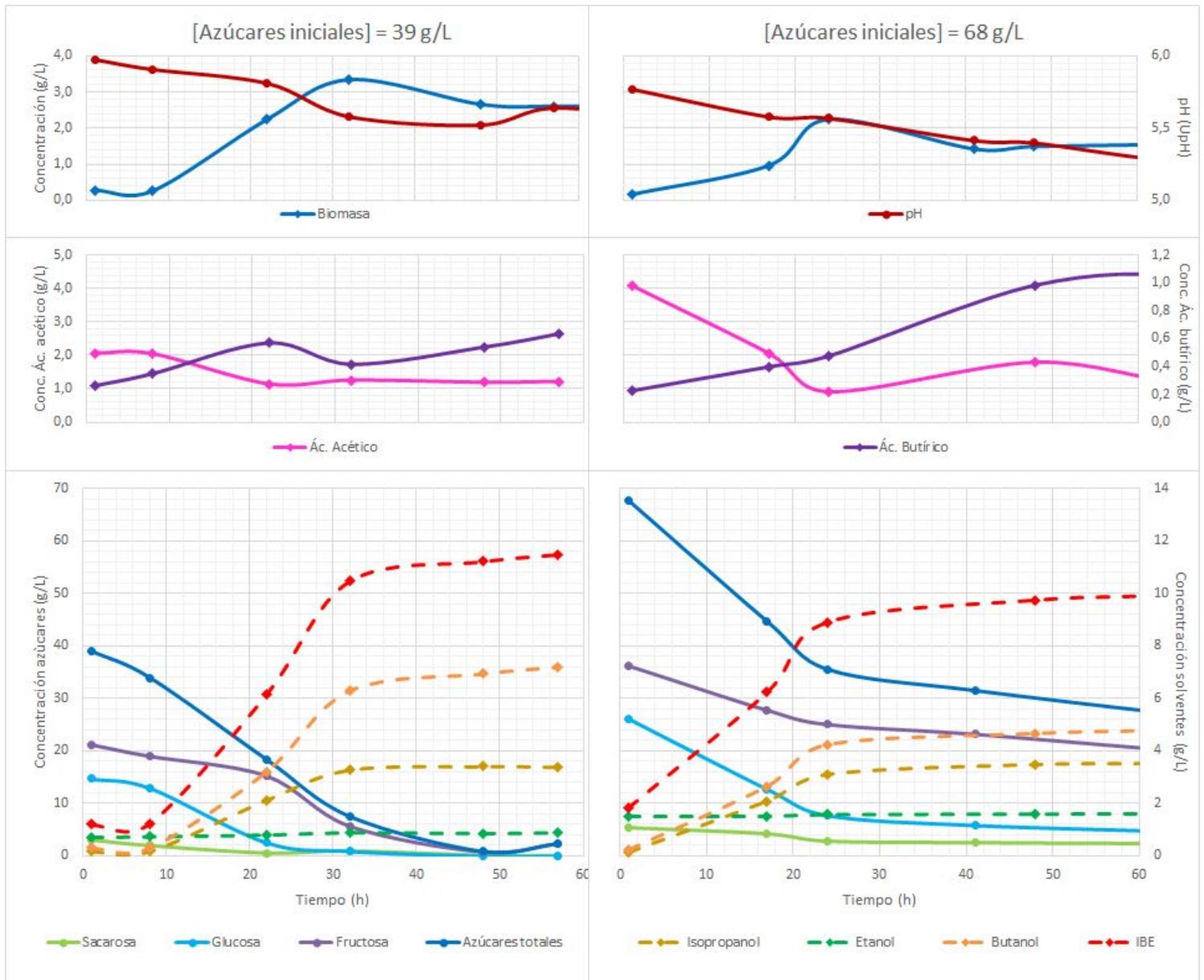
**Tabla 7** - Parámetros determinados del ensayo de fermentación de *C. beijerinckii* DSM 6423 con diferentes concentraciones iniciales de azúcares.

Parámetro	Unidad	Concentración de azúcares iniciales (g/L)			
		39	68	89	113
Azúcares iniciales	g/L	39 ± 3	68 ± 2	89 ± 3	113 ± 2
Tiempo	h	48	41	41	41
Sacarosa	g/L	0,1 ± 0,2	2,5 ± 1,1	5,1 ± 1,6	4,2 ± 0,2
Glucosa	g/L	0,0 ± 0,0	5,8 ± 0,1	12,7 ± 2,0	19,0 ± 3,9
Fructosa	g/L	0,8 ± 0,1	23,2 ± 0,3	32,5 ± 1,9	41,9 ± 4,6
Azúcares totales <sup>1</sup>	g/L	0,9 ± 0,1	31,6 ± 0,4	50,3 ± 2,9	65,1 ± 8,6
Acetona	g/L	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,40 ± 0,03	0,38 ± 0,09
Isopropanol	g/L	3,4 ± 0,3	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	4,0 ± 0,5
Etanol	g/L	0,86 ± 0,05	1,60 ± 0,05	1,97 ± 0,02	2,32 ± 0,14
Butanol	g/L	6,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	4,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,6 <sup>a</sup>
Solventes totales	g/L	11,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	9,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	10,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	11,1 ± 1,1 <sup>a</sup>
Ácido acético	g/L	1,19 ± 0,03	1,78 ± 1,02	1,84 ± 0,42	2,51 ± 0,86
Ácido butírico	g/L	0,54 ± 0,08	0,98 ± 0,16	0,54 ± 0,09	0,59 ± 0,09
Rendimiento Butanol <sup>2</sup>	$g_{\text{Butanol}} / g_{\text{Az}}$	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>
Rendimiento Solvente total <sup>3</sup>	$g_{\text{IBE}} / g_{\text{Az}}$	0,26 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>a</sup>
Productividad Butanol <sup>4</sup>	g/Lh	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>
Productividad Solvente total <sup>5</sup>	g/Lh	0,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>ab</sup>
Biomasa	g/L	2,66 ± 0,16 <sup>b</sup>	1,42 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,50 ± 0,11 <sup>a</sup>
Conversión azúcares <sup>6</sup>	%	98 ± 0	53 ± 3	44 ± 2	43 ± 7
Azúcares consumidos	g/L	39 ± 3 <sup>ab</sup>	36 ± 3 <sup>a</sup>	39 ± 3 <sup>ab</sup>	48 ± 7 <sup>b</sup>

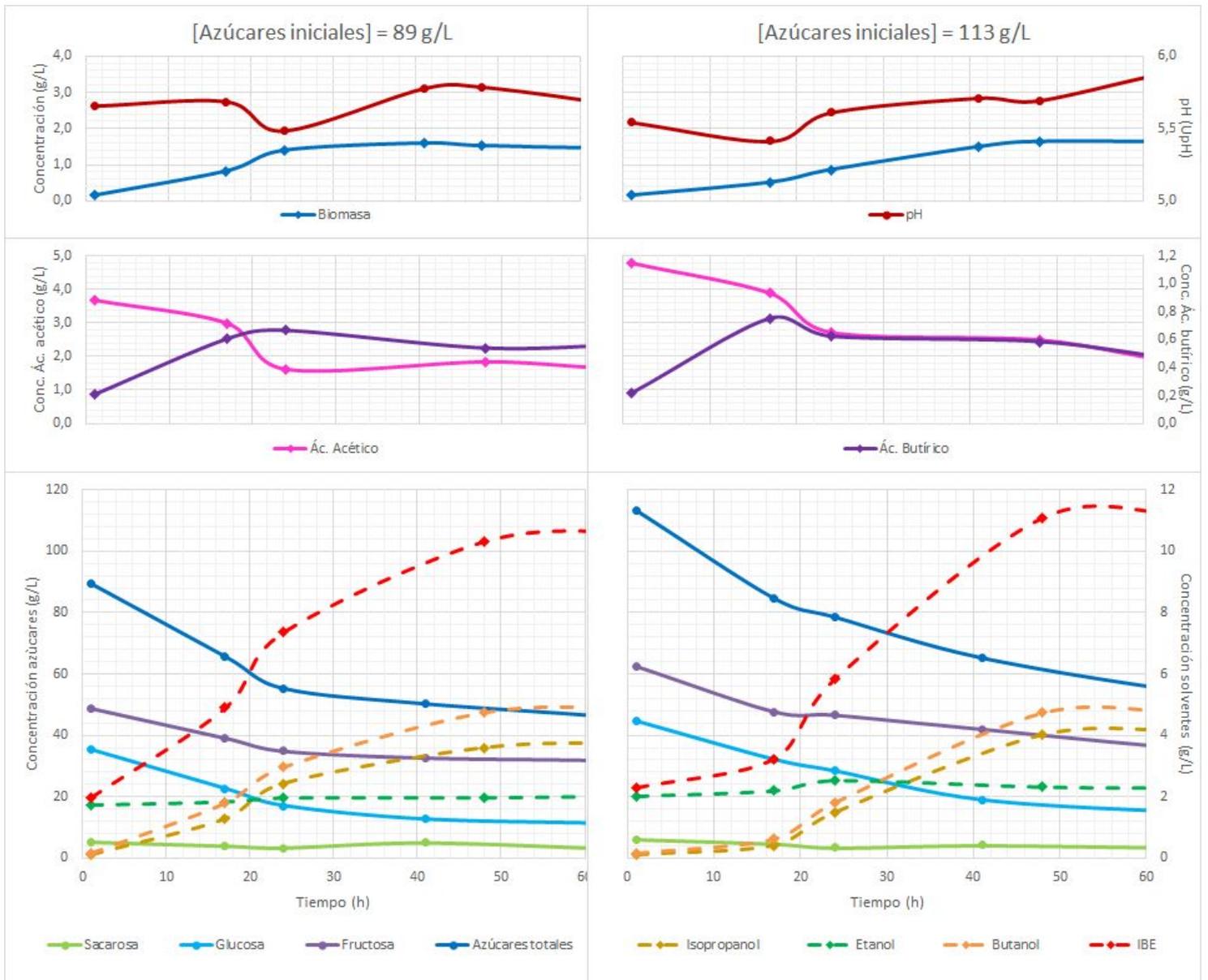
<sup>1, 2, 3, 4, 5 y 6</sup> Determinados según las ecuaciones 1 a 6 respectivamente (Punto 3.5 Cálculos).

$g_{\text{Az}}$ : gramos de azúcares totales definidos como equivalentes de glucosa (Punto 3.5 Cálculos eq. 1).

Parámetros en una misma fila cuyo superíndice presenta diferente letra, presentan diferencias significativas en cuanto al análisis de varianza (ANOVA) ( $p > 0,05$ ).



