

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE *Clostridium*
acetobutylicum ATCC 824 PARA LA PRODUCCIÓN DE BUTANOL A
PARTIR DE GLUCOSA**

YULIANA MARCELA MEDINA SANDOVAL



**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito
Para optar al título de:**

MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MAYO 27 DE 2013**

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE *Clostridium acetobutylicum*
ATCC 824 PARA LA PRODUCCIÓN DE BUTANOL A PARTIR DE GLUCOSA**

YULIANA MARCELA MEDINA SANDOVAL



APROBADO

Ingrid Shuler MSC. Ph.D.
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Janeth Arias Palacios Msc - M.Ed
Director de Carrera
Microbiología Industrial

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE *Clostridium*
acetobutylicum ATCC824 PARA LA PRODUCCIÓN DE BUTANOL A
PARTIR DE GLUCOSA**

YULIANA MARCELA MEDINA SANDOVAL



APROBADO

DANIEL MOLINA VELAZCO
Químico Msc. Ph.D.
Director

BALKYS E. QUEVEDO
Ingeniera Química Msc.
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

A Dios quien fue, es y será mi guía constante, al Dr. Daniel Molina Velazco por su confianza al permitirme trabajar en su grupo de investigación, a la profesora Ivonne Gutiérrez por su apoyo y colaboración, a José Andrés por su colaboración, paciencia y ayuda. A mis papas y mis hermanas por su incondicional amor, esfuerzo, sacrificio y por creer en mis capacidades. A Diego por su amor, apoyo y motivación. A toda mi familia y amigos que hicieron posible alcanzar este logro tan importante en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION.....	11
2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
3. MARCO TEORICO.....	13
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
5. METODOLOGIA.....	15
5.1 Selección del microorganismo.....	15
5.2 Determinación de la concentración inicial de inóculo.....	16
5.3 Determinación de biomasa, glucosa y formación de metabolitos.....	16
5.4 Preparación de las muestras para medir densidad óptica.....	16
5.5 Determinación de la biomasa.....	17
5.6 Determinación de glucosa.....	17
5.7 Cuantificación de metabolitos.....	17
5.8 Determinación de parámetros cinéticos.....	18
5.9 Análisis estadístico.....	18
6. RESULTADOS	18
6.1 Determinación de biomasa y glucosa.....	18
6.2 Determinación de metabolitos.....	20
6.3 Determinación de parámetros cinéticos.....	22
7. DISCUSION.....	23
8. CONCLUSIONES.....	25
9. RECOMENDACIONES.....	26
10. BIBLIOGRAFIA.....	27
11. ANEXOS.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Formación de biomasa y consumo de glucosa en el experimento de 15% de inóculo durante el tiempo de la fermentación.....	19
Figura 2. Formación de biomasa y consumo de glucosa en el experimento de 10% de inóculo durante el tiempo de la fermentación.....	19
Figura 3. Formación de biomasa y consumo de glucosa en el experimento de 5% de inóculo durante el tiempo de la fermentación.....	20
Figura 4. Concentraciones del ácido acético formado en los tres experimentos	20
Figura 5. Concentraciones del ácido butírico formado en los tres experimentos.....	21
Figura 6. Concentraciones de acetona formada en los tres experimentos.....	21
Figura 7. Concentraciones de butanol formado en los tres experimentos.....	22

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Parámetros cinéticos para las tres concentraciones de inóculo 5%, 10% y 15%.....22

Tabla 2. Rendimiento y Productividad del Butanol para los experimentos del 5%, 10% y 15% de inóculo durante la fermentación.....23

RESUMEN

Objetivo. Este trabajo se realizó con el fin de determinar la concentración de inóculo para el crecimiento de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 durante una fermentación ABE, empleando un biorreactor discontinuo a escala laboratorio.

Materiales y Métodos. Para determinar la concentración inicial de inóculo se realizaron tres experimentos, uno de ellos con porcentaje de inóculo del 5%, otro con 10% y finalmente uno con 15%. Se realizaron tres replicas por experimento. El tiempo de la fermentación fue 24 horas y se tomaron muestras cada 2 horas por duplicado. Luego, se determinó la formación de biomasa por densidad óptica utilizando un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-1800, a una longitud de onda de 490 nm. El consumo de glucosa se determinó con el test de glucosa- oxidasa. La cuantificación de los productos obtenidos se llevo a cabo por la técnica HPLC, empleando una columna HPX - 87H con un detector de índice de refracción a las siguientes condiciones: fase móvil ácido sulfúrico 0,5mM a una temperatura de 30°C y un flujo volumétrico de 0,5 mL/min.

Resultados. Las concentraciones de biomasa, glucosa y productos se determinaron para los tres experimentos; encontrándose valores más altos para el tratamiento del 15 % de inóculo. Con base a estos valores se calcularon los parámetros de la cinética de Orden 1 (velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación) y de Orden 0 (K_0 y tiempo de duplicación), rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$), rendimiento producto-sustrato ($Y_{p/s}$) y productividad del proceso.

Conclusión. Aunque los valores obtenidos de los parámetros cinéticos de los experimentos de 5%, 10% y 15% de inóculo son muy similares entre sí. El experimento de 15% de inóculo presentó un mayor consumo de sustrato, mayor productividad y mayor concentración final del butanol.

PALABRAS CLAVES: *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, fermentación ABE, HPLC, test glucosa – oxidasa y butanol.

ABSTRACT

Objective. The aim of this work was to determine the inoculum concentration for the growth of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during ABE fermentation using a laboratory scale batch bioreactor. **Materials and Methods.** Three experiments were carried out, one of them with 5 % of inoculum concentration, another with 10 % of inoculum concentration and finally 15 % of inoculum concentration. There were three replicates per experiment. The fermentation time was 24 hours, and samples were taken every 2 hours in duplicate. Then, the biomass formation was determined by optical density using a Shimadzu spectrophotometer UV-1800 brand at a wavelength of 490 nm. The glucose consumption was determined by the glucose-oxidase test. The quantification of the products obtained were conducted by the HPLC technique, using a column HPX - 87H a refractive index detector to the following conditions: mobile phase 0.5 mM sulfuric acid at a temperature of 30 ° C and a flow volume of 0.5 mL / min. **Results.** The biomass, glucose and products concentrations were determined for the three experiments, the highest values were found for the treatment 15% of inoculum concentration. The first order kinetics (specific growth rate and doubling time) and zero order kinetics (K_0 and doubling time) were calculated. Also biomass-substrate yield ($Y_{x/s}$), product-substrate yield ($Y_{p/s}$) and process productivity were calculated. **Conclusion.** Although the values of the kinetic parameters obtained from experiments of 5%, 10% and 15% of inoculum are very similar. The experiment of 15 % inoculum had the highest substrate consumption, productivity and butanol concentration.

KEYWORDS: *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, ABE fermentation, HPLC, test glucose– oxidase test and butanol.

1. INTRODUCCION

En la producción biotecnológica de butanol a partir de materias primas renovables se han empleado microorganismos del genero *Clostridium sp.* Por ejemplo, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum* y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Estas bacterias generalmente son: gram positivas, estrictamente anaerobias, su crecimiento se favorece a pH ligeramente ácido y a una temperatura de 37°C. Ellas pueden utilizar una gran variedad de sustratos como monosacáridos, principalmente glucosa y polisacáridos que son metabolizados y convertidos en solventes, tales como: acetona, butanol y etanol (1,2). Se han utilizado cultivos por lotes, continuos, discontinuos en el estudio de las propiedades bioquímicas, cinéticas y las variables que afectan el proceso de fermentación.

Durante la primera mitad del siglo pasado el butanol era producido industrialmente por fermentación, pero este proceso no pudo competir económicamente y fue reemplazado por la síntesis petroquímica. Ahora bien, se ha enfocado la investigación en procesos de fermentación viables para la obtención de butanol, debido a su capacidad de ser utilizado directamente en la gasolina como aditivo (3). Así, como menciona *Obando et al. (2011)*, el butanol tiene características similares a la gasolina y puede ser usado directamente en los motores de combustión sin necesidad de modificación alguna (4). El butanol es también usado como solvente en la fabricación de vitaminas, antibióticos y hormonas.

Desde la década de los 70 la producción de butanol por fermentación de materias primas renovables ha recobrado interés como alternativa de producción de este compuesto por ser un proceso limpio, no contaminante y también por la incertidumbre generada con el aumento de los precios del petróleo. En Colombia el gobierno nacional desea incentivar la investigación en la obtención de combustibles renovables como bioetanol, biobutanol y biodiesel.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La creciente demanda de fuentes de energías amigables con el medio ambiente, hace de los biocombustibles (etanol, butanol, biodiesel, etc.) una alternativa promisoría para el suministro de energía, en una sociedad cada día más exigente en lo que se refiere a las emisiones de gases contaminantes a la atmósfera. En el caso de Suramérica, Colombia es el tercer productor de Biocombustibles después de Brasil y Argentina (2).

El n-butanol puede obtenerse a partir de procesos fermentativos, empleando materias primas renovables como maíz, trigo, hidrolizado de yuca, jarabes de glucosa entre otras. Sin embargo, la presencia de butanol, así como de acetona y etanol resulta ser tóxica para los microorganismos, lo cual limita su concentración en el medio de cultivo, originando bajos rendimientos y un alto costo durante su recuperación en las soluciones diluidas. En el caso de *Clostridium sp.*, su metabolismo se detiene cuando la presencia de solventes alcanza una concentración de 14 g/L, lo cual limita la concentración de fuentes de carbono que pueden ser utilizados en la fermentación, ocasionando una baja productividad y baja concentración de productos (5).

En consideración a lo anterior, en este proyecto se pretende evaluar la concentración de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 para la producción de n-butanol a partir de glucosa en un biorreactor discontinuo a escala laboratorio. Este proyecto hace parte de un macroproyecto financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural que tiene como título **“Producción de butanol a partir de hidrolizado de yuca”** el cual se desarrolla en la Universidad Industrial de Santander en el grupo de investigación de Bioquímica y Biotecnología de las escuelas de Química e Ingeniería Química.

3. MARCO TEÓRICO

El butanol es un alcohol primario constituido por cuatro carbonos cuya fórmula es $C_4H_{10}O$; es un líquido incoloro, inflamable, con un olor característico. El butanol es miscible en solventes orgánicos comunes y parcialmente en agua. Hasta hoy, el butanol es considerado una mejor alternativa que el etanol como biocombustible (6). En Colombia, los biocombustibles son mezclados con la gasolina (en el caso del etanol) y con diesel (en el caso del biodiesel) provenientes de la refinación del petróleo. Sin embargo, la adición de éstos, tiene ciertos efectos negativos en algunas propiedades de la mezcla de combustibles. Como alternativa, se puede emplear n-butanol, dado que posee mejores propiedades que el etanol como combustible, adicionalmente posee baja volatilidad (la presión del vapor de butanol es 7.5 veces menor que la del etanol), mayor contenido energético (similar al de la gasolina), es menos higroscópico y corrosivo (4).

La producción biológica del butanol ocurre naturalmente en algunas especies de microorganismos, como las bacterias *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium butyricum* o la arquea *Hyperthermus butylicus*. Sin embargo, el género más estudiado es el de *Clostridium sp.*, ya que son capaces de convertir diversas fuentes de carbono, como la glucosa, galactosa, celobiosa, manosa, xilosa y arabinosa, en combustibles y químicos como el butanol, acetona y etanol utilizando la fermentación ABE (acetona, butanol, etanol) (7). Este es un proceso biológico anaerobio a partir del cual los azúcares, principalmente glucosa, son convertidos en productos finales por medio de microorganismos como *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii* y *C. pasteurianum*, entre otros. La ruta metabólica del proceso fermentativo empleado por *Clostridium acetobutylicum*, consta de dos fases características: (i) la acidogénesis y (ii) la solventogénesis. En la primera fase se forman los ácidos orgánicos (butírico, acético y láctico), el dióxido de carbono e hidrógeno. Como consecuencia de esta fase se presenta una disminución en el pH, lo cual es crucial para el crecimiento de los microorganismos. El pH aumenta durante la fase solventogénica, en donde, los

ácidos (butírico y acético) son nuevamente asimilados, dando lugar a la formación de acetona, etanol y butanol (8).

Durante la fermentación ABE variables como el pH, temperatura, concentración del sustrato y la concentración de productos finales, pueden afectar la producción de butanol. Un pH de 5 y una temperatura de 37°C, favorecen el crecimiento de *C. acetobutylicum* y mayor obtención de butanol; concentraciones iniciales de glucosa mayores a 60 – 80 g/L causan inhibición por sustrato y valores superiores a 14 g/L de butanol presentan inhibición celular debido a la toxicidad del producto (9).

Como se mencionó anteriormente, *C. acetobutylicum* es la especie más estudiada la secuencia completa de su genoma fue liberada en el 2001. Es una especie anaeróbica obligada, con forma de bastón, que posee un cromosoma de 3.94 Mbp y un plásmido de 192 Kbp. En cepas silvestres éste plásmido resulta indispensable para la solventogénesis (5). Esta bacteria tiene la ventaja de ser muy diversa en los sustratos que metaboliza; utilizando glucosa, galactosa, celobiosa, manosa, xilosa y arabinosa. Además, es también diversa la batería de enzimas que libera al medio, incluyendo: α y β -amilasas, α y β -glucosidasas, pululanasa, amilopululanasa, entre otras. Durante el proceso de producción de butanol con *Clostridium sp.*, se presenta, entre otros, un cambio fisiológico importante en la bacteria: los ácidos acético y butírico son liberados al medio durante la fase de crecimiento exponencial los cuales son reabsorbidos al interior de la célula, para ser metabolizados a butanol, acetona y en mucho menor medida en etanol. Esto se debe a que *C. acetobutylicum* carece de homeostasis al nivel de pH, por lo que depende íntimamente del pH extracelular. La presencia de ácidos en el medio puede provocar una pérdida del potencial protónico de la célula, inactivándola (10).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar la concentración inicial de inóculo para el crecimiento de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 en un biorreactor discontinuo a escala laboratorio.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento y el consumo de sustrato de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 bajo tres diferentes concentraciones de inóculo.
- Estimar la formación de productos resultantes de la fermentación ABE (ácido acético, ácido butírico, acetona y butanol) por la técnica HPLC.
- Determinar los parámetros cinéticos del proceso obtenidos durante la fermentación ABE.