**Figura 15:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes. Concentración inicial de azúcares 39 y 68 g/L respectivamente.



**Figura 16:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes. Concentración inicial de azúcares 89 y 113 g/L respectivamente.

En estudios previos hallados en la bibliografía se propone que la concentración inicial de azúcares puede afectar la cinética de fermentación debido a la inhibición por sustrato. Se ha reportado que a concentraciones de azúcares menores a 60 g/L se observó una cinética rápida, mientras que concentraciones de azúcares mayores a 100 g/L se observó un enlentecimiento, observado en el aumento de la fase *lag* (Ezeji et al., 2003; Maddox et al., 1995; Qureshi y Blaschek, 1999, 2001).

En este trabajo se estudiaron concentraciones de azúcares iniciales de 39, 68, 89 y 113 g/L. Se observó que el consumo se enlenteció al aumentar la concentración inicial de sustrato, observándose una disminución en su conversión (de 98% a 43% para concentraciones de 39 y 113 g/L de azúcares iniciales respectivamente).

De manera análoga al consumo de azúcares, en las curvas de producción de solventes (**Figuras 15 y 16**) se observó que el tiempo aumentó con la concentración inicial de azúcares de 32 a 48 h para llegar a la concentración final.

La concentración final de butanol fue mayor ( $6,9 \pm 0,4$  g/L) cuando la concentración de azúcares iniciales fue de 39 g/L frente a ( $4,7 \pm 0,1$  g/L), ( $4,7 \pm 0,0$  g/L) y ( $4,7 \pm 0,6$  g/L) g/L cuando las concentraciones iniciales de azúcares fueron de 68, 89 y 113 g/L respectivamente. Sin embargo, la concentración de IBE total fue comparable en todos los casos. Lo mismo ocurrió con la productividad de butanol ( $0,14 \pm 0,01$  g/Lh), la cual fue mayor al resto de las condiciones cuando la concentración inicial de azúcares fue de 39 g/L frente a ( $0,09 \pm 0,00$  g/Lh), ( $0,10 \pm 0,00$  g/Lh) y ( $0,10 \pm 0,01$  g/Lh) cuando las concentraciones iniciales de azúcares fueron de 68, 89 y 113 g/L. Sin embargo, la productividad de IBE fue comparable cuando la concentración inicial de azúcares fue de 39, 89 y 113 g/L.

En cuanto al rendimiento, tanto de butanol como de IBE, se pudo apreciar que los mismos fueron comparables en todas las condiciones ensayadas.

Se observó además un pico en el cromatograma a tiempo 48 h (*resultado no mostrado*), cuyo tiempo de retención coincide con el tiempo de la fructosa en el HPLC. Se sospecha la presencia de otro compuesto distinto de la fructosa no identificado. Sin embargo, Witjitra et al. (1996) encontraron que células de *Clostridium thermoaceticum* también produjeron un producto intermediario a tiempos avanzados de la fermentación, cuando hubo un exceso de fuente de carbono y déficit de nutrientes. El producto intermediario aparecía en un pico del cromatograma de HPLC que correspondía con el tiempo de retención de fructosa, piruvato y xilosa. Lo identificaron como fructosa mediante cromatografía iónica.

De esta experiencia en particular se puede concluir que la mejor condición en lo que se refiere a la concentración inicial de sustrato, y cuando el fin es la obtención de IBE es cuando la concentración inicial de azúcares de de 39 g/L, ya que posee la mejor conversión de azúcares, la mejor cinética (dado que se llega a la concentración final de solventes en menor tiempo) y la mayor concentración final de butanol.

## 4.5 Evaluación de la concentración de CSL del medio de fermentación

Se estudiaron distintas concentraciones de licor macerado de maíz (CSL) como sustituyente de vitaminas y extracto de levadura, con el fin de disminuir el costo del medio de cultivo en la fermentación IBE. En la **Tabla 8** se presentan los parámetros obtenidos de la fermentación a las 48 horas, y en las **Figuras 17 a 21** se presentan los perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes.

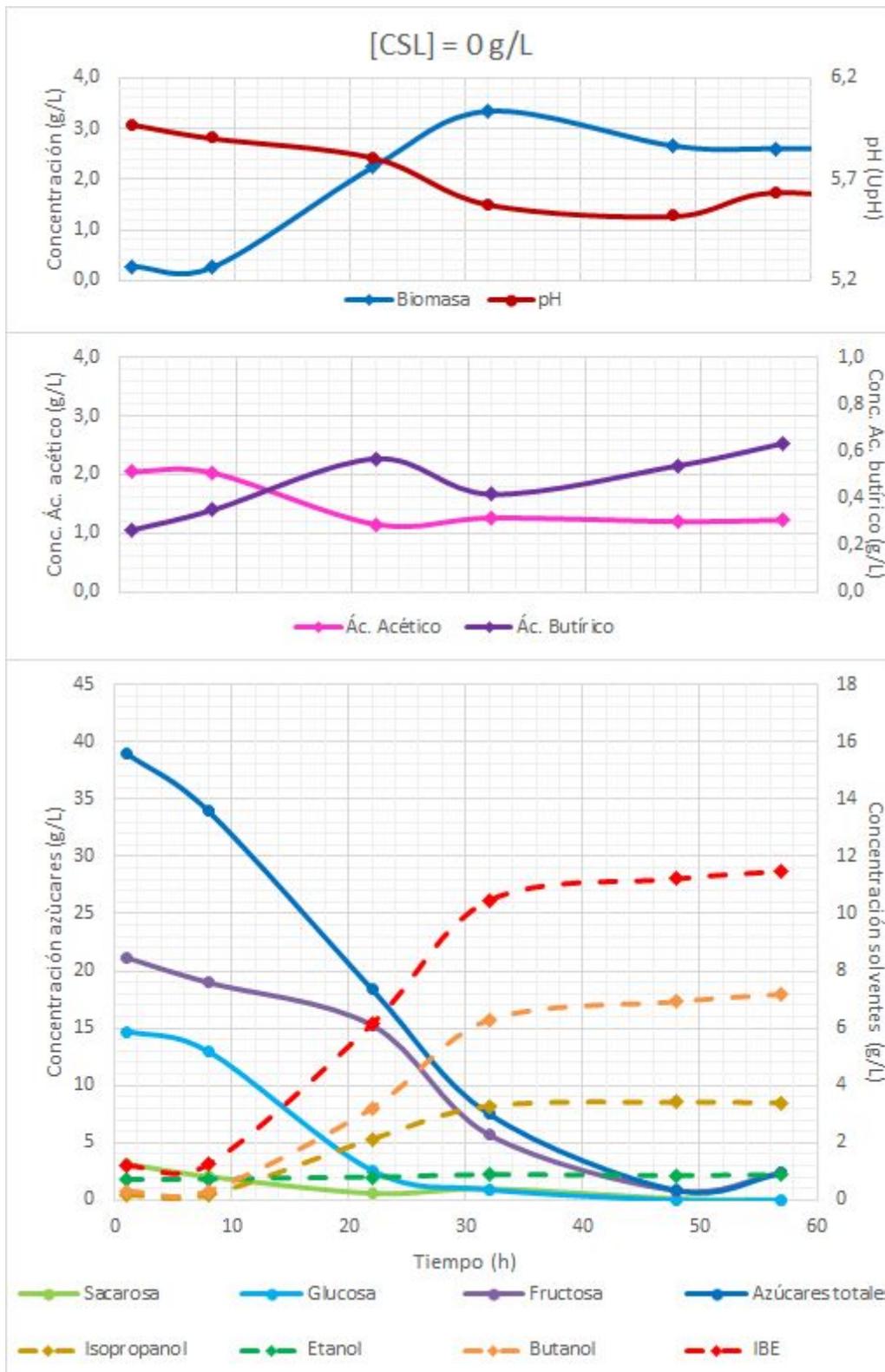
**Tabla 8** - Parámetros determinados del ensayo de fermentación de *C. beijerinckii* DSM 6423: evaluación de la concentración necesaria de CSL.

Parámetro	Unidad	Concentración de licor macerado de maíz (g/L)				
		0	5	10	15	20
Azúcares iniciales	g/L	39 ± 3	40 ± 4	34 ± 0	38 ± 4	41 ± 1
Sacarosa	g/L	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
Glucosa	g/L	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Fructosa	g/L	0,8 ± 0,1	2,9 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1
Azúcares totales <sup>1</sup>	g/L	0,9 ± 0,1	2,9 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,8 ± 0,2	0,5 ± 0,1
Acetona	g/L	0,15 ± 0,01	0,30 ± 0,05	0,28 ± 0,00	0,26 ± 0,06	0,16 ± 0,03
Isopropanol	g/L	3,4 ± 0,3	5,3 ± 0,5	4,9 ± 0,3	5,1 ± 0,5	3,8 ± 0,1
Etanol	g/L	0,86 ± 0,05	1,12 ± 0,12	1,10 ± 0,14	1,12 ± 0,12	0,87 ± 0,02
Butanol	g/L	6,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,5 <sup>a</sup>
Solventes totales	g/L	11,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	14,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	13,6 ± 0,9 <sup>ab</sup>	14,2 ± 1,5 <sup>b</sup>	12,1 ± 0,4 <sup>ab</sup>
Ácido acético	g/L	1,19 ± 0,03	1,16 ± 0,16	1,09 ± 0,07	1,15 ± 0,01	1,24 ± 0,04
Ácido butírico	g/L	0,54 ± 0,08	0,41 ± 0,06	0,29 ± 0,03	0,53 ± 0,15	0,59 ± 0,05
Rendimiento Butanol <sup>2</sup>	g <sub>Butanol</sub> / g <sub>Az</sub>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>
Rendimiento Solvente total <sup>3</sup>	g <sub>IBE</sub> / g <sub>Az</sub>	0,26 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>a</sup>
Productividad Butanol <sup>4</sup>	g/Lh	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>
Productividad Solvente total <sup>5</sup>	g/Lh	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,26 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>ab</sup>
Biomasa	g/L	2,66 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,00 ± 0,98 <sup>a</sup>	2,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,11 <sup>a</sup>
Conversión azúcares <sup>6</sup>	%	98 ± 0 <sup>b</sup>	93 ± 1 <sup>a</sup>	91 ± 2 <sup>a</sup>	91 ± 0 <sup>a</sup>	99 ± 0 <sup>b</sup>