5. METODOLOGÍA

5.1 Selección del microorganismo

El estudio se realizó con una cepa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, que se encuentra en el cepario del laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Industrial de Santander. Esta cepa se encontraba conservada a una temperatura de 4°C en un medio líquido llamado medio de mantenimiento (MM) que contiene glucosa 5 g/L, almidón soluble 1 g/L, extracto de levadura 3 g/L, extracto de carne 10 g/L, peptona 10 g/L, NaCl 5 g /L, acetato de sodio 5 g/L, cisteína 0,5 g/L y resazurina 1 mL (8).

5.2 Determinación de la concentración inicial de inóculo

Se procedió a realizar 3 fermentaciones con un volumen final de 600mL, variando el porcentaje de inóculo inicial. El primero con un 5%, el segundo con un 10% y el tercero con un 15%. Además se hicieron tres réplicas por experimento. El tiempo fue de 24 horas durante las cuales se tomaron dos muestras de 5mL cada 2 horas (ver Anexo 1 para los cálculos). Para los tres experimentos se utilizó el mismo medio de cultivo denominado medio de fermentación (MF) que contiene glucosa 40 g/L, extracto de levadura 5 g/L, sulfato de amonio 2 g/L, fosfato monobásico de potasio 0,75 g/L, fosfato dibásico de potasio 0,75 g/L, sulfato de hierro heptahidratado 0,01 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado 0,20 g/L, sulfato de manganeso monohidratado 0,01 g/L, cloruro de sodio 1 g/L, cisteína 0,50 g/L, resazurina 1 mL (8). De igual forma las condiciones de incubación fueron las mismas para todos los experimentos, temperatura de 37°C, pH 5 y condiciones de anaerobiosis.

5.3 Determinación de biomasa, glucosa y formación de metabolitos

Los valores de biomasa, consumo de glucosa y productos (ácido acético, ácido butírico, acetona y butanol) se determinaron como se describe a continuación.

5.4 Preparación de las muestras para medir densidad óptica

Las muestras que fueron tomadas cada 2 horas durante la fermentación, se sometieron a una etapa previa de lavado y centrifugado para separar el medio de las células suspendidas. En primer lugar, se transfirieron 3mL de cada una de las muestras a tubos de centrifuga tapa azul, y fueron centrifugadas a 10.000 gravedades durante 15 minutos. El sobrenadante se depositó en un tubo de ensayo tapa rosca para ser utilizado en la medición del consumo de glucosa, con el test de glucosa – oxidasa, y al pellet se le adicionaron 10 mL de agua destilada, se sometió a una agitación por vortex para asegurarse que se formara una solución homogénea, y se centrifugó a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Este procedimiento se repitió tres veces y al final el pellet fue

mezclado con 10 mL de agua destilada, se agitó en vortex, y esta solución se utilizó para medir la formación de biomasa.

5.5 Determinación de la biomasa

De cada una de las muestras tomadas durante las 24 horas de fermentación se midió la formación de Biomasa a través del tiempo. Esta se llevó a cabo por densidad óptica, utilizando un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-1800, a una longitud de onda de 490nm. La formación de biomasa se determinó interpolando la absorbancia medida en la curva de calibración ($y=0.369x-0.001$ con un $R^2= 0.997$) previamente establecida en el laboratorio. Luego, se realizaron diluciones de las muestras para que los valores de absorbancia estuvieran dentro de los límites establecidos en la ley de Beer-Lambert.

5.6 Determinación de glucosa

El consumo de glucosa se evaluó por el test de la glucosa – oxidasa, de igual forma se midió por densidad óptica utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Luego, se realizaron diluciones de las muestras para que los valores arrojados estuvieran dentro de los límites establecidos en la ley de Beer-Lambert. Estos resultados se remplazaron en la ecuación de la Glucosa (Anexo 4) para obtener las concentraciones g/L.

5.7 Cuantificación de metabolitos

El análisis de la concentración de los metabolitos solubles en la fase líquida establecida después de la eliminación de las células por centrifugado se desarrolló por HPLC, utilizando una columna HPX - 87H con detector de índice de refracción a las siguientes condiciones: fase móvil ácido sulfúrico 0,5mM a una temperatura de 30°C y un flujo de 0,5mL/min (8). Para este análisis se utilizaron los 2 mL restantes de los 5 mL del volumen tomado durante cada muestreo. Cada muestra fue filtrada, con el fin de retirar impurezas que interfieran con los resultados del análisis.

5.8 Determinación de parámetros cinéticos

Para calcular los parámetros cinéticos se utilizaron los resultados obtenidos en la formación de biomasa y consumo de glucosa, con los cuales se determinó la cinética de Orden 1 (velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación), rendimiento biomasa-sustrato, rendimiento producto-sustrato y productividad del proceso.

5.9 Análisis estadístico

En este estudio se asumió como variable independiente cuantitativa al porcentaje de inóculo (5, 10 y 15%). Las condiciones de la fermentación fueron: pH= 5, temperatura= 37°C, condiciones estrictas de anaerobiosis (indicador de oxidoreducción L -cisteína y rezasurina), tiempo= 24 horas y se utilizó el medio de cultivo descrito en el punto 5.2. Las variables dependientes que se midieron cada 2 horas durante la fermentación fueron: la formación de biomasa g/L, el consumo de glucosa g/L y la producción de n-butanol g/L.

Teniendo en cuenta el comportamiento normal de los datos, se realizó una prueba ANOVA para verificar si hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias cuando se tienen más de dos muestras en el mismo tratamiento.

6. RESULTADOS

6.1 DETERMINACION DE BIOMASA Y GLUCOSA

En las figuras 1, 2 y 3 se muestra el comportamiento que presentó la biomasa y glucosa durante las 24 horas de fermentación para los experimentos de 5%, 10% y 15% de concentración de inóculo; en los cuales la máxima formación de biomasa al término de las 24 horas fue de: 0,469 g/L, 0,801 g/L y 0,910 g/L respectivamente. Por medio de la ANOVA se encontraron los valores estadísticos de prueba y su nivel de significación, (F 0,429: Sig. 0.654).

De igual manera, las concentraciones finales de glucosa a la hora 24 fueron de: 12,2 g/L, 8,5 g/L y 6,7 g/L respectivamente, (F 0,444: Sig. 0.645).

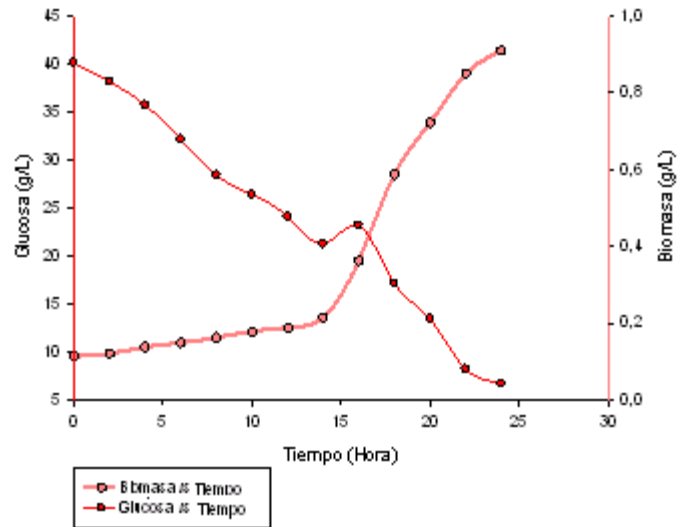


Figura 1. Formación de biomasa y consumo de glucosa en el experimento de 15 % inóculo durante el tiempo de la fermentación.

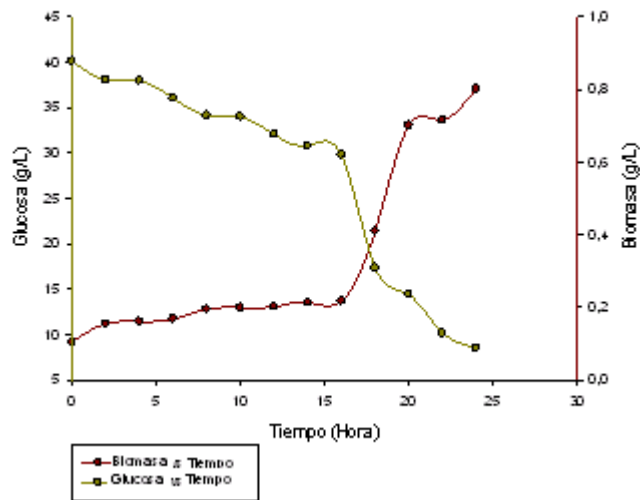


Figura 2. Formación de biomasa y consumo de glucosa en el experimento de 10 % de inóculo durante el tiempo de la fermentación.

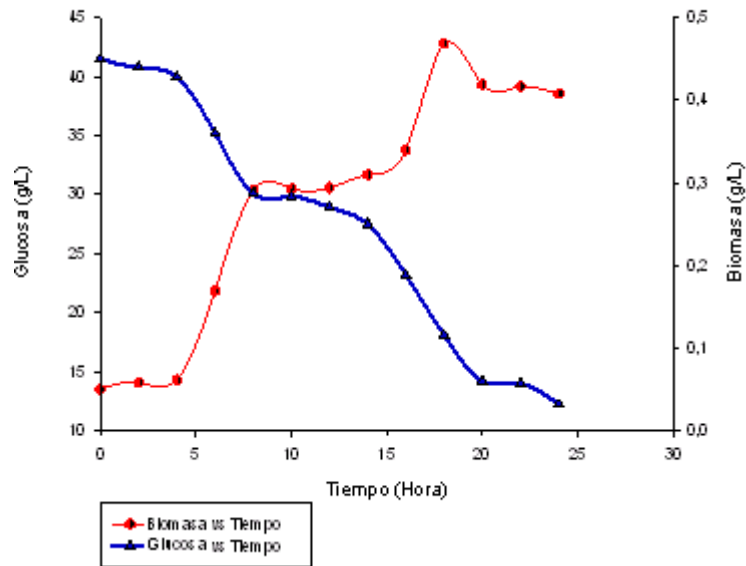


Figura 3. Formación de biomasa y consumo de glucosa en el experimento de 5% de inóculo durante el tiempo de la fermentación.

6.2 DETERMINACION DE METABOLITOS

La formación de los productos durante las 24 horas de fermentación para el ácido acético en los tres experimentos se muestra en la figura 4. Con el inóculo de 5% presentó la mayor concentración (0.969 g/L), seguido por el del 15% (0,913 g/L), y 10% (0,848g/L), (Sig. 0,000).

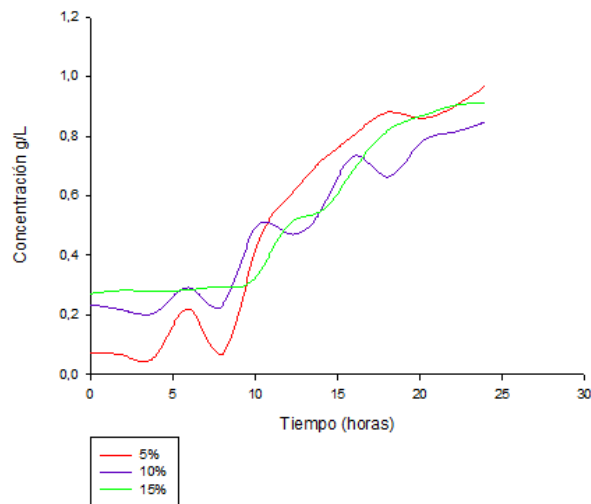


Figura 4. Concentraciones del ácido acético formado en los tres experimentos.

En la figura 5 se muestran las concentraciones de ácido butírico durante las 24 horas de fermentación. La mayor concentración (2.564 g/L) se registró en el experimento del 5 % de inóculo, seguida del 15% inóculo (2.296 g/L) y el 10% de inóculo (2.211 g/L), (Sig. 0,000).

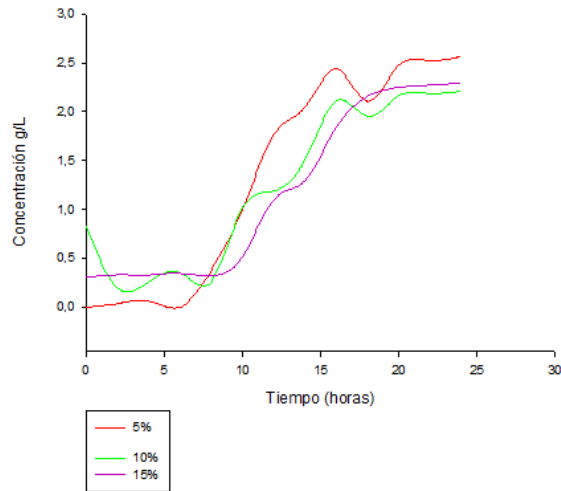


Figura 5. Concentraciones del ácido butírico formado en los tres experimentos.

Para la formación de acetona la figura 6 muestra el comportamiento de este solvente durante el tiempo de fermentación. La mayor concentración (0.133 g/L) fue en el experimento de 10% de inóculo, seguida del 15% de inóculo (0.132 g/L) y 5% de inóculo (0.055), (Sig. 0,000).

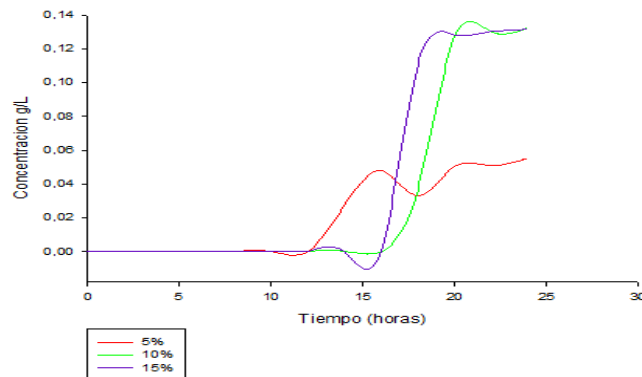


Figura 6. Concentraciones de acetona formada en los tres experimentos.

Finalmente la formación de butanol durante las 24 horas de fermentación se muestra en la figura 7. La mayor concentración fue en el experimento de 15% de inóculo (0.609 g/L), seguida del 10% de inóculo (0.528 g/L) y 5% de inóculo (0.284 g/L), (Sig. 0,000).

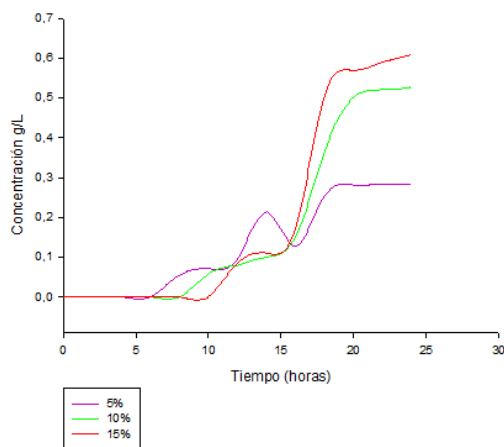


Figura 7. Concentraciones de butanol formado en los tres experimentos.

6.3 DETERMINACION DE PARAMETROS CINETICOS

En la tabla 1 se muestran los resultados de los parámetros cinéticos para cada uno de los experimentos. Donde se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ_x), tiempo de duplicación (td), sustrato consumido (S_c). Y en la tabla 2 los valores de rendimiento sustrato – producto (Y p/s) y productividad (P). Los datos más representativos se alcanzaron para el 15% de inóculo (μ_x : 0.2082 h⁻¹), (td: 3.382 h) y (P: 0.0254 g/L/h).

Hora Fase Exponencial	μ_x h ⁻¹	td (h)	Sust. Consumido (g)	Velox. Consumo de sustrato μ h ⁻¹	% Inóculo
Hora 4 - 8	0,3932	1,7628	9,842	-2,4605	5% A
Hora 14 - 18	0,1035	6,697	9,46	-2,365	
Hora 4 - 8	0,399	1,737	9,825	-2,456	5% B
Hora 14 - 18	0,1043	6,645	9,19	-2,297	
Hora 4 - 8	0,3874	1,789	9,949	-2,487	5% C

Hora 14 - 18	0,1027	6,749	9,9	-2,475	
Hora 16 - 20	0,292	2,373	15,47	-3,868	10% A
Hora 16 - 20	0,2943	2,355	15,17	-3,792	10%B
Hora 16 - 20	0,2913	2,379	15,43	-3,858	10% C
Hora 14 -20	0,2082	3,329	7,75	-1,462	15% A
Hora 14 - 20	0,2049	3,382	7,73	-1,458	15% B
Hora 14 - 20	0,2054	3,374	7,82	-1,481	15% C

Tabla 1. Parámetros cinéticos para los experimentos de 5%, 10% y 15% de inóculo.

Rendimiento Y p/s (g/g)	Productividad g/l/h	% Inóculo
0,0095	0,0116	5% A
0,0094	0,0118	5% B
0,0092	0,012	5% C
0,0162	0,022	10% A
0,0166	0,021	10%B
0,0164	0,022	10% C
0,0183	0,0252	15% A
0,0187	0,0253	15% B
0,0184	0,0254	15% C

Tabla 2. Rendimiento y Productividad del Butanol para los experimentos del 5%, 10% y 15% de inóculo durante la fermentación.

6. DISCUSION

Como se observa en las figuras 1, 2 y 3 el mayor crecimiento de *Clostridium acetobutylicum* corresponde al tratamiento de 15% inóculo. Además, la rapidez con la que el microorganismo formó biomasa (μ_x : $0,2082 \text{ h}^{-1}$) fue la mayor con respecto a los otros dos experimentos, (14). Eran de esperarse estos resultados puesto que una mayor concentración de inóculo contribuye a una mayor formación de biomasa. A pesar que los valores obtenidos de biomasa difieren entre sí, estadísticamente no hay evidencia significativa para la igualdad de medias (Sig. $0.654 > 0.05$).

Con respecto al experimento del 5% (figura 3), se ve que se forman dos fases exponenciales, la primera va de la hora 5 hasta la 10; allí hay una diauxia aproximadamente de 5 horas, y nuevamente a la hora 15 hay una segunda fase exponencial. La causa de esta diauxia no es muy clara, pero se logra identificar que no es por agotamiento de sustrato, pues en esta misma figura se observa que aún hay disponibilidad de glucosa y el microorganismo la sigue consumiendo hasta el final de la fermentación, este fenómeno se pudo dar como consecuencia de alguna variación en los factor ambientales del proceso.

En las figuras 1 y 2 se aprecia que a la hora 24 se alcanza a consumir aproximadamente un 82% del sustrato disponible en los experimentos del 10% y del 15%. Así mismo, se puede observar que el microorganismo obtiene una mayor formación de biomasa y un mayor consumo de sustrato; esto mismo ocurre en uno de los tratamientos que evaluaron *Parra et al. (1995)*, quienes argumentan que una mayor formación de biomasa y un mayor consumo de sustrato por parte del microorganismo, influye en la cantidad de solventes totales formados, (11). Aunque los valores de rendimiento producto – sustrato ($Y_{p/s}$) son similares para el 10 % y 15% de inóculo, si se observa las figuras 4, 5, 6 y 7 donde se muestra la formación de solventes, se puede apreciar que en el experimento del 15 % de inoculo se obtiene la mayor concentración de butanol.

Todo lo anterior se comprueba con los cromatogramas obtenidos al aplicar la técnica analítica HPLC (Anexo 6). Durante las seis primeras horas se encuentran los tiempos de retención del ácido acético (13,317 minutos) y ácido butírico (17,317 minutos). A partir de la hora 8, se aprecian los tiempos de retención que corresponden a la acetona (18,906 minutos) y al butanol (32,58 minutos), este último es el producto de interés en este proyecto.

También se presentó una alta formación de productos, siendo el ácido butírico el que se encontró en una concentración más alta (2,296 g/L) y quien es el precursor para la formación de butanol, como se muestra en la figura 7. La fermentación ABE en cultivos discontinuos se caracteriza por tener dos fases, una acidogénica donde los ácidos acético y butírico se producen simultáneamente con el crecimiento celular, generando una caída del pH por debajo de 5.0, lo cual asociado a otros eventos de la célula, se activan algunas enzimas y reprimen otras, cambiando el metabolismo hacia la segunda fase denominada solventogénica, en donde se presenta la reasimilación de los ácidos acumulados en el comienzo para ser transformados en acetona, etanol y butanol (12,13). De esta manera se puede explicar porque durante las primeras horas de la fermentación se forman los ácidos acético y butírico, y al ser estos reasimilados por el microorganismo se forman la acetona y el butanol (Ver Anexo 6 y 8).

Teniendo en cuenta los resultados del Anexo 8 y que el butanol es el metabolito de interés, se realizó una gráfica integrada para comparar la formación de este producto en cada uno de las concentraciones de inóculo 5%, 10% y 15%, como se muestra en la figura 7. La mayor formación de butanol se presentó en el experimento de 15% de inóculo (0.609g/L). La producción de solventes está completamente ligada al consumo de sustratos y reasimilación de los ácidos. Si estos dos eventos no se presentan la producción de solventes se ve afectada. Estos resultados son similares con los expuestos por *Johnes (1986)* y *Hartmanis et al. (1984)*, en *Parra C. et al. (1995)*, quienes postulan que la producción de solventes depende de la reasimilación de los ácidos para que se transformen en solventes, y que a su vez esta reasimilación requiere del consumo de sustrato, sin

lo cual ese evento no podría llevarse a cabo (11). En el experimento de 15% de inóculo que tiene un mayor consumo de sustrato (33,39 g/L), de igual forma también se presenta la mayor formación de solventes.

Para los análisis de productividad y rendimiento producto - sustrato, se realizaron los cálculos para el butanol, puesto que es el metabolito de interés, estos valores se encuentran en la tabla 2. Teniendo en cuenta estos resultados el rendimiento (Y_p/s) es 0.0187 g/g para la concentración de 15% de inóculo. A pesar que el tiempo de fermentación es el mismo para los tres experimentos, la productividad para este experimento es de 0,0254 g/L/h, mayor en comparación con los otros dos tratamientos. Según *Liu et al. (2010)*, el rendimiento y la productividad de la fermentación dependen de la cantidad de biomasa y solventes que se haya formado. Los autores determinaron un rendimiento de 0.3613 g/g y una productividad de 0.1720 g/L/h, utilizando un volumen de 1L y un tiempo de fermentación de 140 horas (15). Siendo estos valores cercanos a los teóricos reportados por *Tashiro et al. (2010)*, productividad <0.5 g/L/h y rendimiento 0.33 g/g.

Estadísticamente (ver Anexo 11) existe evidencia para afirmar que hay diferencia significativa entre los tres experimentos. Según las concentraciones obtenidas de biomasa, glucosa y solventes, un 15 % de inóculo contribuye a una mayor producción de butanol durante el proceso.

8. CONCLUSIONES

- La mayor concentración de biomasa y consumo de sustrato disponible durante la fermentación se presentó en el experimento del 15 % de inóculo, debido a que el tiempo de duplicación del microorganismo (t_d) es menor y la velocidad específica de crecimiento (μ_x) es mayor entre los tres experimentos.

- Los resultados de los cromatogramas establecen que la mayor producción de butanol fue de 0.609 g/L, durante el experimento de 15% de concentración de inóculo.
- Aunque los valores obtenidos de los parámetros cinéticos de los experimentos de 5%, 10% y 15% de inóculo son muy similares entre sí. El experimento de 15% de inóculo presentó un mayor consumo de sustrato, mayor productividad y mayor concentración final del producto.

9. RECOMENDACIONES

- Para futuros estudios se recomienda realizar la fermentación por un tiempo superior a 24 horas. Además, realizar una escala del proceso de laboratorio a piloto.
- También se recomienda realizar una mayor cantidad de réplicas para lograr una mejor inferencia estadística en el análisis de los datos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Rojas C, Gonzales N. Diseño conceptual de un fermentador para la producción de n- butanol a partir de glucosa empleando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Trabajo de Grado**. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Colombia. 2011. 63 p.
- (2) Fuciños V, Pallares A. Selección de un modelo matemático y diseño de un sistema de control para la fermentación ABE a partir de glucosa empleando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Trabajo de Grado**. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Colombia 2011. 53 p.
- (3) Quereshi N, Ezeji T, Ebener J, Dien B, Cotta M, Blaschek H. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of te acid and enzyme hydrolyzed con fiber. *Biosource Technhnology*. 2008; **99**: 5915 – 5922.
- (4) Obando J, Cardona C. Análisis de la producción de biobutanol en la fermentación acetobutilica con *Clostridium saccharoperbutyl acetonicum* N1-4 ATCC 13564. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. 2011; **58**:36 – 45.
- (5) Lee S, Park J, Jang S, Nielsen L, Kim J, Jung K. Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*.2008; **101** (2): 209-210.
- (6) Rajchenberg E, Rodríguez J, Juárez K, Martínez A, Morales S. Producción Microbiológica de Butanol. *Biotecnología*. 2009;**13** (3): 26-37.

- (7) Ladisch M. Evaluation of recent advances in butanol fermentation, upstream and downstream processing. *Enzyme and Microbial technology*. 1991; **24** (4): 280-283.
- (8) Ezeji T, Qureshi H, Blaschek H. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactor. *Elsevier*. 2007; **18**(3): 220-227.
- (9) Shinto H, Tashiro Y, Yamashita M, Kobayashi G, Sekiguchi T, Hanai T, Kuriya Y, Okamoto M, Sonomoto K. Kinetic modeling and sensitivity analysis of Acetone-Butanol-Ethanol production. *Journal of Biotechnology*. 2007; **131** (1): 45–56.
- (10) Mermelestein L, Papoutsakis E, Petersen D, Benett G. Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993; **22**: 1053 – 1060.
- (11) Parra C, López L, Granados J, Dumar J, Montoya D, Ferreira S, Buitrago G, Silva E. Evaluación de cepas de *Clostridium acetobutylicum* para el desarrollo de la fermentación acetobutilica. *Revista Colombiana de Ciencias Fisico-farmacéuticas*. 1995; **24**:40 -44.
- (12) Jones, D, Woods D. Acetone Butanol Fermentation. *Revisited Microbiological Reviews*. 1986; **50** (4): 484–524.
- (13) Claassen P, Budde M, Lopez A. Acetone, Butanol and Ethanol production from domestic organic waste by solventogenic *Clostridia*. *Journal Molecular Microbiology Biotechnology*. 2000; **2** (1): 39 – 44.

- (14) Yang X, Tsao G. Mathematical Modeling of Inhibition Kinetics in Acetone – Butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Progress*. 1994; **10**: 532 – 538.
- (15) Liu Z, Ying Y, Li F, Ma C, Xu P. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2010; **37** (5): 495–501.