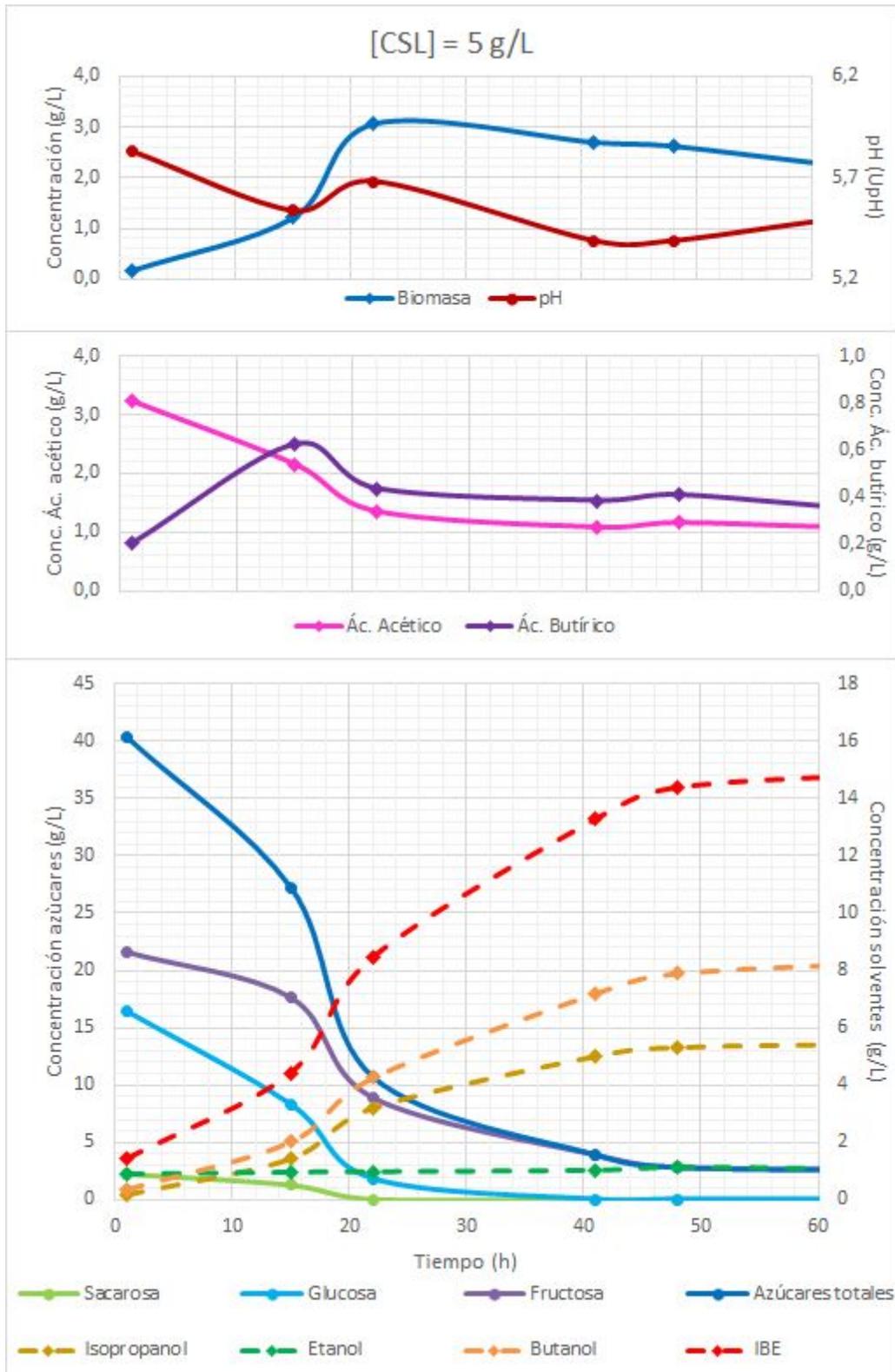
<sup>1, 2, 3, 4, 5 y 6</sup> Determinados según las ecuaciones 1 a 6 respectivamente (Punto 3.5 Cálculos).

g<sub>Az</sub>: gramos de azúcares totales definidos como equivalentes de glucosa (Punto 3.5 Cálculos eq. 1).

Parámetros en una misma fila cuyo superíndice presenta diferente letra, presentan diferencias significativas en cuanto al análisis de varianza (ANAVA) ( $p > 0,05$ ).



**Figura 17:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, sin agregado de CSL.



**Figura 18:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes; concentración de CSL 5 g/L.

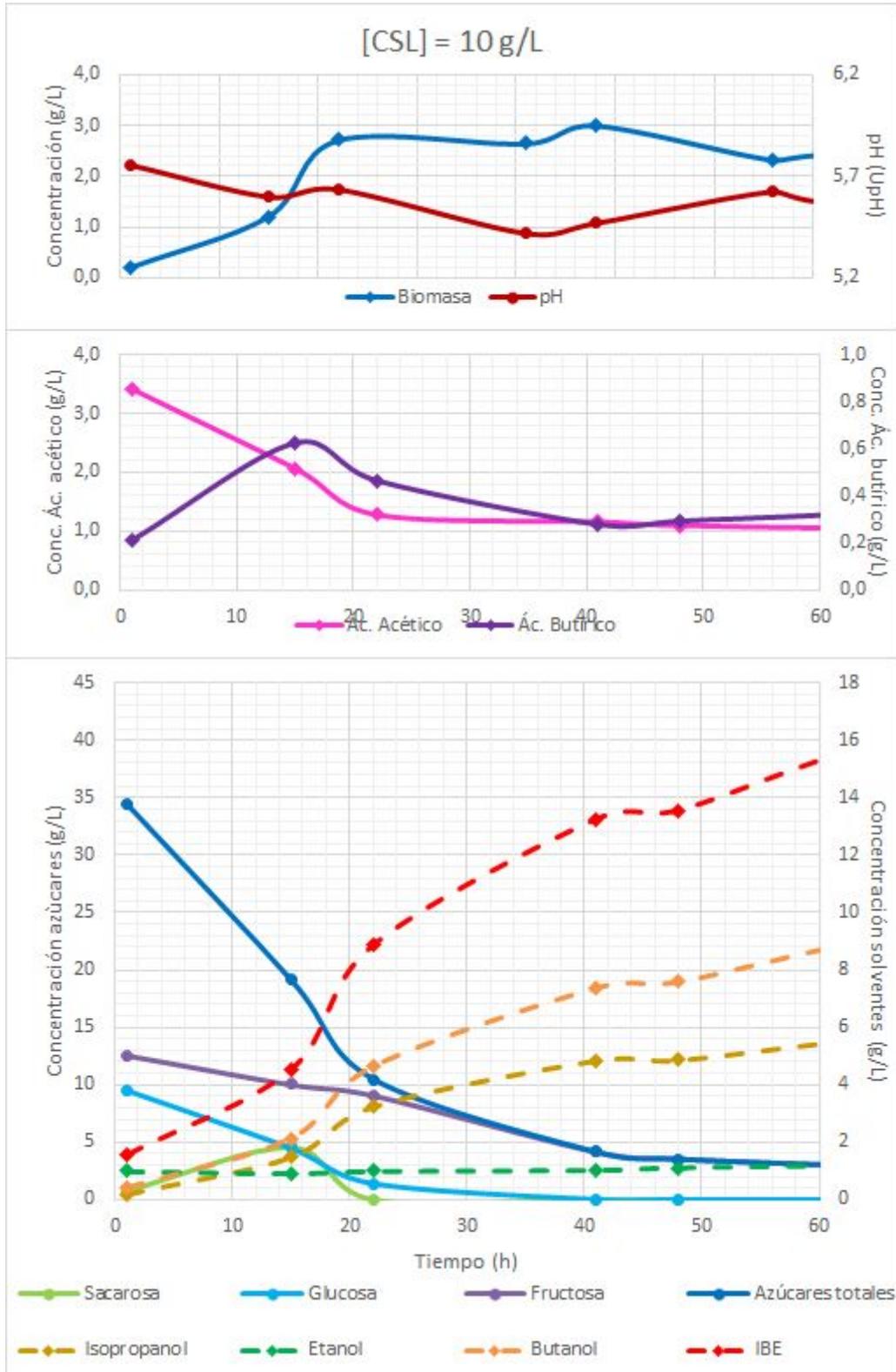
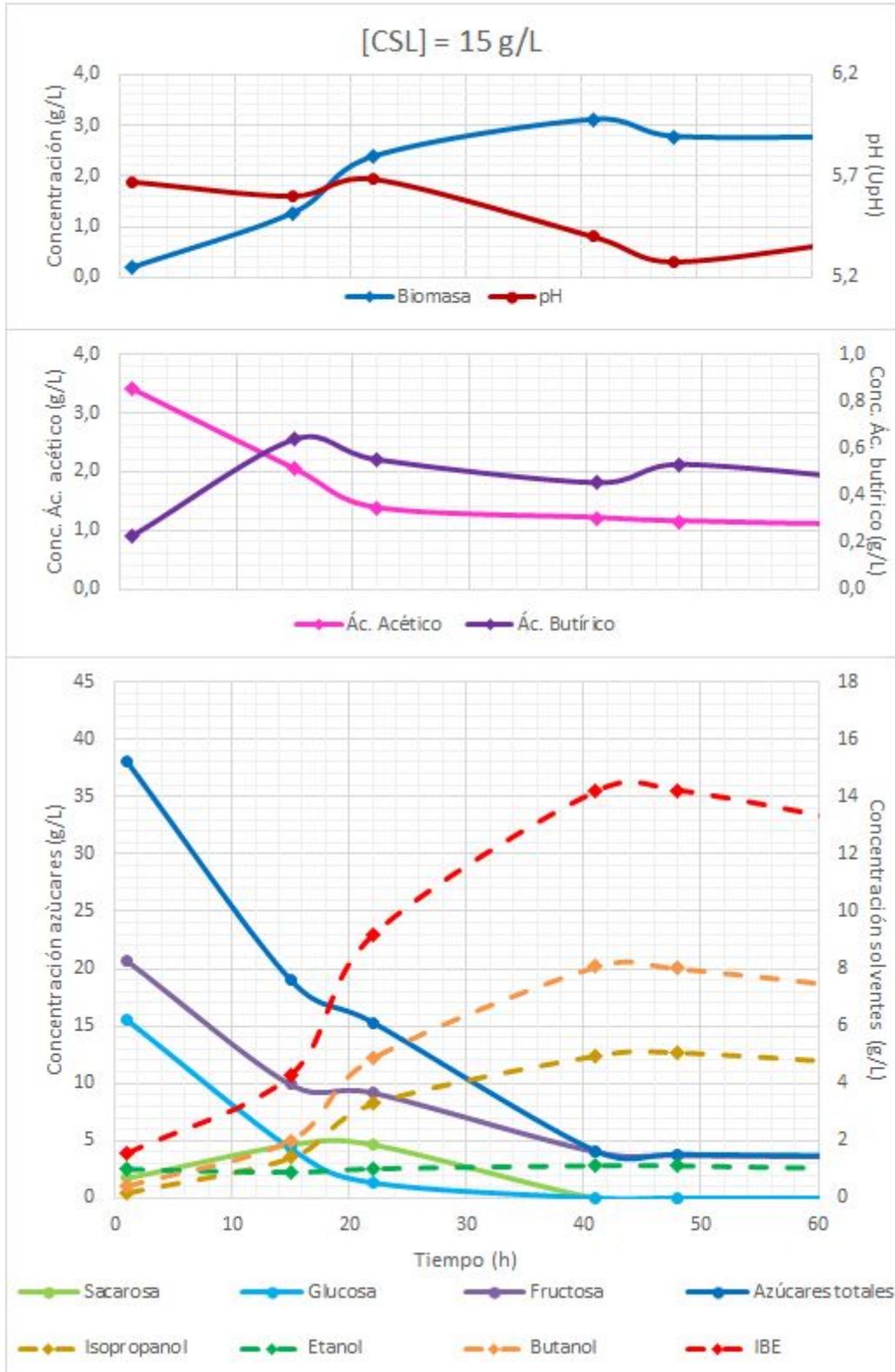
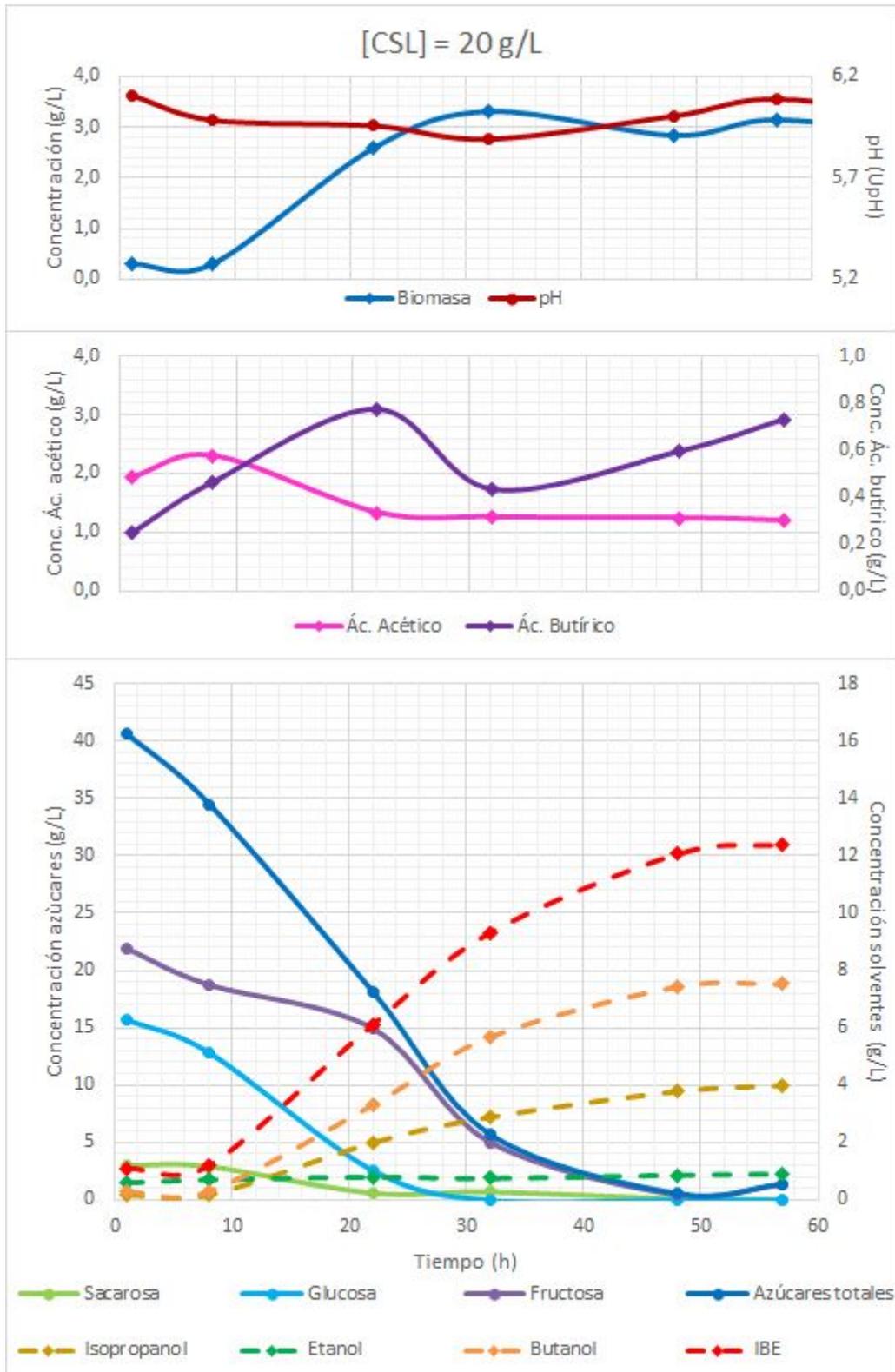