ANEXOS

1. Cálculos para determinar el número de muestras y tiempo de muestreo

- **Inóculo del 5%**

VET 600 mL

5% inóculo: 30mL

Tiempo. Fermentación 24 horas

VL muestra 5mL

VL medio 570mL }
VL inóculo 30mL } 600 mL

Max VL a retirar 10% = 60 mL en 24 horas

$60/5 = 12$ muestras

$24/11 = 2$ horas tomo muestra

- **Inóculo del 10%**

VET 600 mL

10% inóculo: 60mL

Tiempo. Fermentación 24 horas

VL muestra 5mL

VL medio 540mL }
VL inóculo 60mL } 600 mL

Max VL a retirar 10% = 60 mL en 24 horas

$60/5 = 12$ muestras

$24/11 = 2$ horas tomo muestra

- **Inóculo del 15%**

VET 600 mL

15% inóculo: 90mL

Tiempo. Fermentación 24 horas

VL muestra 5mL

VL medio 510mL }
 VL inóculo 90mL } 600 mL

Max VL a retirar 10% = 60 mL en 24 horas

60/5 = 12 muestras

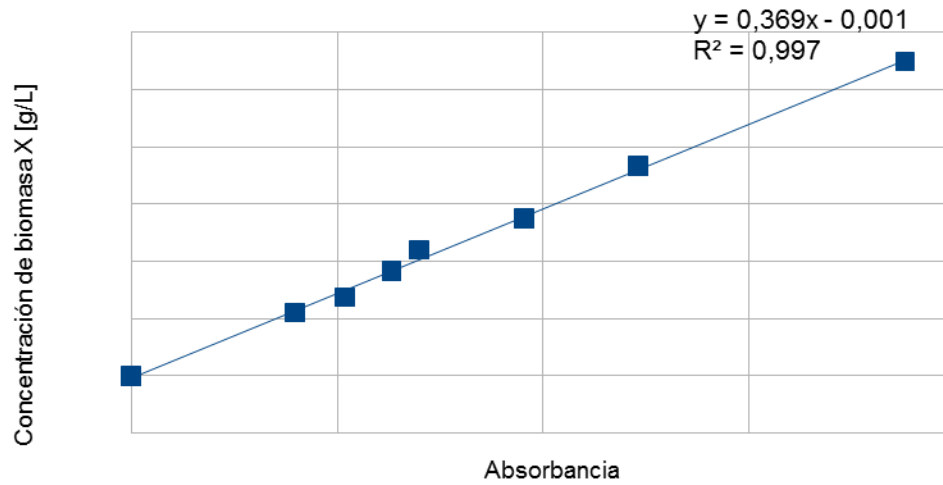
24/11 = 2 horas tomo muestra

2. Curva de Calibración de Biomasa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

	Masa	Masa de Biomasa X	Masa neta X	X [g/L]
Caja01	0,269	0,282	0,013	2,680
Caja02	0,259	0,273	0,014	2,800
Caja03	0,278	0,292	0,014	2,760
Volumen	5mL		Promedio	2,75

Volumen	Dilución	Abs1	Abs2	Abs3	Abs	Biomasa X [g/L]
500/5000	10	0,751	0,752	0,753	0,752	0,275
400/6000	15	0,494	0,491	0,492	0,492	0,183
250/5000	20	0,382	0,382	0,381	0,382	0,137
200/5000	25	0,282	0,278	0,279	0,280	0,110
200/6000	30	0,252	0,253	0,253	0,253	0,092
125/5000	40	0,206	0,208	0,208	0,207	0,069
100/5000	50	0,159	0,159	0,158	0,159	0,055
0	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

CURVA DE CALIBRACIÓN BIOMSA



3. Promedio de las absorbancias para determinar la formación de Biomasa en g/L.

- Inóculo del 5%

Tiempo	Volumen	Promedio Abs
0	1,3	0,069
2	1,3	0,083
4	1,3	0,090
6	2,3	0,284
8	10,3	0,511
10	10,3	0,699
12	10,3	0,491
14	10,3	0,468
16	10,3	0,595
18	10,3	0,828
20	10,3	0,718
22	10,3	0,733
24	10,3	0,737

- **Inóculo del 10%**

Tiempo	Volumen	Promedio Abs
0	3	0,026
2	3	0,067
4	3	0,055
6	3	0,052
8	3	0,049
10	3	0,069
12	3	0,056
14	3	0,045
16	3	0,077
18	3	0,164
20	3	0,813
22	3	0,156
24	3	0,848

- **Inóculo del 15%**

Tiempo	Volumen	Promedio Abs
0	3	0,076
2	3	0,036
4	3	0,215
6	3	0,119
8	3	0,053
10	3	0,101
12	3	0,085
14	3	0,036
16	3	0,095
18	3	0,574
20	3	0,361
22	3	0,448
24	3	0,531

4. Calculo de la concentración en g/L de la Glucosa

$$\text{Glucosa g/l} = (\text{Abs muestra/ Abs del patrón}) * \text{fd}$$

Patrón 5%: 1,132

Patrón 10% y 15%: 0,368

4.1 Promedio de las absorbancias test glucosa – oxidasa

- Inóculo del 5%

Tiempo	Volumen	Promedio Abs
0	1,3	0,034
2	1,3	0,025
4	1,3	0,041
6	2,3	0,031
8	10,3	0,578
10	10,3	0,555
12	10,3	1,169
14	10,3	1,180
16	10,3	1,026
18	10,3	1,139
20	10,3	1,106
22	10,3	1,100
24	10,3	1,042

- **Inóculo del 10%**

Tiempo	Volumen	Promedio Abs
0	3	0,733
2	3	0,791
4	3	0,788
6	3	0,930
8	3	0,923
10	3	0,907
12	3	0,919
14	3	0,876
16	3	0,859
18	3	0,850
20	3	0,828
22	3	0,826
24	3	0,821

- **Inóculo del 15%**

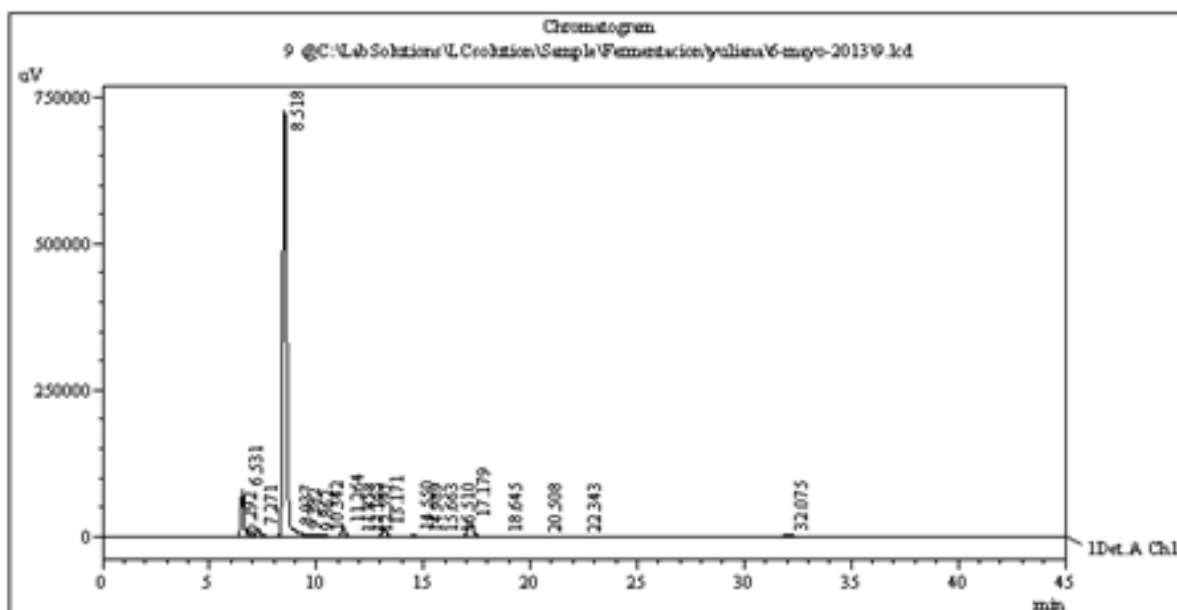
Tiempo	Volumen	Promedio Abs
0	3	0,885
2	3	0,997
4	3	0,858
6	3	0,886
8	3	0,882
10	3	0,217
12	3	0,796
14	3	0,964
16	3	0,881
18	3	0,862
20	3	0,860
22	3	0,798
24	3	0,751

5. Concentraciones en g/L de Biomasa y Glucosa.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)						Glucosa (g/L)					
	5%	Desv est	10%	Desv est	15%	Desv est	5%	Desv est	10%	Desv est	15%	Desv est
0	0,05	0,01	0,104	0,002	0,114	0,003	41,500	0,696	40,120	0,329	40,090	0,035
2	0,058	0,002	0,155	0,001	0,121	0,002	40,800	0,168	38,050	0,047	38,150	0,094
4	0,061	0,001	0,161	0,002	0,138	0,001	39,970	0,112	37,970	0,570	35,730	0,108
6	0,169	0,001	0,168	0,001	0,149	0,001	35,210	0,228	36,020	0,005	32,150	0,049
8	0,294	0,002	0,195	0,002	0,163	0,003	30,080	0,019	34,150	0,026	28,410	0,208
10	0,291	0,002	0,199	0,002	0,178	0,001	29,850	0,122	33,980	0,017	26,380	0,239
12	0,293	0,003	0,201	0,001	0,188	0,001	28,920	0,310	32,080	0,040	24,110	0,031
14	0,310	0,001	0,213	0,002	0,215	0,003	27,510	0,390	30,760	0,206	21,210	0,052
16	0,340	0,003	0,217	0,001	0,363	0,002	23,150	0,256	29,800	0,121	23,180	0,139
18	0,469	0,003	0,409	0,002	0,588	0,001	18,070	0,065	17,380	0,113	17,140	0,048
20	0,419	0,002	0,701	0,002	0,722	0,001	14,150	0,173	14,440	0,083	13,450	0,007
22	0,417	0,003	0,715	0,002	0,850	0,003	13,970	0,199	10,150	0,048	8,200	0,021
24	0,408	0,002	0,801	0,001	0,910	0,001	12,200	0,236	8,500	0,018	6,700	0,180

6. Cromatogramas desde la hora 0 hasta la hora 24 de la concentración de inóculo del 15% que fue la que mejor resultados obtuvo en los estudios realizados.

Hora = 0

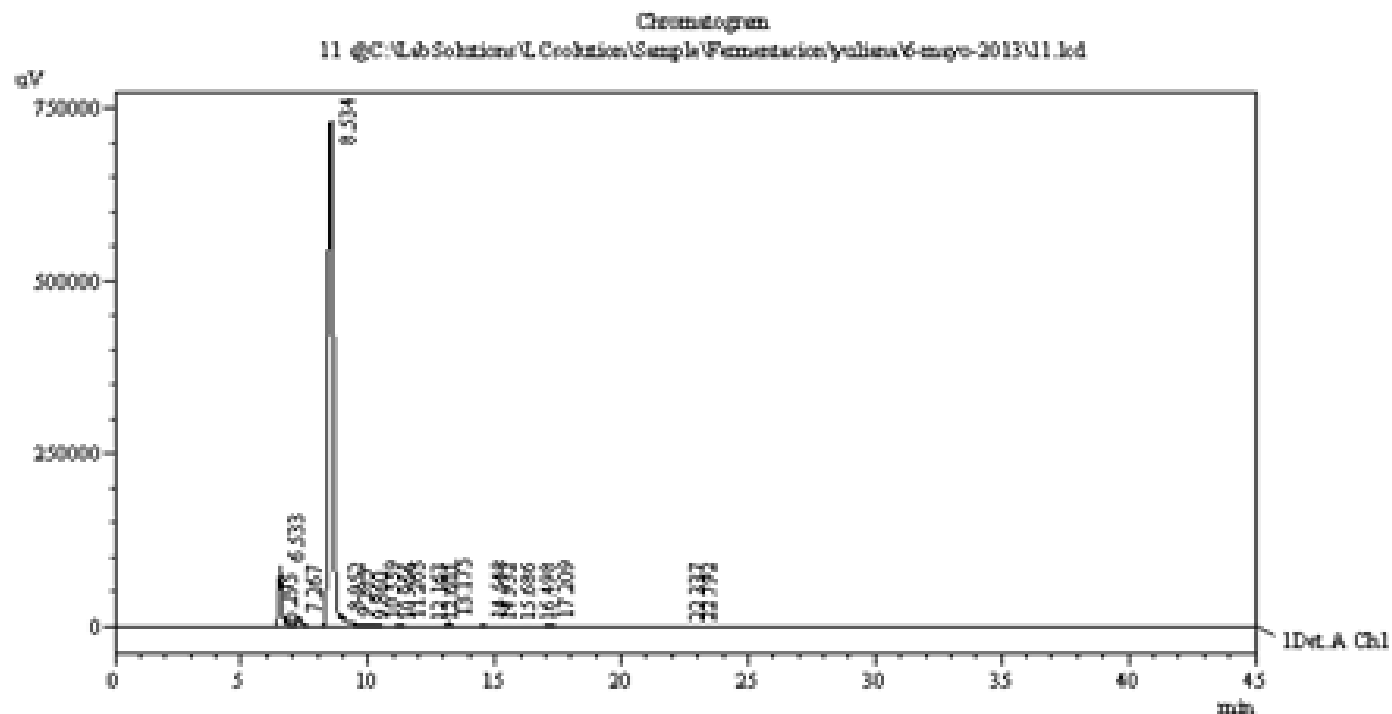


Peak Table @C:\Lab Solutions\L.Croation\Sample\Fermentacion\yuliana\6-mayo-2013\9.icd

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.292	1367	235	0.012	0.027	0.000
2	6.531	815474	80455	7.125	9.094	1.057
3	7.271	192677	12192	1.684	1.378	2.513
4	8.518	9351790	726922	81.713	82.170	3.891
5	8.937	10214	1097	0.009	0.124	1.647
6	9.262	4980	421	0.044	0.048	1.582
7	9.862	3988	380	0.035	0.043	2.265
8	10.342	6825	359	0.060	0.041	1.252
9	11.264	184676	14839	1.614	1.677	2.245
10	11.858	1127	89	0.010	0.010	1.264
11	12.165	4790	414	0.042	0.047	0.664
12	12.597	4761	381	0.042	0.043	1.309
13	13.171	190073	13394	1.661	1.514	1.604
14	14.550	29002	1708	0.253	0.193	3.326
15	14.989	17214	986	0.150	0.111	0.873
16	15.663	16667	860	0.146	0.097	1.273
17	16.510	7371	277	0.064	0.031	1.024
18	17.179	473932	25443	4.141	2.876	0.821
19	18.645	13196	681	0.115	0.077	2.970
20	20.508	27175	729	0.237	0.082	2.589
21	22.343	1424	76	0.012	0.009	2.554
22	32.075	85950	2716	0.751	0.307	14.511
Total		11444674	886643	100.000	100.000	