Figura 19: Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, concentración de CSL 10 g/L.



**Figura 20:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, concentración de CSL 15 g/L.



**Figura 21:** Perfiles de biomasa, pH, ácidos, azúcares y solventes, concentración de CSL 20 g/L.

En este ensayo, para evaluar el efecto de la concentración de CSL frente a la cinética del consumo de azúcares y la producción de solventes, se sustituyó tanto el complejo polivitamínico B Dispert® como el extracto de levadura por CSL, debido al resultado obtenido en el ensayo “Evaluación del agregado de CSL como nutriente al medio de fermentación” (punto 4.3).

De la **Tabla 8** y de las **Figuras 17** hasta **21** se puede apreciar que la cinética del consumo de azúcares así como de la producción de solventes está influenciada por la concentración del factor de crecimiento CSL.

En los perfiles del consumo de azúcares (**Figuras 17** hasta **21**) se observó que la velocidad media de consumo en las primeras 24 h fue menor a medida que aumentó la concentración de CSL. Adicionalmente se observó que en el ensayo control (sin agregado de CSL, al cual se le agrega complejo polivitamínico B Dispert® y extracto de levadura) el perfil del consumo de azúcar fue más lento que cuando se agrega CSL a cualquier concentración. Esto sugiere que el nutriente CSL es metabolizado más rápidamente que el complejo polivitamínico Dispert® y el extracto de levadura. Una concentración de CSL de 5 g/L fue necesaria y suficiente para obtener la mayor velocidad el consumo de azúcares dentro de las condiciones estudiadas.

La concentración de butanol fue comparable en todos los casos, en el rango de 6,9 a 8,0 g/L. Sin embargo, no así para el IBE, donde las mejores concentraciones finales del mismo se obtuvieron cuando las concentraciones de CSL fueron de 5 g/L y 15 g/L; estas fueron 14,4 y 14,2 g/L de IBE respectivamente.

Se pudo concluir que 5 g/L de CSL fueron suficientes para la producción de IBE, ya que es la menor concentración de las estudiadas y sus resultados fueron superiores a las de ensayo control y comparables con el resto de las concentraciones de CSL estudiadas.

# CONCLUSIONES

Mauricio Fabián  
Ávila Araujo



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

64



FACULTAD DE

INGENIERIA

Producción de Isopropanol-Butanol-Etanol como combustible utilizando  
*Clostridium beijerinckii* DSM 6423 a partir de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce

Mauricio Fabián Ávila Araujo

# 5 - Conclusiones

De los ensayos realizados en este trabajo, con una mezcla de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce, utilizando *Clostridium beijerinckii* DSM 6423, se puede concluir que:

- Cuando el butanol fue agregado externamente enlenteció el consumo de azúcares y la producción de solventes de la fermentación mediante un mecanismo de retroinhibición (inhibición por producto). Se encontró que la cepa fue capaz de crecer hasta cuando se agregó butanol a una concentración de 7,5 g/L . Si bien el crecimiento fue poco (así como la producción de solventes y conversión de azúcares), no se alcanzó la inhibición total del sistema. La concentración inhibitoria total será mayor a 7,5 g/L, la cual fue la máxima concentración de butanol estudiada.
- El ácido butírico agregado externamente no produjo una mejora en el consumo de azúcares y la producción de solventes de la fermentación en las condiciones estudiadas, en contraposición a lo reportado en la bibliografía. La mejor condición encontrada frente al agregado externo de ácido butírico, fue sin agregado del mismo.
- El CSL pudo sustituir tanto el complejo polivitamínico B Dispert® como el extracto de levadura, así como a ambos a la vez. Se encontró que 5 g/ de CSL fueron suficientes para obtener una buena producción de butanol e IBE con la cepa de *Clostridium beijerinckii* DSM 6423.
- La mejor concentración inicial de azúcares fue de 39 g/L, ya que en dicha condición se observó la mayor conversión de azúcares (98%) y la mejor cinética. Se obtuvo 6,9 g/L de butanol y 11,2 g/L de IBE en 48 h.

# BIBLIOGRAFÍA

Mauricio Fabián  
Ávila Araujo



FACULTAD DE  
CIENCIAS



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
INGENIERIA

66

Producción de Isopropanol-Butanol-Etanol como combustible utilizando  
*Clostridium beijerinckii* DSM 6423 a partir de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce  
Mauricio Fabián Ávila Araujo

# 6 - Bibliografía

ALUR. *Misión y visión*. (<http://www.alur.com.uy/empresa/que-es-ALUR.php> acceso 2018/09/19)

ALUR. *Biocombustibles*. (<http://www.alur.com.uy/productos/biocombustibles.php> acceso 2018/09/19)

Andersch, W., Bahl, H., Gottschalk, G. 1983. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 18;327–332.

Bahl, H., Müller, H., Behrens, S., Joseph, H., Narberhaus, F. 1995. Expression of heat shock genes in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Reviews* 17;341–348.

Balat, M., Balat, H. 2010. Progress in biodiesel processing. *Applied Energy* 87;1815-1835.

Balance Energético Nacional 2017. *Dirección Nacional de Energía, Ministerio de Industria Energía y Minería*. <http://www.ben.miem.gub.uy/index.html>, acceso: 2018/10/24

Bankar, S., Survase, S.A., Singhal, R.S., Granström, A. 2012. Continuous two stage acetone–butanol–ethanol fermentation with integrated solvent removal using *Clostridium acetobutylicum* B5313. *Bioresource Technology* 106;110–116.

Bankar, S., Survase, S.A., Ojamo, H., Granström, 2013. T. Biobutanol: the outlook of an academic and industrialist. *RSC Advances* 3;24734–24757.

Bharathiraja, B., Jayamuthunagai, J., Sudharsanaa, T., Bharghavi, A., Praveenkumar, R., Chakravarthy, M., Yuvaraja, D. 2017. Biobutanol – An impending biofuel for future: A review on upstream and downstream processing techniques. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 68;788-807.

Bittencourt, G., Reig, N. La industria de biocombustibles en Uruguay: situación actual y perspectivas. Facultad de Ciencias Sociales, UdelaR, Documentos de trabajo 2009.

Bowles, L. K., Ellefson W. L. 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 50;1165–1170.

British Petroleum. *Statistical Review of World Energy*. (<https://www.bp.com/content/dam/bp/en/corporate/pdf/energy-economics/statistical-review/bp-statistical-review-2018-full-report.pdf> acceso: 2018/09/19)

British Petroleum. *Oil Reserves*. (<https://www.bp.com/en/global/corporate/energy-economics/statistical-review-of-world-energy/oil-reserves.html> acceso: 2018/10/18)

Bryant, D.L., Blaschek, H.P. 1988. Buffering as a means for increasing growth and butanol production by *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 3;49-55.

Casas, J.M., Gea, F., Javaloyes, E., Martín, A., Pérez, J.A., Triguero, I., Vives, F., *Educación Medioambiental*, Editorial Club Universitario, 2007;165.

Chen, C.K., Blaschek, H.P. 1999. Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52;170–173.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

Dürre, P., Bahl, H. 1996. Microbial production of acetone/butanol/isopropanol. *Biotechnology* 6;229

Dürre, P., Kuhn, A., Gottwald, M., Gottschalk, G. 1987. Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26;268–272.

Dusséaux, S., Croux, C., Soucaille, P., Meynial-Salles, I. 2013. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol-butanol-ethanol mixture. *Metabolic Engineering* 18;1–8.

Ezeji, T.C., Qureshi, N., Blaschek, H.P. 2003. Production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in-situ recovery by gas stripping. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19;595-603.

Ezeji, T.C., Qureshi, N., Blaschek, H.P. 2004. Acetone–butanol-ethanol (ABE) production from concentrated substrate: Reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63;653–658.

Ezeji, T.C., Karcher, P.M., Qureshi, N., Blaschek, H.P. 2005. Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from *Clostridium beijerinckii* fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 27;207–214

Francis, A.J., Dodge, C.J., Lu, F., Halada, G.P., Clayton, C.R. 1994. XPS and XANES studies of uranium reduction by *Clostridium* sp. *Environmental Science and Technology* 28;636–639.

García, V., Pääkkilä, J., Ojamo, H., Muurinen, E., Keiski, R.L. 2011. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15;964–980.

George, H.A., Johnson, J.L., Moore, W.E., Holdeman, L.V., Chen, J.S. 1983. Acetone, isopropanol, and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Applied and Environmental Microbiology* 45;1160–3.

Girbal, L., Soucaille, P. 1998. Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. *Trends in Biotechnology* 16;11-16.

Harris, L.M., Welker, N.E., Papoutsakis, E.T. 2002. Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *Journal of Bacteriology* 184;3586-3597.

Hartmanis, M.G., Gatenbeck, S. 1984. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47;1277–1283.

Humbird, D., Davis, R., Tao, L., Kinchin, C., Hsu, D., Aden, A. Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover en *Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol*. Technical Report NREL/TP-5100 e 47764, 2011. Disponible on line, <http://www.osti.gov/bridge>.

Ismail, A.A., Zhu, C.X., Colby, G.D., Chen, J.S. 1993. Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. *Journal of Bacteriology* 175;5097–5105.

Jones, D.T., Woods, D.R. 1986. Acetone–butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews* 50;484–524.

Karlsson, J.L., Volcani, B.E., Barker, H.A. 1948. The nutritional requirements of *Clostridium aceticum*. *Journal of Bacteriology* 56;781-782.

Kim, B.H., Bellows, P., Datta, R., Zeikus, J.G. 1984. Control of carbon and electron flow in *C. acetobutylicum* fermentations: Utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields. *Applied and Environmental Microbiology* 48;764–770.

Kim, J., Bajpai, R., Iannotti, E. 1988. Redox potential in acetone–butanol fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 18;175–186.

Kumar, M., Gayen, K. 2011. Developments in biobutanol production: new insights. *Applied Energy* 88;1999–2012.

Lepage, C., Fayolle, F., Hermann, M., Vandecasteele, J.P. 1987. Changes in membrane lipid composition of *Clostridium acetobutylicum* during acetone-butanol fermentation: effects of solvents, growth temperature and pH. *Journal of general microbiology* 133;103–110

Larnaudie, V., Rochón, E., Ferrari, M.D., Lareo, C. 2016. Energy evaluation of fuel bioethanol production from sweet sorghum using very high gravity (VHG) conditions. *Renewable Energy* 88;280-287.

Lee, J., Jang, Y.S., Choi, S.J., Im, J.A., Song, H., Cho, J.H., Seung do, Y., Papoutsakis, E.T., Bennett, G.N., Lee, S.Y. 2012. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for isopropanol–butanol ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 78;1416–23.

Lehmann, D., Lütke-Eversloh, T. 2011. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metabolic Engineering* 13;464-73.

López-Contreras, A.M., Kuit, W., Springer, J., Claassen, P. 2012. Novel Strategies for Production of Medium and High Chain Length Alcohols. *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*. En P.C. Hallenbeck (ed.), *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production* 11;183-211.

Maddipati, P., Atiyeh, H.K., Bellmer, D.D., Huhnke, R.L. 2011. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresource Technology* 102;6494–6501.

Maddox, I.S., Qureshi, N., Roberts-Thomson, K. 1995. Production of acetone butanol ethanol from concentrated substrates using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process. *Process Biochemistry* 30;209-215.

Madihah, M.S., Ariff, A.B., Sahaid, K.M., Suraini, A.A., Karim, M.I.A. 2001. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17;567–576.

Meadows, D.H., Meadows, D.L., Randers, J., Behrens, W.W. *The limits to growth: a report for the club of Rome's project on the predicament of mankind*. Universe Books, New York, EUA, 1972;23-24.

Mitchell, W.J. 1998. Physiology of carbohydrates to solvent conversion by clostridia. *Advances in Microbial Physiology* 39;31–130.

Monot, F., Martin, J.R., Petitdemange, H., Gay, R. 1982. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Applied and Environmental Microbiology* 44;1318–1324.

Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. 2008. Roma.

Paredes, C.J., Alsaker, K.V., Papoutsakis, E.T. 2005. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews* 3;969–978.

Parekh, M., Formanek, J., Blaschek, H.P. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water. 1999. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51;152-157

Portal de información y negocios para la industria del petróleo gas y minería. *La importancia de las energías alternativas* (<https://www.petrolnews.net/noticia.php?ID=qjcpbonl&r=13257> acceso 2018/09/19)

Qureshi, N., Blaschek, H.P. 1999. Production of acetone butanol ethanol (ABE) by a hyper-producing mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and recovery by pervaporation. *Biotechnology Progress* 15;594-602.

Qureshi, N., Blaschek, H.P. 2001. Recent advances in ABE fermentation: hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27;287-291.

Renovables verdes. *Energía biocombustible ¿qué es y cuáles son sus ventajas?* (<https://www.renovablesverdes.com/origenes-e-historia-de-los-biocombustibles/> acceso 2018/09/19)

Rochón, E., Ferrari, M.D., Lareo, C. 2017. Integrated ABE fermentation-gas stripping process for enhanced butanol production from sugarcane-sweet sorghum juices. *Biomass and Bioenergy* 98;153-160

Rogers, P. 1986. Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. *Advances in Applied Microbiology* 31;1–60.

Scotcher, M.C., Rudolph, F.B., Bennett, G.N. 2005. Expression of *abrB310* and *sinR*, and effects of decreased *abrB310* expression on the transition from acidogenesis to solventogenesis, in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology* 71;1987–1995.

Soucaille, P., Figge, R., Croux, C. 2006. Process for chromosomal integration and DNA sequence replacement in Clostridia. Patent WO2006EP66997 20061003.

Spain, J.C. 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annual Review of Microbiology* 49;523–555.

Sullivan, L., Bennett, G.N. 2006. Proteome analysis and comparison of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and SpoOA strain variants. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 33;298–308.

Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., Yoshino, S. 2004. High Butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in Fed-Batch Culture with pH-Stat Continuous Butyric Acid and Glucose Feeding Method. *Journal of bioscience and bioengineering* 98;263–268.

Thormann, K., Feustel, L., Lorenz, K., Nakotte, S., Dürre, P. 2002. Control of butanol formation in *Clostridium acetobutylicum* by transcriptional activation. *Journal of Bacteriology* 184;1966–1973.

Vollherbst-Schneck, K., Sands, J.A., Montenecourt, B.S. 1984. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology* 47;193–194.

Wang, J., Yang, X., Chen, C.C., Yang, S.T. 2014. Engineering clostridia for butanol production from biorenewable resources: from cells to process integration. *Current Opinion in Chemical Engineering* 6:43–54.

Wang, Y., Xiangzhen, L., Blaschek, H. 2013. Effects of supplementary butyrate on butanol production and the metabolic switch in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052: genome-wide transcriptional analysis with RNA-Seq. *Biotechnology for Biofuels* 6:138-151

Wang, Y., Ho, S.H., Yen, H.W., Nagarajan, D., Ren, N.Q., Li, S., Hu, Z., Lee, D.J., Kondo, A., Chang, J.S. 2017. Current advances on fermentative biobutanol production using third generation feedstock. *Biotechnology Advances* 35;1049-1059

Wilkinson, S., Young, M. 1995. Physical Map of the *Clostridium beijerinckii* (Formerly *Clostridium acetobutylicum*) NCIMB 8052 Chromosome. *Journal of bacteriology* 177;439-448

Witjitra, K., Shah, M.M., Cheryan, M. 1996. Effect of nutrient sources on growth and acetate production by *Clostridium thermoaceticum*. *Enzyme and Microbial Technology* 19;322-327

Woods, D.R. 1995. The genetic engineering of microbial solvent production. *Trends in Biotechnology*. 13;259-264

Xue, C., Zhao, J., Chen, L., Yang, S.T., Bai, F. 2017. Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Advances* 35;310-322

Yu, M., Zhang, Y., Tang, I.C., Yang, S.T. 2011. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production. *Metabolic Engineering* 13;373-82.