Hora = 2

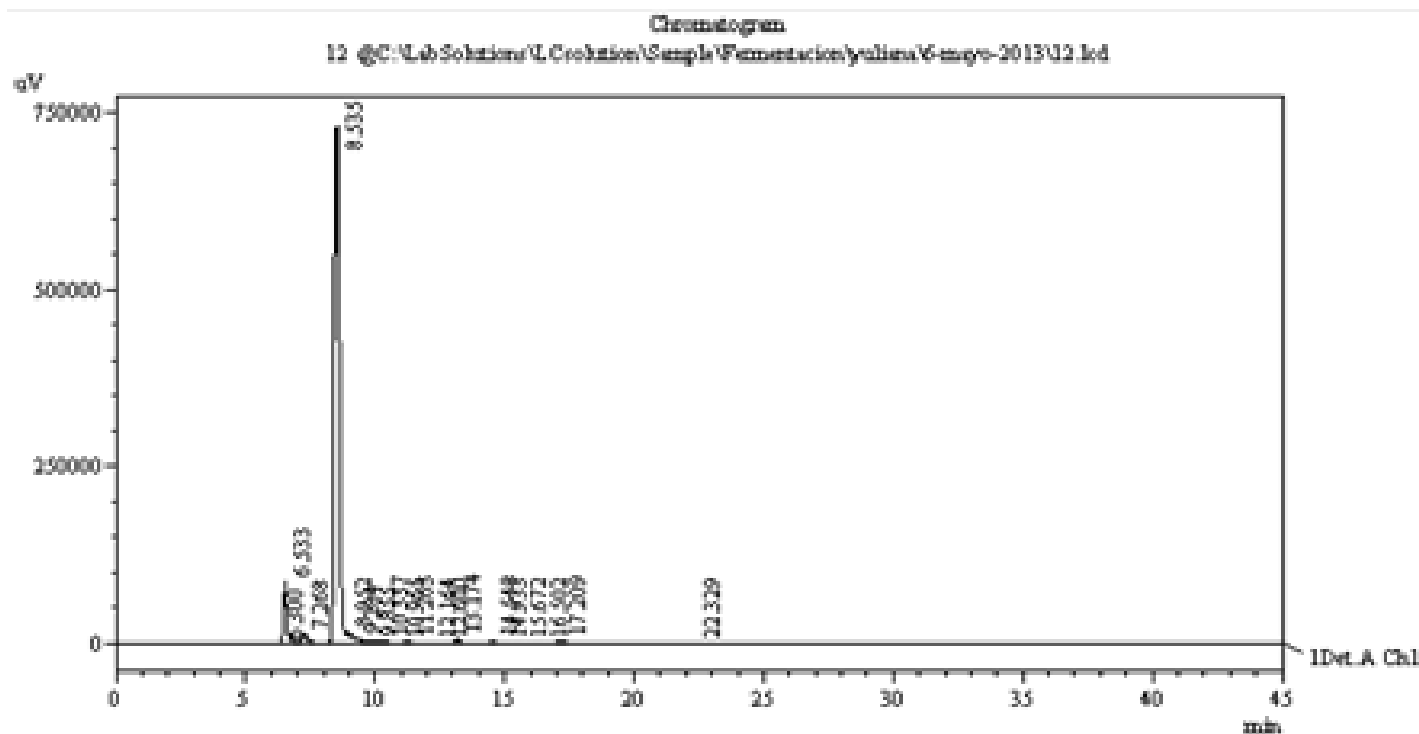


Peak Table @C:\Lab Solutions\L.Crochano\Sample\Fermentacion\yuliana\6-mayo-2013\11.lcd

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.295	1638	273	0.014	0.032	0.000
2	6.533	842491	84935	7.285	10.033	1.125
3	7.267	207067	12952	1.791	1.530	2.399
4	8.534	10254653	730676	89.673	86.353	3.716
5	8.952	25511	3040	0.221	0.359	1.528
6	9.285	6923	633	0.060	0.075	1.456
7	9.860	3063	302	0.026	0.036	2.353
8	10.339	4504	388	0.039	0.046	1.669
9	10.966	1011	113	0.009	0.013	1.493
10	11.263	19869	1672	0.172	0.198	0.704
11	12.163	3249	277	0.028	0.033	2.808
12	12.601	8949	634	0.077	0.075	1.260
13	13.175	64563	4611	0.558	0.545	1.337
14	14.548	25602	1634	0.221	0.195	3.520
15	14.932	3069	194	0.027	0.023	0.373
16	15.686	3645	145	0.032	0.017	0.886
17	16.498	13269	439	0.115	0.052	0.980
18	17.209	69318	3153	0.599	0.373	1.027
19	22.337	4496	168	0.039	0.020	3.847
20	22.792	1617	85	0.014	0.010	0.000
Total		11364509	846344	100.000	100.000	

Hora = 4

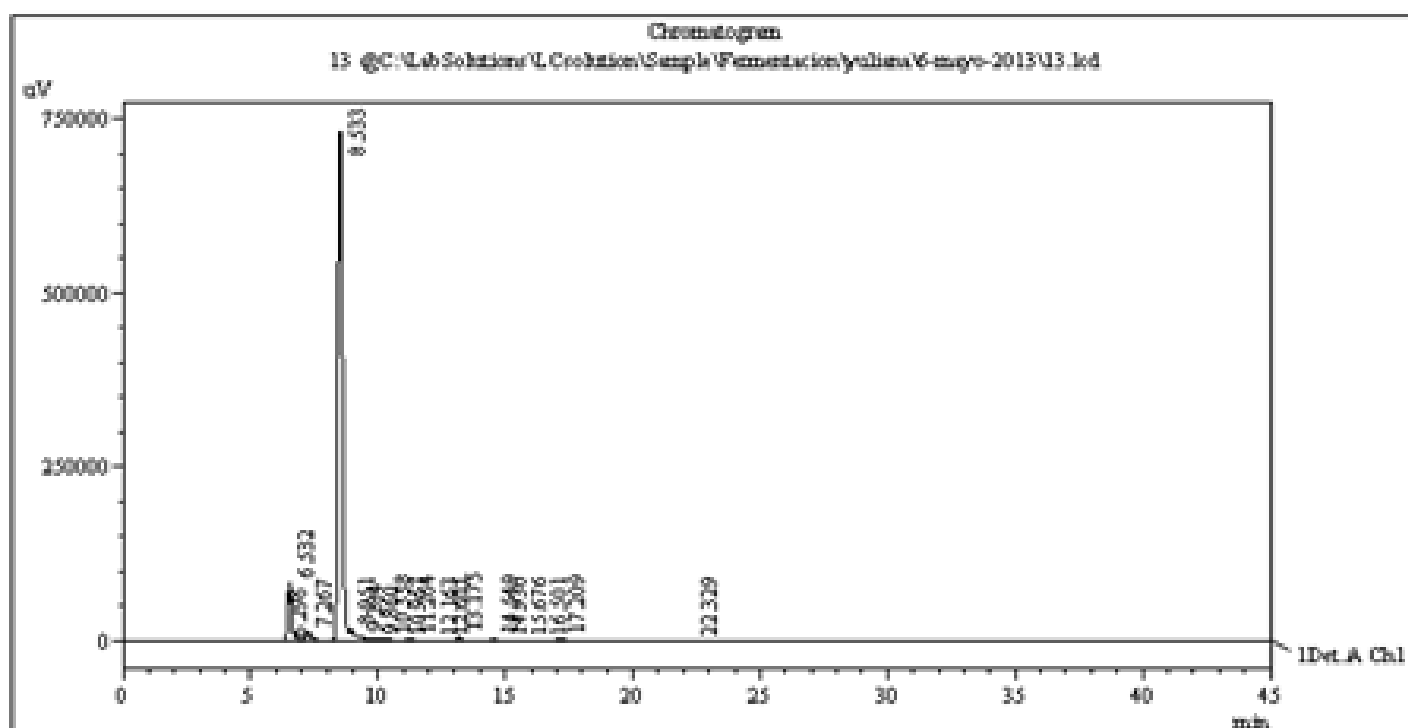


Peak Table @C:\Lab Solutions\L.Crochano\Sample\Fermentacion\yuliana\6-mayo-2013\12.lod

Detector A.Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.300	1954	327	0.017	0.039	0.000
2	6.533	851380	86032	7.303	10.152	1.004
3	7.268	201833	12794	1.730	1.510	2.456
4	8.533	10346393	730852	88.747	86.242	3.770
5	8.932	26407	3156	0.227	0.372	1.324
6	9.204	6917	633	0.039	0.075	1.458
7	9.855	3122	299	0.027	0.033	2.340
8	10.337	4778	405	0.041	0.048	1.668
9	10.965	1053	116	0.009	0.014	1.472
10	11.263	19404	1638	0.166	0.193	0.702
11	12.164	3322	281	0.028	0.033	2.800
12	12.600	8830	623	0.076	0.074	1.247
13	13.174	63422	4330	0.544	0.533	1.539
14	14.548	25848	1673	0.222	0.197	3.523
15	14.933	3066	192	0.026	0.023	0.597
16	15.672	3736	143	0.032	0.017	0.661
17	16.502	12490	422	0.107	0.050	0.746
18	17.209	68754	3165	0.590	0.374	1.033
19	22.329	5908	161	0.051	0.019	3.853
Total		11658358	847443	100.000	100.000	

Hora = 6

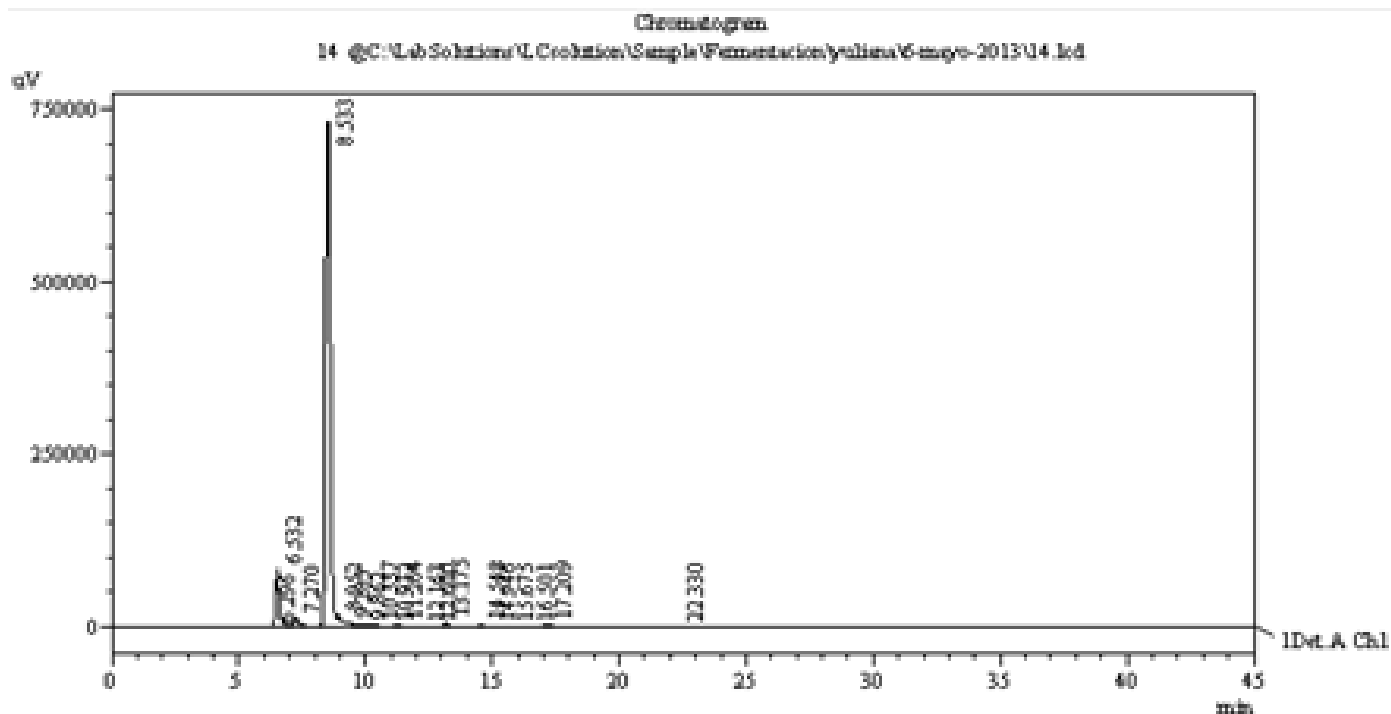


Peak Table @C:\Lab Solutions\L.Crochak\Sample\Fermentacion\yuliana\6-mayo-2013\13.lod

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.296	1698	286	0.015	0.034	0.000
2	6.532	830256	84147	7.241	9.957	1.096
3	7.267	201992	12718	1.762	1.505	2.440
4	8.533	10172787	730425	88.716	86.435	3.762
5	8.951	24469	2912	0.213	0.345	1.536
6	9.264	6399	606	0.058	0.072	1.463
7	9.859	3024	297	0.026	0.033	2.363
8	10.338	4569	394	0.040	0.047	1.669
9	10.967	1094	122	0.010	0.014	1.365
10	11.264	19754	1662	0.172	0.197	0.641
11	12.163	2981	259	0.026	0.031	2.836
12	12.601	8786	625	0.077	0.074	1.275
13	13.175	63044	4635	0.567	0.551	1.345
14	14.349	25338	1639	0.221	0.194	3.528
15	14.930	2997	189	0.026	0.022	0.563
16	15.676	3654	142	0.032	0.017	0.165
17	16.501	12501	425	0.109	0.050	0.184
18	17.209	72296	3383	0.630	0.400	1.045
19	22.329	6843	174	0.060	0.021	5.651
Total		11466882	845061	100.000	100.000	

Hora = 8

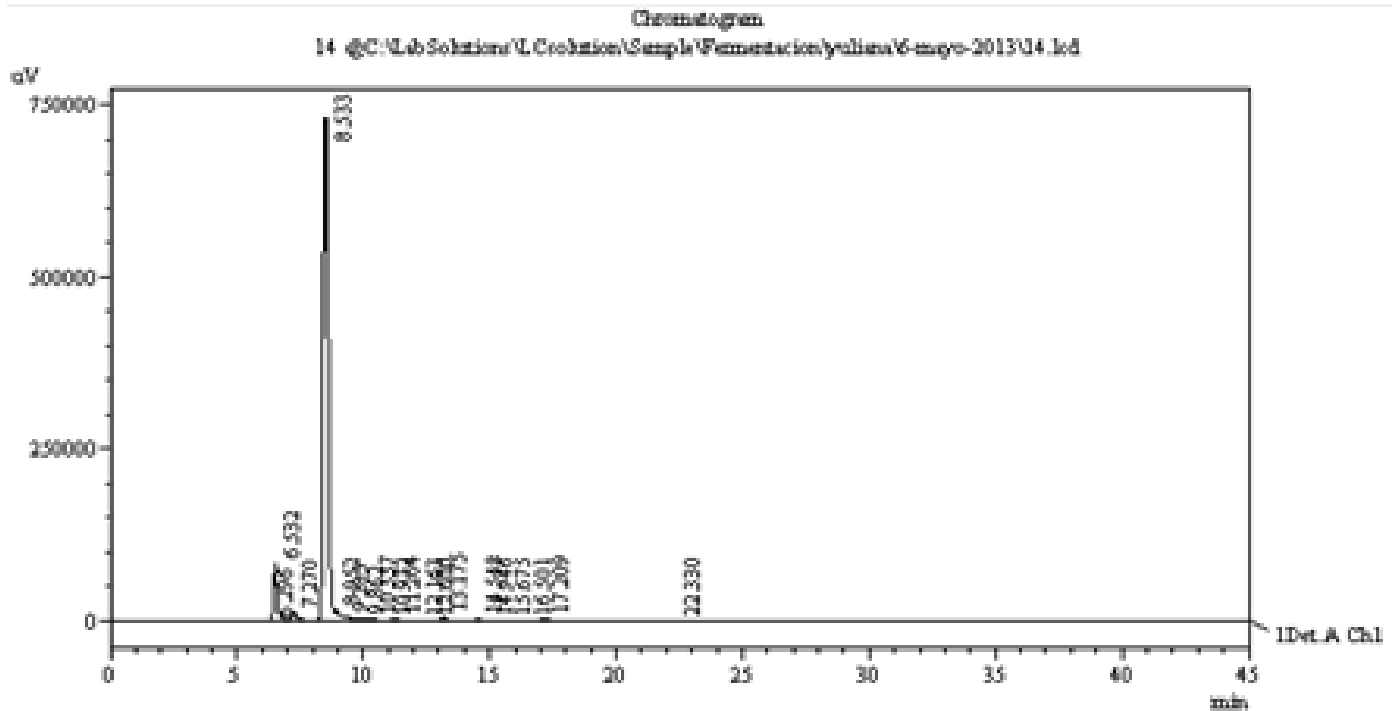


Peak Table @C:\Lab Solutions\L.Crochacion\Sample\Fermentacion\yuliana\6-mayo-2013\14_1.od

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.296	1677	283	0.015	0.033	0.000
2	6.532	826244	83284	7.223	9.865	1.092
3	7.270	194897	12367	1.704	1.465	2.487
4	8.533	10164880	730403	88.859	86.515	3.814
5	8.932	24751	2939	0.216	0.348	1.533
6	9.285	6640	621	0.058	0.074	1.462
7	9.862	2824	283	0.025	0.034	2.396
8	10.337	4674	396	0.041	0.047	1.600
9	10.972	1190	129	0.010	0.015	1.397
10	11.264	19948	1671	0.174	0.198	0.642
11	12.163	2965	256	0.026	0.030	2.816
12	12.600	8644	616	0.076	0.073	1.267
13	13.175	67631	4824	0.591	0.571	1.345
14	14.548	25368	1635	0.222	0.194	3.519
15	14.946	2773	176	0.024	0.021	0.567
16	15.675	2809	141	0.025	0.017	0.960
17	16.501	8169	323	0.071	0.039	1.376
18	17.209	67141	3733	0.587	0.442	1.228
19	22.330	6111	163	0.053	0.020	4.384
Total		11439351	844251	100.000	100.000	

Hora = 10

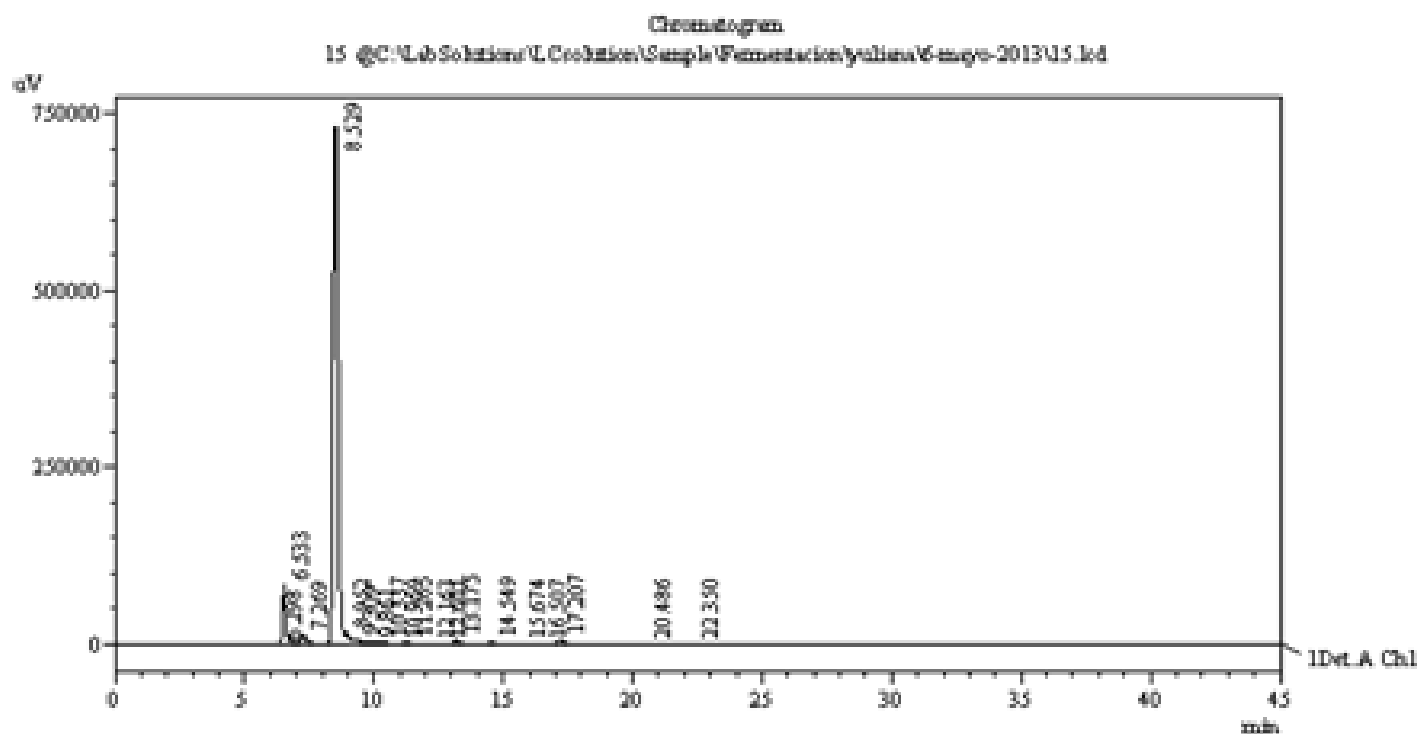


Peak Table @C:\Lab Solutions\L Coelution\Sample\Fermentacion\yuliana\6-mayo-2013\14.lod

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.296	1677	283	0.015	0.033	0.000
2	6.532	826244	83284	7.223	9.865	1.092
3	7.270	194897	12367	1.704	1.465	2.487
4	8.533	10164889	730405	98.859	86.515	3.814
5	8.952	24751	2939	0.216	0.348	1.533
6	9.285	6648	621	0.058	0.074	1.462
7	9.862	2824	283	0.025	0.034	2.396
8	10.337	4674	396	0.041	0.047	1.660
9	10.972	1190	129	0.010	0.015	1.397
10	11.264	19948	1671	0.174	0.198	0.642
11	12.163	2965	256	0.026	0.030	2.816
12	12.600	8644	616	0.076	0.073	1.267
13	13.175	67631	4824	0.591	0.571	1.945
14	14.548	25368	1635	0.222	0.194	3.519
15	14.946	2772	176	0.024	0.021	0.567
16	15.675	2809	141	0.025	0.017	0.960
17	16.501	8169	325	0.071	0.039	1.376
18	17.209	67141	3735	0.587	0.442	1.228
19	22.330	6111	165	0.053	0.020	4.384
Total		11439351	844251	100.000	100.000	

Hora = 12

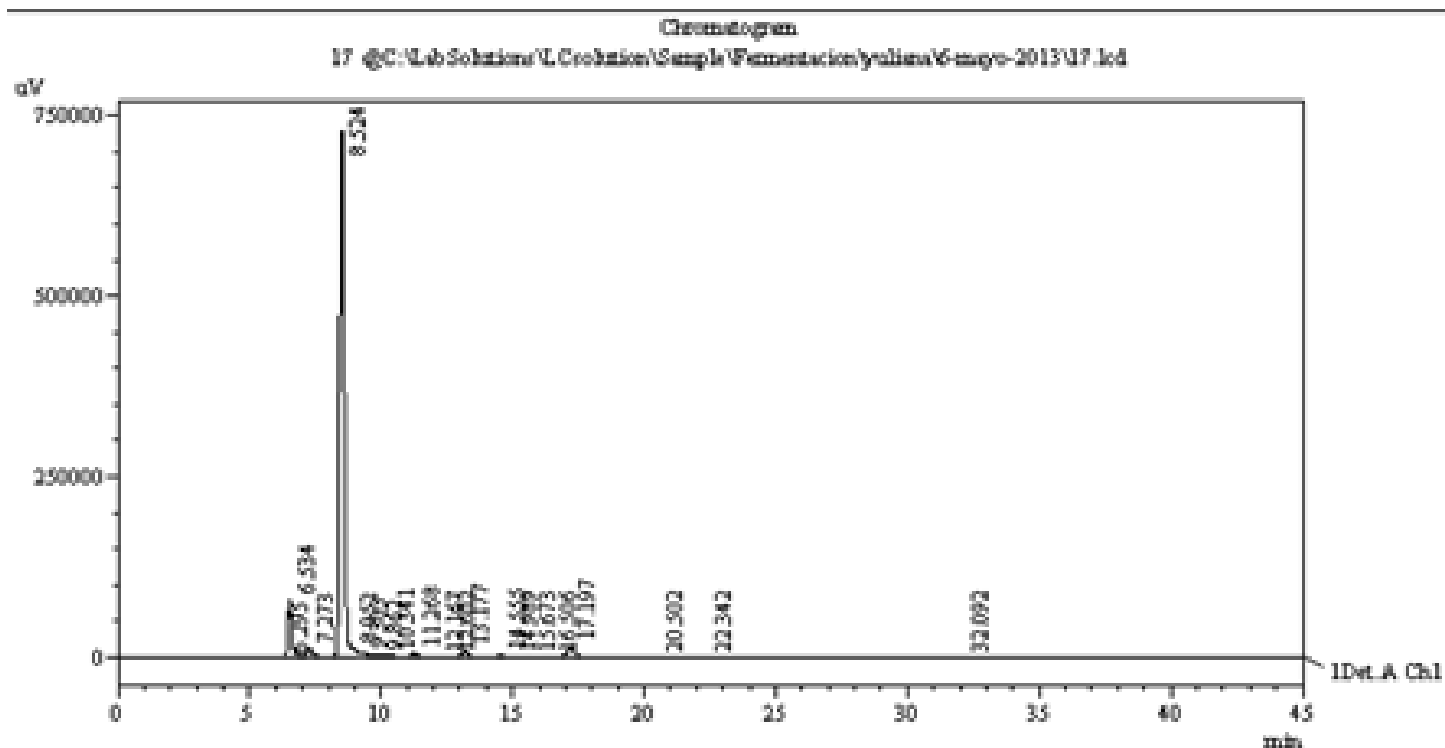


Peak Table @C:\Lab Solutions\L.Croation\Sample\Fermentacion\yuliana\G-mayo-2013\15.lcd

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.298	1775	307	0.016	0.036	0.000
2	6.533	806632	81954	7.116	9.681	1.112
3	7.269	192447	12317	1.698	1.455	2.477
4	8.529	10014860	730359	88.345	96.277	3.804
5	8.952	23678	2820	0.209	0.333	1.557
6	9.309	19166	1901	0.169	0.225	1.435
7	9.861	3046	298	0.027	0.035	2.069
8	10.337	4477	382	0.039	0.045	1.645
9	10.969	1355	149	0.012	0.018	1.360
10	11.265	21579	1799	0.190	0.213	0.646
11	12.163	3160	276	0.028	0.033	2.823
12	12.601	8263	602	0.073	0.071	1.264
13	13.173	75982	5434	0.670	0.642	1.354
14	14.549	22881	1571	0.202	0.186	3.384
15	15.674	5413	229	0.048	0.027	2.282
16	16.507	11932	419	0.105	0.049	1.137
17	17.207	110222	5428	0.972	0.641	1.028
18	20.486	7264	181	0.064	0.021	3.978
19	22.350	1999	102	0.018	0.012	2.234
Total		11336134	846528	100.000	100.000	

Hora = 14

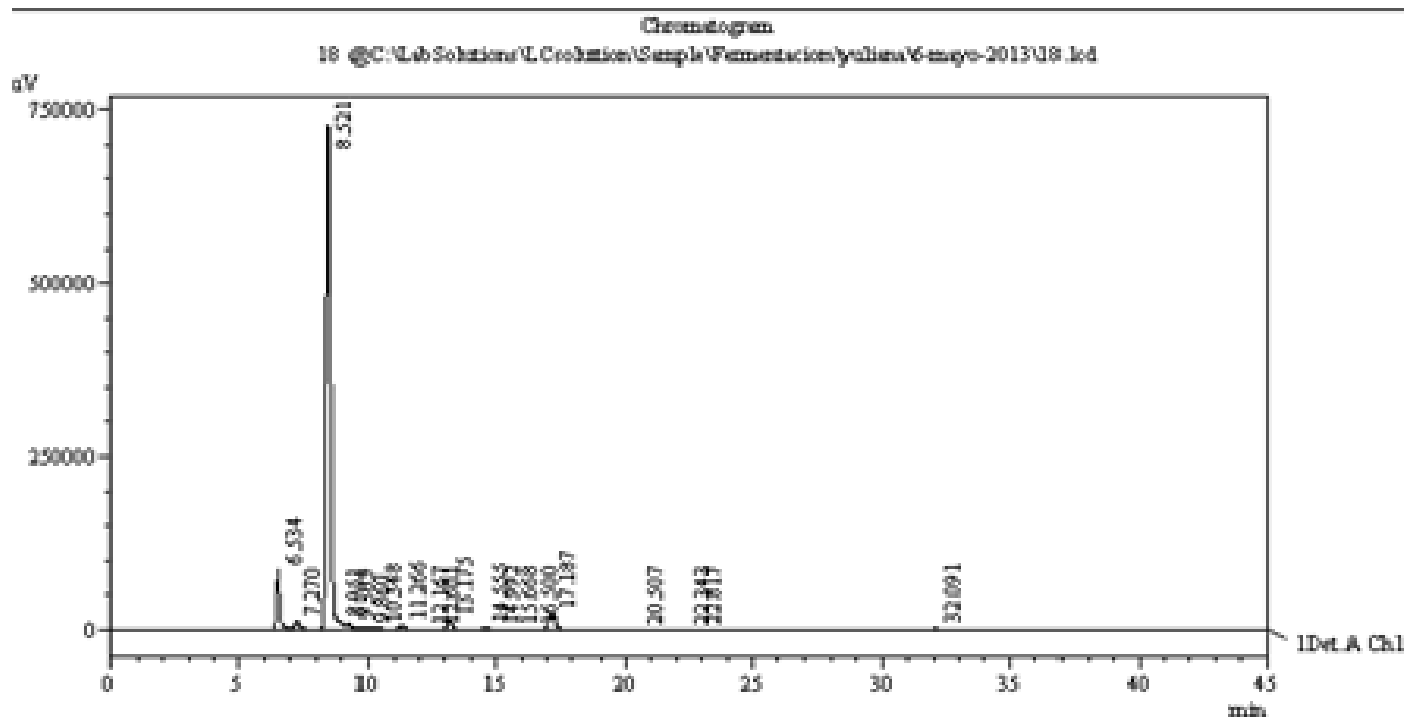


Peak Table @C:\Lab Solutions\L Coeolun\Sample\Fermentacion\yuliana V-mayo-2013\17 lod