# ANEXO

Mauricio Fabián  
Ávila Araujo



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

73



FACULTAD DE

INGENIERIA

Producción de Isopropanol-Butanol-Etanol como combustible utilizando  
*Clostridium beijerinckii* DSM 6423 a partir de jugos industriales de caña de azúcar y sorgo dulce

Mauricio Fabián Ávila Araujo

# 7 - Anexo

## 7.1 Composición soluciones stock

### Buffer P2

- $K_2HPO_4$  50 g/L
- $KH_2PO_4$  50 g/L
- Acetato de amonio 220 g/L

### Minerales P2

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  20 g/L
- $MnSO_4 \cdot H_2O$  1 g/L
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g/L
- NaCl 1 g/L.

### Vitaminas P2

- Ácido p-aminobenzoico 0,1 g/L
- Biotina 0,001 g/L
- Tiamina 0,1 g/L

### Complejo polivitamínico comercial Dispert®

- Tiamina mononitrato 0,12 g/L
- Riboflavina 0,020 g/L
- Clorhidrato de piridoxina 0,020 g/L
- Pantotenato cálcico 0,061 g/L
- Niacinamida 0,61 g/L
- Excipientes c.s.

**Tabla 9:** Composición de jugo concentrado de caña de azúcar y sorgo dulce.

Compuesto	Unidad	Valor
Sacarosa	%	75
Glucosa	%	5
Fructosa	%	3
Etanol	%	0,69
Ácido acético	%	0,11
Ácido butírico	%	0,34
Ácido succínico	%	0,15
Ácido cis-aconítico	%	0,13
Ácido trans-aconítico	%	1,05
Furfural	%	nd
5-Hidroximetilfurfural	%	nd
Fósforo	%	<0,5
Nitrógeno (Kjeldahl)	%	0,31
Aluminio	%	<0,002
Calcio	%	0,18
Cobre	%	<0,0005
Hierro	%	0,0047
Magnesio	%	0,11
Manganeso	%	0,0012
Potasio	%	0,76
Sodio	%	0,04
Cinc	%	<0,0005
Cenizas	%	2,5
Humedad	%	32
Densidad (20 °C)	kg/m <sup>3</sup>	1330

% Porcentaje en peso seco (exceptuando humedad)

ND: No Detectado (límite de detección: 0,003%). (Rochon et al., 2017)

## 7.2 Curva de calibración para la determinación de la biomasa

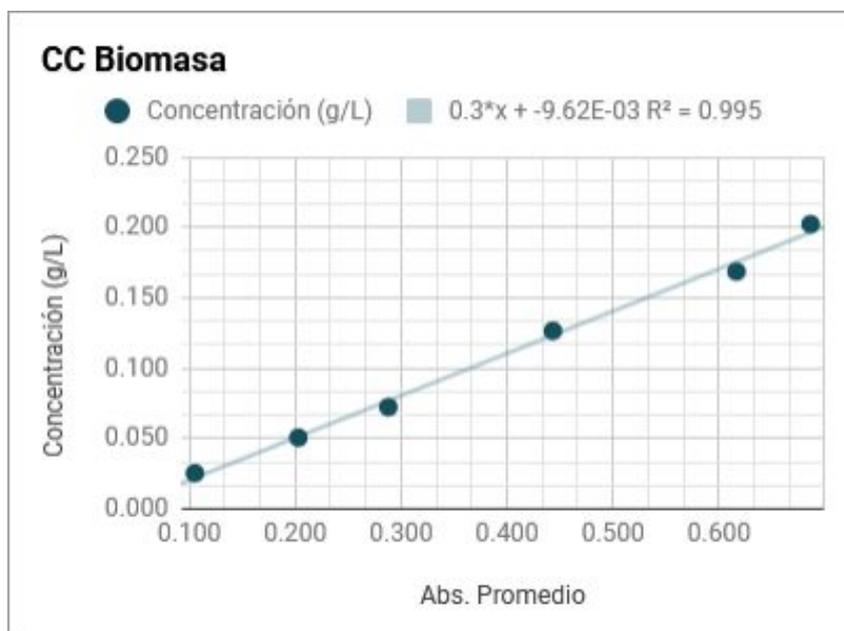
Se realizó un cultivo de *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 en botellas de 250 mL conteniendo 100 mL de medio compuesto por la mezcla de jugos industriales (75% caña, 25% sorgo dulce) a pH inicial 6, 150 rpm en agitador orbital.

El medio tuvo una concentración de azúcares totales de aproximadamente 60 g/L y temperatura 35°C.

Se determinó la absorbancia a 600 nm y el peso seco de un volumen conocido de distintas diluciones del cultivo. Como blanco se utilizó el medio de fermentación sin biomasa, el cual se logró mediante precipitación con ácido sulfosalicílico (10 µL cada 4 mL de muestra) y centrifugación durante 10 min a 6500 rpm y 4 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado.

**Tabla 10:** Relación entre turbidez (expresada como unidades de absorbancia -UA-) con la concentración de la biomasa (en g/L).

Curva de calibración	
Turbidez (UA)	Concentración (g/L)
0,105	0,025
0,203	0,051
0,288	0,072
0,443	0,126
0,617	0,169
0,687	0,202



**Figura 22:** Curva de calibración que relaciona la turbidez con la la biomasa.

## 7.3 Resultados del análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el software InfoStat, versión 2017. (Di Rienzo et al., 2017 Disponible en <http://www.infostat.com.ar>)

### 7.3.1 Evaluación de la toxicidad de la cepa frente a butanol

#### Análisis de la varianza (ANAVA)

##### BuOH Producido

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
BuOH Prod	10	0,98	0,96	15,35

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	51,57	4	12,89	52,94	0,0003
[BuOH]i	51,57	4	12,89	52,94	0,0003
Error	1,22	5	0,24		
Total	52,79	9			

##### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,97963

Error: 0,2435 gl: 5

[BuOH]i	Medias	n	E.E.	
Antiesp	0,00	2	0,35	A
8,0	1,48	2	0,35	A
6,0	3,57	2	0,35	B
4,0	4,58	2	0,35	B C
0,0	6,45	2	0,35	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

##### IBE Producido

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
IBE Prod	10	0,97	0,94	15,88

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	91,07	4	22,77	37,26	0,0006
[BuOH]i	91,07	4	22,77	37,26	0,0006
Error	3,06	5	0,61		
Total	94,13	9			

##### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,13568

Error: 0,6110 gl: 5

[BuOH]i	Medias	n	E.E.	
Antiesp	0,00	2	0,55	A
8,0	3,03	2	0,55	A
6,0	6,25	2	0,55	B
4,0	6,98	2	0,55	B
0,0	8,35	2	0,55	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Yp/S BuOH

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Yp/S BuOH	10	0,91	0,84	22,76

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,05	4	0,01	13,03	0,0074
[BuOH]i	0,05	4	0,01	13,03	0,0074
Error	4,6E-03	5	9,1E-04		
Total	0,05	9			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,12132

Error: 0,0009 gl: 5

[BuOH]i	Medias	n	E.E.
Antiesp	0,02	2	0,02 A
8,0	0,09	2	0,02 A B
6,0	0,17	2	0,02 B
4,0	0,18	2	0,02 B
0,0	0,20	2	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Y p/S IBE

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Y p/S IBE	10	0,90	0,83	20,84

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,09	4	0,02	11,66	0,0095
[BuOH]i	0,09	4	0,02	11,66	0,0095
Error	0,01	5	2,0E-03		
Total	0,10	9			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17816

Error: 0,0020 gl: 5

[BuOH]i	Medias	n	E.E.
Antiesp	0,03	2	0,03 A
8,0	0,20	2	0,03 A B
0,0	0,27	2	0,03 B
4,0	0,28	2	0,03 B
6,0	0,29	2	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Q BuOH

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Q BuOH	10	0,98	0,96	15,57

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	4	0,01	52,11	0,0003
[BuOH]i	0,02	4	0,01	52,11	0,0003
Error	5,4E-04	5	1,1E-04		
Total	0,02	9			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04173

Error: 0,0001 gl: 5

[BuOH]i	Medias	n	E.E.	
Antiesp	-1,0E-03	2	0,01	A
8,0	0,03	2	0,01	A
6,0	0,07	2	0,01	B
4,0	0,10	2	0,01	B C
0,0	0,13	2	0,01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Q IBE

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Q IBE	10	0,97	0,94	15,90

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,04	4	0,01	37,23	0,0007
(BuOH)i	0,04	4	0,01	37,23	0,0007
Error	1,3E-03	5	2,7E-04		
Total	0,04	9			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06539

Error: 0,0003 gl: 5

[BuOH]i	Medias	n	E.E.	
Antiesp	0,00	2	0,01	A
8,0	0,06	2	0,01	A
6,0	0,13	2	0,01	B
4,0	0,15	2	0,01	B
0,0	0,17	2	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Biomasa (g/L)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Biomasa (g/L)	10	0,98	0,97	12,88

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9,06	4	2,27	75,19	0,0001
[BuOH]i	9,06	4	2,27	75,19	0,0001
Error	0,15	5	0,03		
Total	9,22	9			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,69643**

Error: 0,0301 gl: 5

[BuOH]i	Medias	n	E.E.	
Antiesp	0,29	2	0,12	A
8,0	0,55	2	0,12	A
6,0	0,96	2	0,12	A
4,0	2,27	2	0,12	B
0,0	2,68	2	0,12	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***XS(%)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
XS(%)	10	0,99	0,99	7,58

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5194,40	4	1298,60	154,94	<0,0001
[BuOH]i	5194,40	4	1298,60	154,94	<0,0001
Error	41,91	5	8,38		
Total	5236,31	9			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11,61339**

Error: 8,3811 gl: 5

[BuOH]i	Medias	n	E.E.	
Antiesp	0,00	2	2,05	A
8,0	28,98	2	2,05	B
6,0	43,35	2	2,05	C
4,0	51,20	2	2,05	C
0,0	67,49	2	2,05	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

### 7.3.2 Evaluación del agregado de ácido butírico como precursor

#### **Análisis de la varianza (ANAVA)**

##### **BuOH**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
BuOH	8	1,00	0,99	10,21

##### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	78,48	4	19,62	253,50	0,0004
(HBu) <sub>i</sub>	78,48	4	19,62	253,50	0,0004
Error	0,23	3	0,08		
Total	78,71	7			

##### **Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,74613**

Error: 0,0774 gl: 3

(HBu)<sub>i</sub> Medias n E.E.

4,8	0,29	2	0,20	A
6,5	0,29	2	0,20	A
2,2	0,33	1	0,28	A
1,5	6,64	1	0,28	B
0,5	6,83	2	0,20	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

##### **IBE**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
IBE	8	1,00	0,99	8,28

##### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	190,31	4	47,58	226,56	0,0005
(HBu) <sub>i</sub>	190,31	4	47,58	226,56	0,0005
Error	0,63	3	0,21		
Total	190,94	7			

##### **Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,87618**

Error: 0,2100 gl: 3

(HBu)<sub>i</sub> Medias n E.E.

2,2	1,70	1	0,46	A
4,8	1,75	2	0,32	A
6,5	1,80	2	0,32	A
0,5	11,75	2	0,32	B
1,5	12,00	1	0,46	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Yp/S BuOH

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
Yp/S BuOH 8 1,00 1,00 9,61

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,03	4	0,01	350,25	0,0002
[HBu]i	0,03	4	0,01	350,25	0,0002
Error	7,2E-05	3	2,4E-05		
Total	0,03	7			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03075

Error: 0,0000 gl: 3

[HBu]i	Medias	n	E.E.
6,5	0,00	2	3,5E-03 A
4,8	0,00	2	3,5E-03 A
2,2	4,0E-03	1	4,9E-03 A
1,5	0,13	1	4,9E-03 B
0,5	0,14	2	3,5E-03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Y p/S IBE

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
Y p/S IBE 8 1,00 0,99 13,59

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,08	4	0,02	173,22	0,0007
[HBu]i	0,08	4	0,02	173,22	0,0007
Error	3,5E-04	3	1,2E-04		
Total	0,08	7			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06740

Error: 0,0001 gl: 3

[HBu]i	Medias	n	E.E.
6,5	0,00	2	0,01 A
4,8	2,0E-03	2	0,01 A
2,2	4,0E-03	1	0,01 A
0,5	0,21	2	0,01 B
1,5	0,21	1	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Q BuOH

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Q BuOH	8	1,00	0,99	11,26

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,03	4	0,01	258,79	0,0004
[HBu]i	0,03	4	0,01	258,79	0,0004
Error	9,8E-05	3	3,3E-05		
Total	0,03	7			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03587

Error: 0,0000 gl: 3

[HBu]i	Medias	n	E.E.	
6,5	0,00	2	4,0E-03	A
4,8	0,00	2	4,0E-03	A
2,2	2,0E-03	1	0,01	A
1,5	0,13	1	0,01	B
0,5	0,14	2	4,0E-03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Q IBE

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Q IBE	8	0,99	0,97	20,42

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,08	4	0,02	64,66	0,0030
[HBu]i	0,08	4	0,02	64,66	0,0030
Error	8,7E-04	3	2,9E-04		
Total	0,08	7			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10719

Error: 0,0003 gl: 3

[HBu]i	Medias	n	E.E.	
4,8	1,5E-03	2	0,01	A
2,2	2,0E-03	1	0,02	A
6,5	0,02	2	0,01	A
0,5	0,21	2	0,01	B
1,5	0,21	1	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Biomasa (g/L)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Biomasa (g/L)	8	1,00	1,00	3,45

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,17	4	2,29	1298,26	<0,0001
[HBu]i	9,17	4	2,29	1298,26	<0,0001
Error	0,01	3	1,8E-03		
Total	9,18	7			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26381

Error: 0,0018 gl: 3

[HBu]i Medias n E.E.

2,2	0,31	1	0,04	A
4,8	0,38	2	0,03	A
6,5	0,45	2	0,03	A
1,5	2,42	1	0,04	B
0,5	2,69	2	0,03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### XS(%)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
XS(%)	8	1,00	1,00	3,59

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5886,00	4	1471,50	551,81	0,0001
[HBu]i	5886,00	4	1471,50	551,81	0,0001
Error	8,00	3	2,67		
Total	5894,00	7			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=10,24922

Error: 2,6667 gl: 3

[HBu]i Medias n E.E.

6,5	3,00	2	1,15	A
2,2	45,00	1	1,63	B
4,8	47,00	2	1,15	B
1,5	73,00	1	1,63	C
0,5	73,00	2	1,15	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 7.3.3 Evaluación del agregado de CSL como nutriente al medio de fermentación

#### **Análisis de la varianza**

##### **BuOH**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
BuOH	15	0,86	0,81	6,24

##### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11,78	4	2,95	15,84	0,0003
Condición	11,78	4	2,95	15,84	0,0003
Error	1,86	10	0,19		
Total	13,64	14			

##### **Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,15860**

Error: 0,1859 gl: 10

Condición	Medias	n	E.E.	
SóloCSL	5,22	3	0,25	A
Control	6,94	3	0,25	B
SinExtr	7,31	3	0,25	B
SinCB	7,33	3	0,25	B
SinCBniYE	7,76	3	0,25	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

##### **IBE**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
IBE	15	0,92	0,89	4,70

##### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	29,75	4	7,44	28,13	<0,0001
Condición	29,75	4	7,44	28,13	<0,0001
Error	2,64	10	0,26		
Total	32,39	14			

##### **Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,38171**

Error: 0,2644 gl: 10

Condición	Medias	n	E.E.	
SóloCSL	8,17	3	0,30	A
Control	11,21	3	0,30	B
SinExtr	11,54	3	0,30	B
SinCB	11,65	3	0,30	B
SinCBniYE	12,08	3	0,30	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Yp/S BuOH

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
Yp/S BuOH 15 0,81 0,74 6,63

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	4	1,4E-03	10,85	0,0012
Condición	0,01	4	1,4E-03	10,85	0,0012
Error	1,3E-03	10	1,3E-04		
Total	0,01	14			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03036

Error: 0,0001 gl: 10

Condición	Medias	n	E.E.
SóloCSL	0,13	3	0,01 A
Control	0,18	3	0,01 B
SinCBniYE	0,18	3	0,01 B
SinExtr	0,18	3	0,01 B
SinCB	0,18	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Y p/S IBE

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
Y p/S IBE 15 0,87 0,81 6,30

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	4	4,2E-03	16,41	0,0002
Condición	0,02	4	4,2E-03	16,41	0,0002
Error	2,6E-03	10	2,6E-04		
Total	0,02	14			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04309

Error: 0,0003 gl: 10

Condición	Medias	n	E.E.
SóloCSL	0,19	3	0,01 A
Control	0,26	3	0,01 B
SinExtr	0,27	3	0,01 B
SinCBniYE	0,27	3	0,01 B
SinCB	0,28	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Q BuOH

Variable N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Q BuOH 15	0,87	0,81	5,99

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,3E-03	4	1,1E-03	16,13	0,0002
Condición	4,3E-03	4	1,1E-03	16,13	0,0002
Error	6,7E-04	10	6,7E-05		
Total	5,0E-03	14			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02197

Error: 0,0001 gl: 10

Condición	Medias	n	E.E.
SóloCSL	0,10	3	4,7E-03 A
Control	0,14	3	4,7E-03 B
SinExtr	0,15	3	4,7E-03 B
SinCB	0,15	3	4,7E-03 B
SinCBniYE	0,15	3	4,7E-03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Q IBE

Variable N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Q IBE 15	0,92	0,88	5,37

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	4	3,3E-03	27,04	<0,0001
Condición	0,01	4	3,3E-03	27,04	<0,0001
Error	1,2E-03	10	1,2E-04		
Total	0,01	14			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02946

Error: 0,0001 gl: 10

Condición	Medias	n	E.E.
SóloCSL	0,15	3	0,01 A
Control	0,21	3	0,01 B
SinExtr	0,22	3	0,01 B
SinCB	0,22	3	0,01 B
SinCBniYE	0,23	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Biomasa (g/L)

Variable N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Biomasa 15	0,98	0,97	3,78

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,95	4	1,24	133,37	<0,0001
Condición	4,95	4	1,24	133,37	<0,0001
Error	0,09	10	0,01		
Total	5,04	14			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,25886

Error: 0,0093 gl: 10

Condición	Medias	n	E.E.
SóloCSL	1,42	3	0,06 A
Control	2,66	3	0,06 B
SinCBniYE	2,83	3	0,06 B C
SinCB	2,88	3	0,06 B C
SinExtr	2,97	3	0,06 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## XS(%)

Variable N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
XS(%) 15	0,84	0,78	0,76

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	29,85	4	7,46	13,32	0,0005
Condición	29,85	4	7,46	13,32	0,0005
Error	5,60	10	0,56		
Total	35,45	14			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,01127

Error: 0,5602 gl: 10

Condición	Medias	n	E.E.
SóloCSL	95,21	3	0,43 A
Control	97,75	3	0,43 B
SinCBniYE	98,71	3	0,43 B
SinCB	98,79	3	0,43 B
SinExtr	99,01	3	0,43 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 7.3.4 Evaluación de la concentración de azúcares iniciales del medio de fermentación

#### **Análisis de la varianza**

##### **BuOH**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
BuOH	12	0,92	0,89	6,57

##### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11,16	3	3,72	31,04	0,0001
[Az]i	11,16	3	3,72	31,04	0,0001
Error	0,96	8	0,12		
Total	12,12	11			

##### **Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,90504**

Error: 0,1198 gl: 8

[Az]i	Medias	n	E.E.	
60	4,66	3	0,20	A
100	4,74	3	0,20	A
80	4,74	3	0,20	A
40	6,94	3	0,20	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

##### **IBE**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
IBE	12	0,55	0,39	6,26

##### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,35	3	1,45	3,30	0,0784
[Az]i	4,35	3	1,45	3,30	0,0784
Error	3,51	8	0,44		
Total	7,86	11			

##### **Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,73164**

Error: 0,4386 gl: 8

[Az]i	Medias	n	E.E.	
60	9,73	3	0,38	A
80	10,31	3	0,38	A
100	11,08	3	0,38	A
40	11,21	3	0,38	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Yp/S BuOH

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Yp/S BuOH	12	0,54	0,37	15,91

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,01	3	2,1E-03	3,11	0,0884
[Az]i	0,01	3	2,1E-03	3,11	0,0884
Error	0,01	8	6,8E-04		
Total	0,01	11			

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06800

Error: 0,0007 gl: 8

[Az]i	Medias	n	E.E.
100	0,13	3	0,02 A
60	0,16	3	0,02 A
40	0,18	3	0,02 A
80	0,19	3	0,02 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Y p/S IBE

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Y p/S IBE12	12	0,51	0,32	15,77

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	3	0,01	2,75	0,1123
[Az]i	0,02	3	0,01	2,75	0,1123
Error	0,02	8	2,0E-03		
Total	0,03	11			

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11746

Error: 0,0020 gl: 8

[Az]i	Medias	n	E.E.
100	0,24	3	0,03 A
40	0,26	3	0,03 A
60	0,29	3	0,03 A
80	0,34	3	0,03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Q BuOH