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.295	1510	263	0.014	0.031	0.000
2	6.534	805909	80340	7.256	9.338	1.117
3	7.273	198476	12626	1.787	1.468	2.491
4	8.524	9472627	727889	85.284	84.607	3.855
5	8.952	18412	2203	0.166	0.256	1.619
6	9.303	20039	2179	0.180	0.253	1.402
7	9.862	2949	289	0.027	0.034	2.167
8	10.341	5443	398	0.049	0.046	1.534
9	11.268	51840	4207	0.467	0.489	2.674
10	12.167	2927	271	0.026	0.032	2.848
11	12.602	7888	586	0.071	0.068	1.307
12	13.177	138188	9734	1.244	1.131	1.554
13	14.555	26891	1621	0.242	0.188	3.399
14	14.989	7390	453	0.067	0.053	0.808
15	15.673	10039	512	0.091	0.059	1.191
16	16.506	10312	383	0.093	0.043	1.200
17	17.197	287342	15216	2.587	1.769	1.018
18	20.502	15908	438	0.143	0.051	4.604
19	22.342	6037	158	0.054	0.018	1.280
20	32.092	17026	548	0.153	0.064	7.100
Total		11107204	860317	100.000	100.000	

Hora = 16

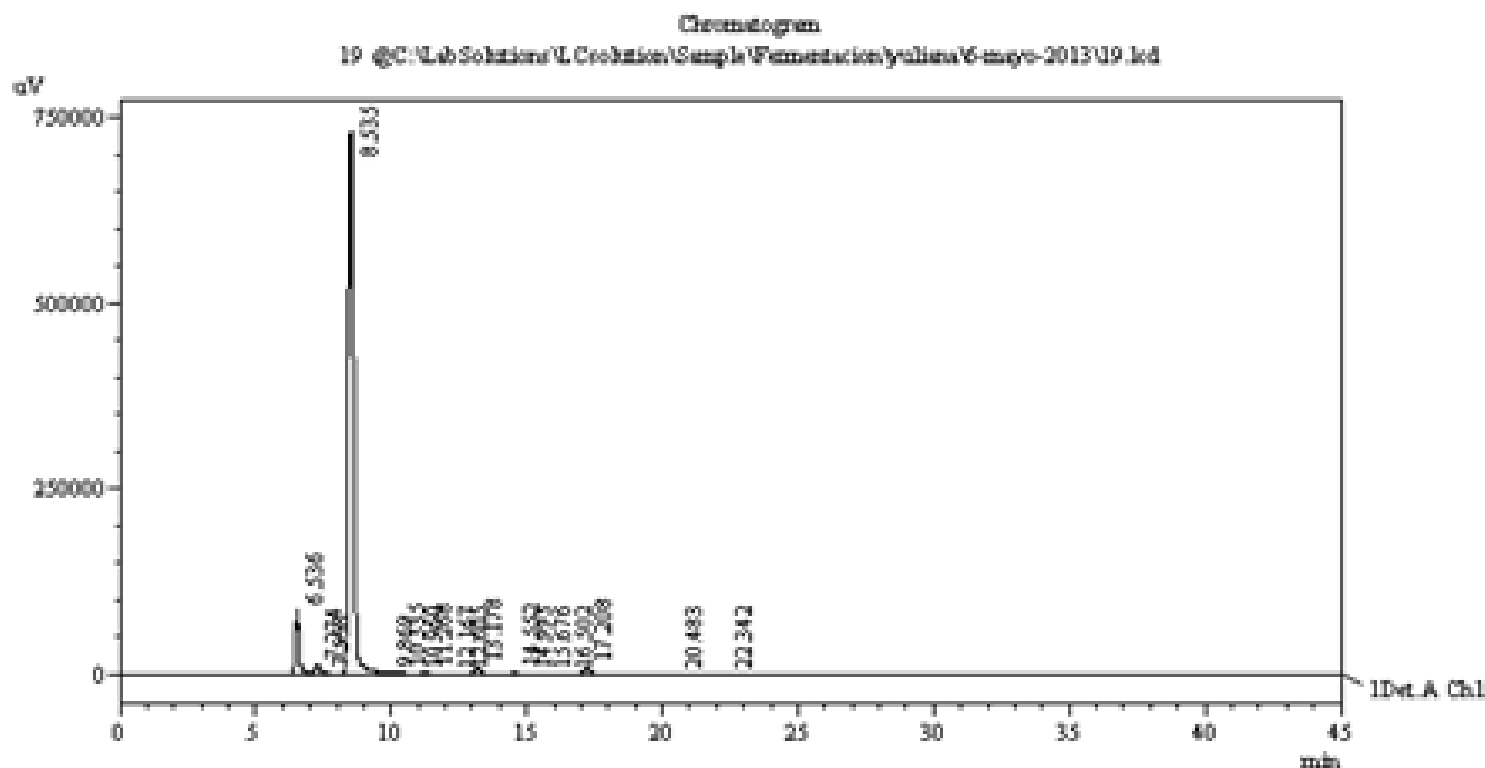


Peak Table @C:\Lab Solutions\L Coevolution\Sample\Fermentacion\yuliana\6-mayo-2013\08.fid

ector A Ch.1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.534	870977	86517	7.652	9.824	0.000
2	7.270	213504	13615	1.876	1.546	2.484
3	8.521	9442065	727830	82.954	82.647	3.857
4	8.951	21057	2500	0.185	0.284	1.613
5	9.305	24658	2682	0.217	0.304	1.473
6	9.860	3305	320	0.036	0.036	2.124
7	10.348	6581	412	0.058	0.047	1.372
8	11.266	73009	3808	0.641	0.666	2.368
9	12.167	3499	314	0.031	0.036	2.857
10	12.601	8233	616	0.072	0.070	1.311
11	13.175	177713	12498	1.561	1.419	1.538
12	14.555	29746	1734	0.261	0.197	3.325
13	14.992	12960	706	0.114	0.089	0.850
14	15.668	12384	698	0.109	0.079	1.283
15	16.500	7066	340	0.069	0.039	1.292
16	17.187	412083	21987	3.620	2.497	1.067
17	20.507	23099	628	0.203	0.071	4.656
18	22.343	4539	169	0.040	0.019	1.217
19	22.817	1729	86	0.015	0.010	0.000
20	32.091	33234	1059	0.292	0.120	0.000
Total		11302262	880670	100.000	100.000	

Hora = 18

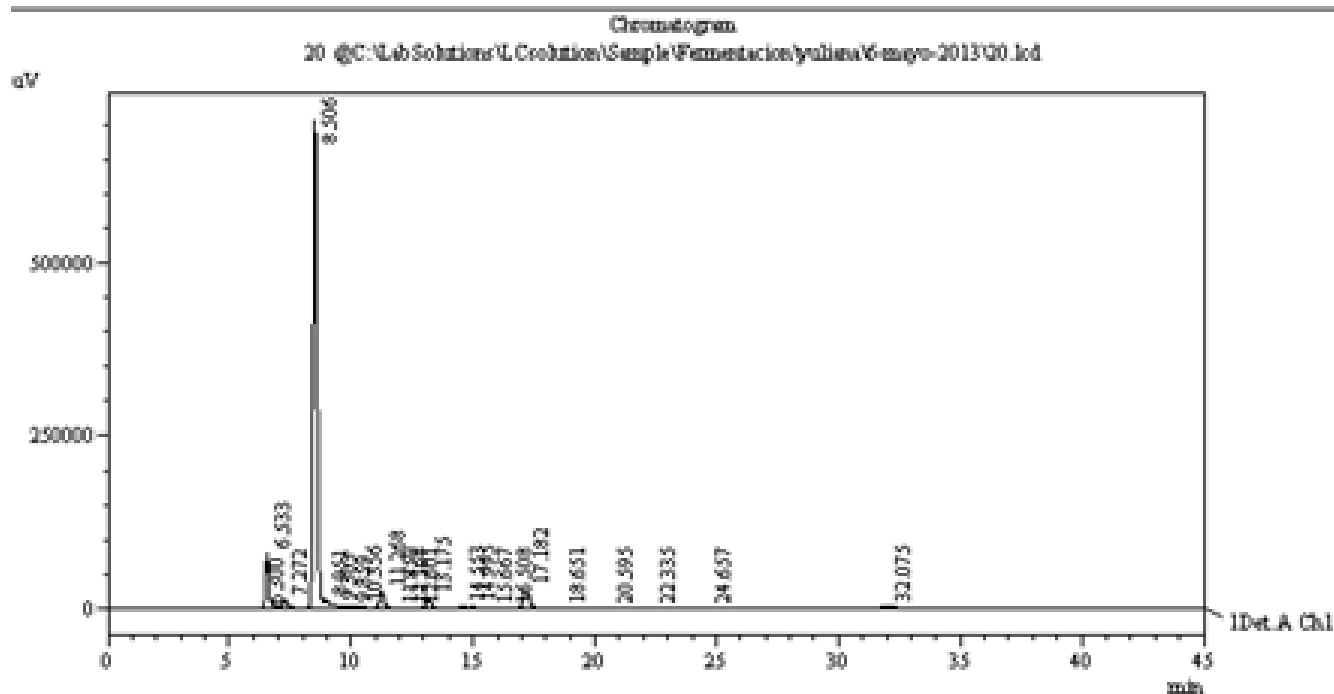


Peak Table @C:\Lab Solutions\1. Creation\Sample\Fermentation\yuliana\6-mayo-2013\19_1ed

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.536	886905	87633	7.514	10.244	0.000
2	7.274	170270	12648	1.443	1.479	2.493
3	7.558	34622	1709	0.293	0.200	0.209
4	8.533	1033499	730730	87.560	85.423	0.722
5	9.869	4137	410	0.035	0.048	4.536
6	10.333	4239	369	0.036	0.043	1.602
7	10.960	1152	124	0.010	0.015	1.630
8	11.268	31183	2608	0.264	0.305	0.794
9	12.167	2870	256	0.024	0.030	2.853
10	12.603	9029	647	0.076	0.076	1.287
11	13.178	104111	7392	0.882	0.864	1.536
12	14.552	26894	1712	0.228	0.200	3.488
13	14.993	3482	175	0.029	0.020	0.694
14	15.676	8341	346	0.071	0.040	0.926
15	16.502	13499	465	0.114	0.054	1.087
16	17.208	153593	7810	1.301	0.913	1.014
17	20.483	7539	221	0.064	0.026	4.573
18	22.342	6450	172	0.055	0.020	1.464
Total		11802838	835427	100.000	100.000	

Hora = 20

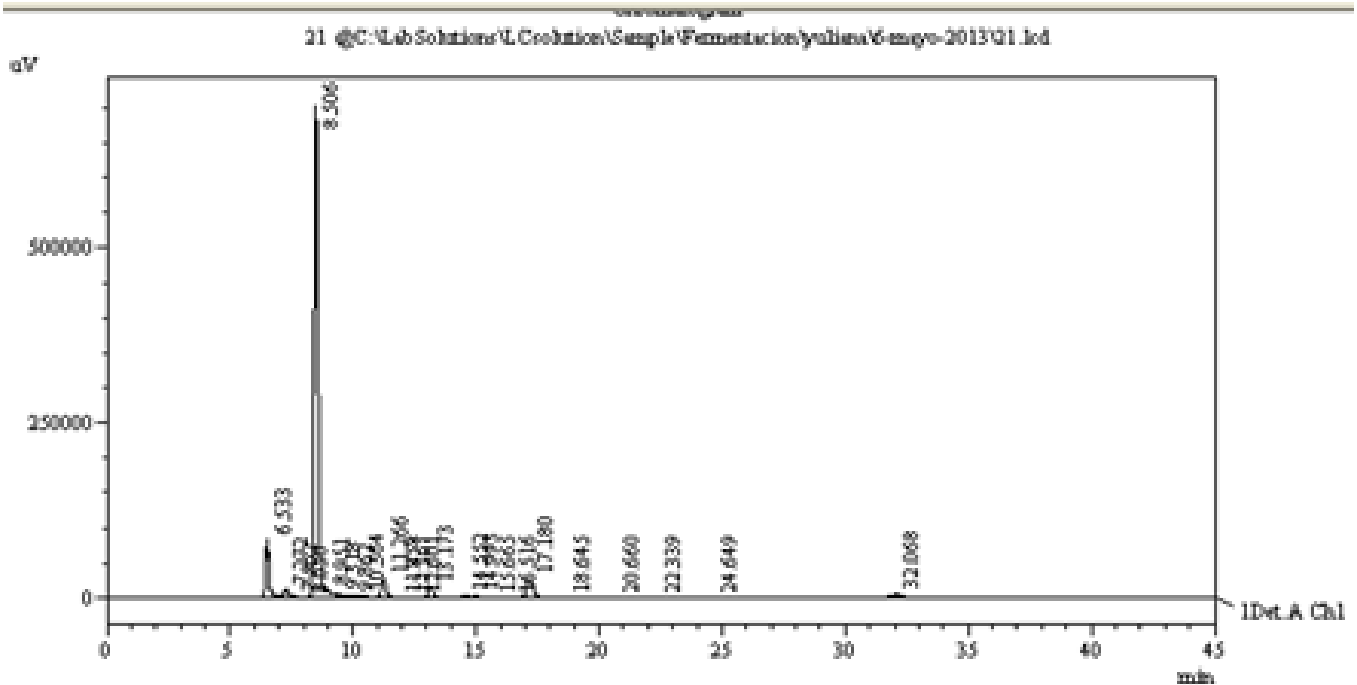


Peak Table @C:\Lab Solutions\L.Croation\Sample\Fermentacion\yuliana V-mayo-2013\Q0.lcd

vector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.300	1671	297	0.016	0.034	0.000
2	6.533	835111	81796	7.847	9.299	0.928
3	7.272	198537	12536	1.866	1.428	2.500
4	8.506	8302957	704458	78.022	80.100	3.894
5	8.951	17946	3104	0.169	0.239	1.696
6	9.303	10024	1012	0.094	0.115	1.444
7	9.859	3808	355	0.036	0.040	2.047
8	10.356	9580	460	0.090	0.052	1.270
9	11.268	305396	24361	2.870	2.770	2.191
10	11.850	1386	140	0.013	0.016	0.459
11	12.168	6276	532	0.059	0.059	0.251
12	12.601	7233	563	0.068	0.064	1.276
13	13.173	212968	15011	2.001	1.707	1.583
14	14.553	28732	1708	0.270	0.194	3.291
15	14.995	23423	1340	0.220	0.152	0.893
16	15.667	14997	837	0.141	0.097	1.339
17	16.508	6046	295	0.064	0.034	1.307
18	17.182	483517	26120	4.544	2.970	1.043
19	18.651	12494	645	0.117	0.073	2.982
20	20.595	30406	777	0.286	0.088	2.704
21	22.335	2114	108	0.020	0.012	2.398
22	24.657	2010	88	0.019	0.010	4.115
23	32.075	124310	3911	1.168	0.445	10.248
Total		10641770	879475	100.000	100.000	