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Q BuOH	12	0,92	0,90	6,17

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,1E-03	3	1,4E-03	32,50	0,0001
[Az]i	4,1E-03	3	1,4E-03	32,50	0,0001
Error	3,4E-04	8	4,2E-05		
Total	4,4E-03	11			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01695

Error: 0,0000 gl: 8

[Az]i	Medias	n	E.E.
60	0,09	3	3,7E-03 A
80	0,10	3	3,7E-03 A
100	0,10	3	3,7E-03 A
40	0,14	3	3,7E-03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Q IBE

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Q IBE	12	0,65	0,52	8,07

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,3E-03	3	1,1E-03	5,01	0,0304
[Az]i	3,3E-03	3	1,1E-03	5,01	0,0304
Error	1,7E-03	8	2,2E-04		
Total	5,0E-03	11			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03852

Error: 0,0002 gl: 8

[Az]i	Medias	n	E.E.
60	0,16	3	0,01 A
80	0,17	3	0,01 A B
100	0,18	3	0,01 A B
40	0,21	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### **Biomasa (g/L)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Biomasa 12		0,97	0,96	5,27

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,81	3	0,94	101,42	<0,0001
[Az]i	2,81	3	0,94	101,42	<0,0001
Error	0,07	8	0,01		
Total	2,89	11			

#### **Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,25147**

Error: 0,0093 gl: 8

[Az]i	Medias	n	E.E.
60	1,49	3	0,06 A
80	1,52	3	0,06 A
100	1,64	3	0,06 A
40	2,66	3	0,06 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### **Azúcares consumidos (g/L)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Az Consumidos	12	0,64	0,50	10,42

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	251,29	3	83,76	4,73	0,0350
[Az]i	251,29	3	83,76	4,73	0,0350
Error	141,66	8	17,71		
Total	392,95	11			

#### **Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11,00277**

Error: 17,7075 gl: 8

[Az]i	Medias	n	E.E.
60	36,19	3	2,43 A
40	38,07	3	2,43 A B
80	39,21	3	2,43 A B
100	48,09	3	2,43 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 7.3.5 Evaluación de la concentración de CSL del medio de fermentación

#### **Análisis de la varianza**

##### **BuOH**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
BuOH	15	0,34	0,08	8,55

##### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,19	4	0,55	1,31	0,3323
[CSL]	2,19	4	0,55	1,31	0,3323
Error	4,19	10	0,42		
Total	6,38	14			

##### **Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,74012**

Error: 0,4193 gl: 10

[CSL]	Medias	n	E.E.
0	6,94	3	0,37 A
5	7,90	3	0,37 A
10	7,58	3	0,37 A
15	8,02	3	0,37 A
20	7,43	3	0,37 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

##### **IBE**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
IBE	15	0,67	0,53	8,21

##### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	23,01	4	5,75	4,98	0,0180
[CSL]	23,01	4	5,75	4,98	0,0180
Error	11,54	10	1,15		
Total	34,55	14			

##### **Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,88671**

Error: 1,1540 gl: 10

[CSL]	Medias	n	E.E.
0	11,21	3	0,62 A
5	14,36	3	0,62 B
10	13,56	3	0,62 A B
15	14,22	3	0,62 B
20	12,08	3	0,62 A B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Yp/S BuOH

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Yp/S BuOH	15	0,33	0,06	13,39

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,3E-03	4	8,4E-04	1,24	0,3564
[CSL]	3,3E-03	4	8,4E-04	1,24	0,3564
Error	0,01	10	6,8E-04		
Total	0,01	14			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06996

Error: 0,0007 gl: 10

[CSL]	Medias	n	E.E.
0	0,18	3	0,02 A
5	0,20	3	0,02 A
10	0,21	3	0,02 A
15	0,21	3	0,02 A
20	0,18	3	0,02 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Y p/S IBE

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Y p/S IBE	15	0,53	0,34	13,97

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	4	0,01	2,81	0,0846
[CSL]	0,02	4	0,01	2,81	0,0846
Error	0,02	10	1,9E-03		
Total	0,04	14			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11850

Error: 0,0019 gl: 10

[CSL]	Medias	n	E.E.
0	0,26	3	0,03 A
5	0,35	3	0,03 A
10	0,35	3	0,03 A
15	0,34	3	0,03 A
20	0,27	3	0,03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Q BuOH

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Q BuOH	15	0,30	0,03	8,92

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7,9E-04	4	2,0E-04	1,09	0,4113
[CSL]	7,9E-04	4	2,0E-04	1,09	0,4113
Error	1,8E-03	10	1,8E-04		
Total	2,6E-03	14			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03606

Error: 0,0002 gl: 10

[CSL]	Medias	n	E.E.
0	0,14	3	0,01 A
5	0,16	3	0,01 A
10	0,15	3	0,01 A
15	0,16	3	0,01 A
20	0,15	3	0,01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Q IBE

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Q IBE	15	0,60	0,44	9,15

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,01	4	1,9E-03	3,78	0,0401
[CSL]	0,01	4	1,9E-03	3,78	0,0401
Error	5,0E-03	10	5,0E-04		
Total	0,01	14			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06003

Error: 0,0005 gl: 10

[CSL]	Medias	n	E.E.
0	0,21	3	0,01 A
5	0,27	3	0,01 B
10	0,25	3	0,01 A B
15	0,26	3	0,01 A B
20	0,23	3	0,01 A B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### **Biomasa (g/L)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Biomasa (g/L)	15	0,12	0,00	16,26

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,27	4	0,07	0,33	0,8549
[CSL]	0,27	4	0,07	0,33	0,8549
Error	2,04	10	0,20		
Total	2,31	14			

#### **Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,21393**

Error: 0,2041 gl: 10

[CSL]	Medias	n	E.E.
0	2,66	3	0,26 A
5	2,63	3	0,26 A
10	3,00	3	0,26 A
15	2,78	3	0,26 A
20	2,83	3	0,26 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

### **XS(%)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
XS(%)	15	0,95	0,92	1,07

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	178,59	4	44,65	43,91	<0,0001
[CSL]	178,59	4	44,65	43,91	<0,0001
Error	10,17	10	1,02		
Total	188,76	14			

#### **Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,70972**

Error: 1,0169 gl: 10

[CSL]	Medias	n	E.E.
0	97,75	3	0,58 B
5	92,81	3	0,58 A
10	90,68	3	0,58 A
15	90,70	3	0,58 A
20	98,71	3	0,58 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

## 7.4 Parámetros del análisis estadístico

**N:** Número total de observaciones.

**R<sup>2</sup>:** Es la varianza total de la variable explicada por la regresión. El R<sup>2</sup>, también llamado **coeficiente de determinación**, refleja la bondad del ajuste de un modelo a la variable que pretender explicar. Para la regresión basta lineal se calcula:

$$R^2 = \frac{\sigma_{XY}^2}{\sigma_X^2 \sigma_Y^2}$$

Donde:  $\sigma_{xy}$  es la covarianza de (X, Y)  
 $\sigma_x$  es la desviación estándar de la variable X  
 $\sigma_y$  es la desviación estándar de la variable Y

**R<sup>2</sup> Aj:** El R<sup>2</sup> ajustado se obtiene a partir de la expresión:

$$R^2 Aj = 1 - (1 - R^2)[(n - 1) / (n - p)]$$

donde  $n$  es el total de observaciones y  $p$  el número de parámetros del modelo ajustado.

**CV:** Es la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad de la variable, se denomina el **coeficiente de variación**, y se calcula:

$$C_V = \frac{\sigma}{|\bar{x}|}$$

Donde  $\sigma$  es la desviación estándar y  $\bar{x}$  es la media.

**FV:** **Fuentes de variación** son aquellas fuentes de variación de un proceso que están bajo control estadístico.

**SC:** La **suma de cuadrados** es una función aritmética que dado un número entero positivo  $n$ , proporciona el número de representaciones de este como suma de  $k$  cuadrados, donde las representaciones que únicamente se diferencian en el orden de sumandos o los signos de las raíces cuadradas se cuentan como diferentes, y se denota por  $r_k(n)$ , y se calcula:

$$r_k(n) = |\{(a_1, a_2, \dots, a_k) \in \mathbf{Z}^k : n = a_1^2 + a_2^2 + \dots + a_k^2\}|$$

donde  $|\cdot|$  denota la cardinalidad del conjunto. En otras palabras,  $r_k(n)$  es el número de veces que  $n$  puede escribirse como suma de  $k$  cuadrados.

**gl:** Los **grados de libertad** de un conjunto de observaciones están dados por el número de valores que pueden ser asignados de forma arbitraria, antes de que el resto de las variables tomen un valor automáticamente, en general es  $n - 1$ , donde  $n$  es el número de datos en la muestra que pueden tomar un valor.

**CM:** Los **cuadrados medios** representan una estimación de la varianza de la población. Se calculan dividiendo la suma correspondiente de los cuadrados entre los grados de libertad.

**F:** Estadístico llamado F. Es el coeficiente de dividir las medias cuadráticas y refleja el grado de parecido existente entre las medias que se están comparando.

**p-valor:** El **p-valor** se define como la probabilidad correspondiente al estadístico de ser posible bajo la hipótesis nula, si cumple con la condición de ser menor al nivel de significancia impuesto arbitrariamente, se calcula:

$p =$  Probabilidad (resultado tan extremo o más | hipótesis nula)

$p = P$  (resultado tan extremo o más |  $H_0$ )

El p-valor está basado en la asunción de la hipótesis de partida (o hipótesis nula), por tanto una medida de significación estadística.

**E.E.:** El **error estándar** es la desviación estándar de la distribución muestral de un estadístico. Esta estimación puede ser comparada con la fórmula de la verdadera desviación estándar de la media de la muestra:

$$EE = \sigma / \sqrt{n}$$

donde  $\sigma$  es la verdadera desviación estándar de la población.

**Alfa:** Si el **nivel de significancia  $\alpha$**  en un contraste de hipótesis proporciona un p-valor inferior a  $\alpha$ , la hipótesis nula es rechazada, siendo tal resultado denominado *estadísticamente significativo*. Cuanto menor sea el nivel de significación, más fuerte será la evidencia de que un hecho no se debe al azar.

**DMS:** La **diferencia mínima significativa** se define como la diferencia mínima que podría existir entre dos medias de muestras significativamente diferentes. Para obtener la fórmula para la DSM, se usa la prueba t de Student para la diferencia entre dos medias cuando las varianzas no son diferentes cuyo estadístico de contraste es:

$$t = \frac{\bar{X}_2 - \bar{X}_1}{S_{\Delta X}}$$

Así, la DSM puede considerarse como la menor de las diferencias, es decir:

$$DSM = |\bar{X}_i - \bar{X}_j| = t_{\alpha} \sqrt{\frac{2s^2}{n}}$$