Hora = 22

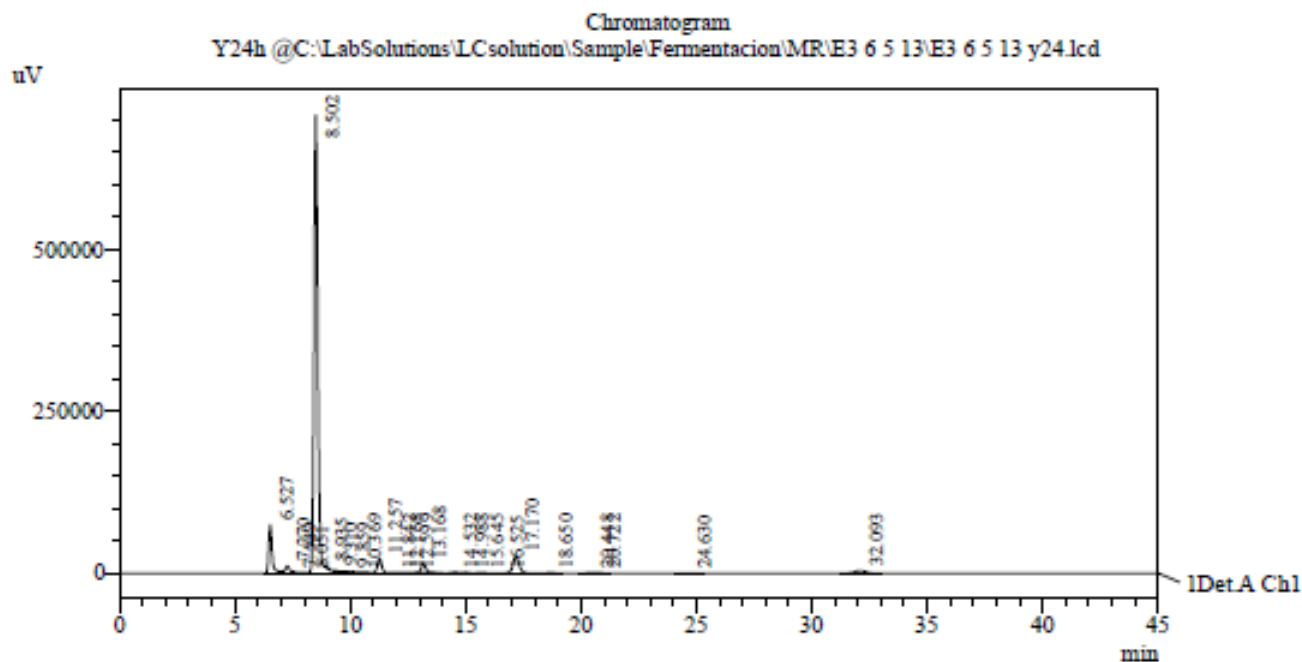


Peak Table @C:\Lab Solutions\L Coevolution\Sample\Fermentacion\yuliana\6-mayo-2013\Q1.lcd

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.533	873053	84140	7.994	9.489	0.000
2	7.272	169182	13483	1.549	1.408	2.468
3	7.562	32650	1819	0.299	0.203	0.318
4	8.050	7823	837	0.072	0.094	0.090
5	8.506	8439459	702333	77.276	79.210	0.094
6	8.951	18896	2203	0.173	0.248	1.686
7	9.318	5193	525	0.048	0.059	1.574
8	9.862	4926	454	0.045	0.051	2.034
9	10.364	10016	479	0.092	0.054	1.270
10	11.266	329274	26304	3.015	2.967	2.182
11	11.858	1973	163	0.018	0.018	0.738
12	12.167	6349	541	0.060	0.061	0.385
13	12.601	7537	572	0.069	0.065	1.263
14	13.173	226783	15924	2.077	1.796	1.562
15	14.552	29821	1766	0.273	0.199	3.263
16	14.993	26938	1480	0.247	0.167	0.876
17	15.663	18611	956	0.170	0.108	1.287
18	16.516	9844	390	0.090	0.044	0.830
19	17.180	504894	27008	4.623	3.046	0.656
20	18.643	14670	737	0.134	0.083	2.951
21	20.660	32033	817	0.293	0.092	2.776
22	22.339	6417	171	0.059	0.019	1.231
23	24.649	3814	153	0.035	0.017	1.877
24	32.068	140882	4419	1.289	0.498	9.797
Total		10921177	886672	100.000	100.000	

Hora = 24



1 Det.A Ch1 /

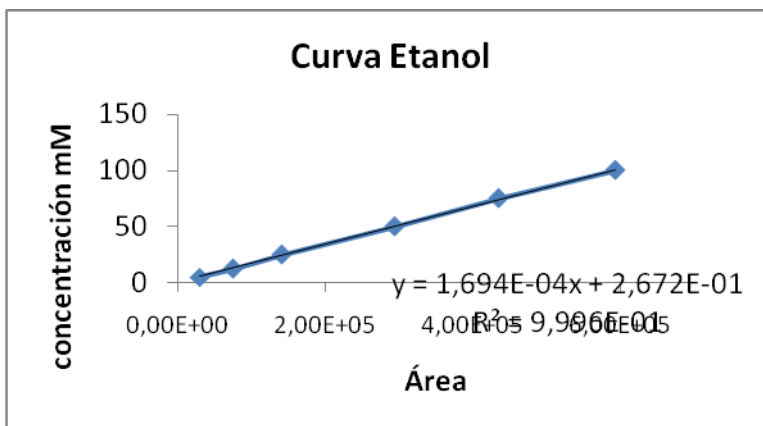
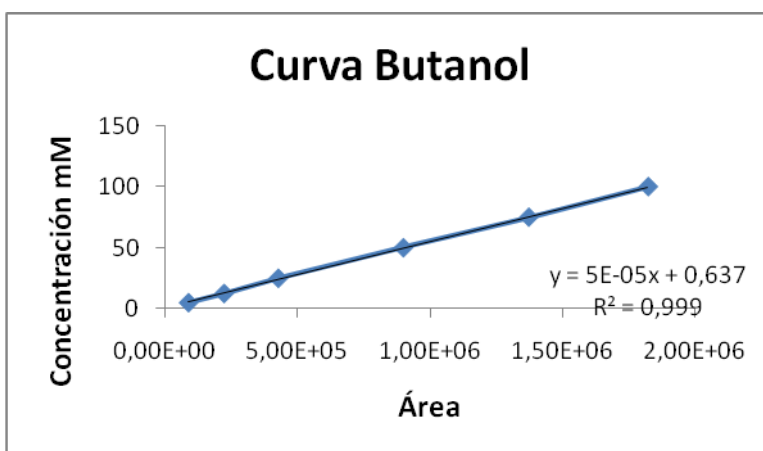
PeakTable @C:\LabSolutions\LCsolution\Sample\Fermentacion\MR\E3 6 5 13\E3 6 5 13 y24.lcd

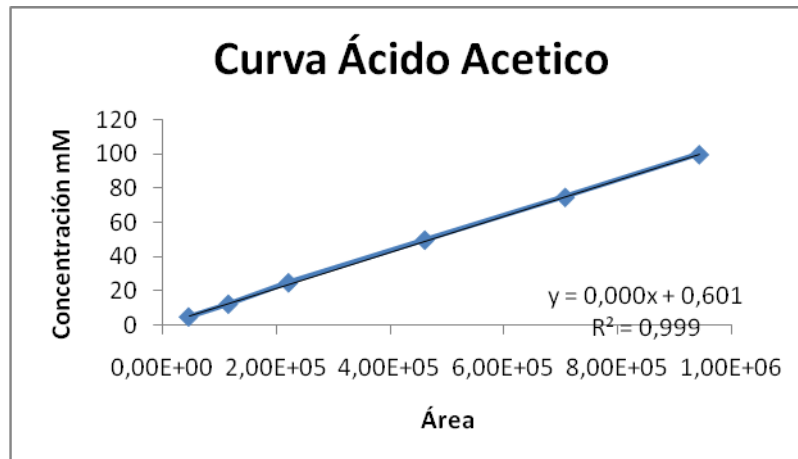
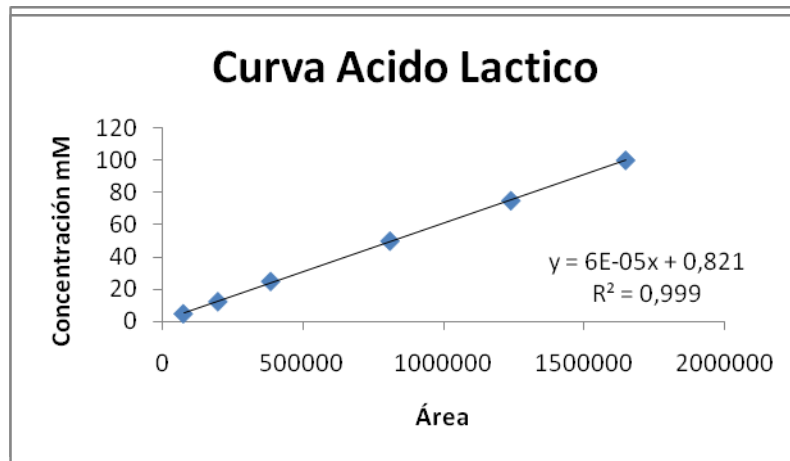
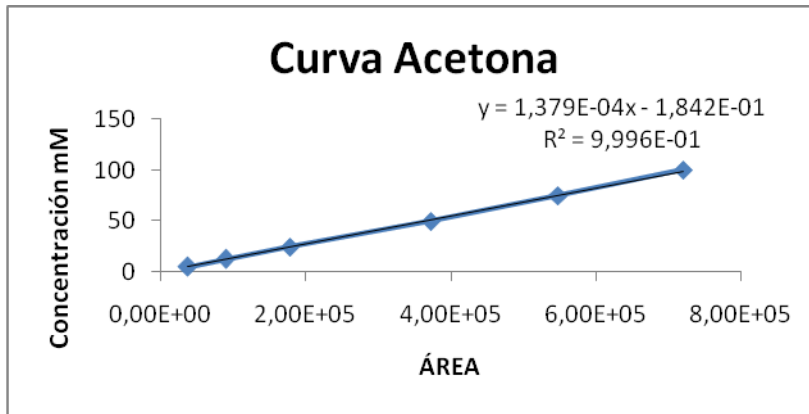
Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Resolution
1	6.527	775239	74674	7.238	8.558	0.000
2	7.270	149644	11074	1.397	1.269	2.475
3	7.539	29359	1854	0.274	0.212	0.312
4	8.051	7443	727	0.069	0.083	0.258
5	8.502	8491981	708237	79.286	81.164	0.312
6	8.935	13023	1479	0.122	0.169	1.713
7	9.310	3426	323	0.032	0.037	1.702
8	9.859	6123	554	0.057	0.063	2.035
9	10.369	8675	424	0.081	0.049	1.282
10	11.257	279590	22235	2.610	2.548	2.151
11	11.842	1231	108	0.011	0.012	1.094
12	12.168	5535	470	0.052	0.054	0.617
13	12.599	4242	347	0.040	0.040	1.306
14	13.168	201760	14116	1.884	1.618	1.591
15	14.532	27337	1625	0.255	0.186	3.248
16	14.988	23352	1254	0.218	0.144	0.908
17	15.645	17738	889	0.166	0.102	1.242
18	16.525	7425	279	0.069	0.032	0.000
19	17.170	485802	25805	4.536	2.957	0.000
20	18.650	14555	750	0.136	0.086	2.985
21	20.448	15016	687	0.140	0.079	1.348
22	20.722	14507	687	0.135	0.079	0.131
23	24.630	4906	155	0.046	0.018	2.756
24	32.093	122651	3846	1.145	0.441	9.009
Total		10710560	872600	100.000	100.000	

7. Curvas de calibración para los patrones de HPLC

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





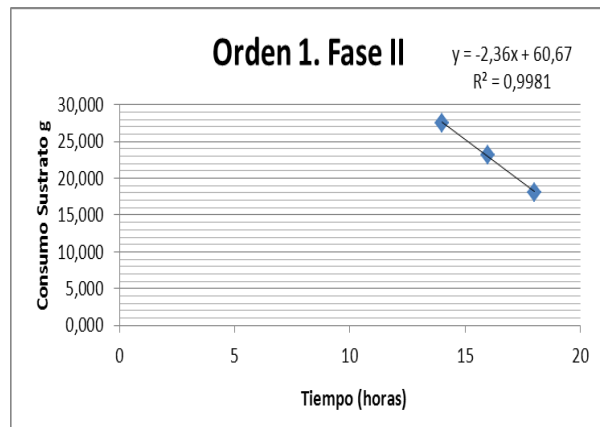
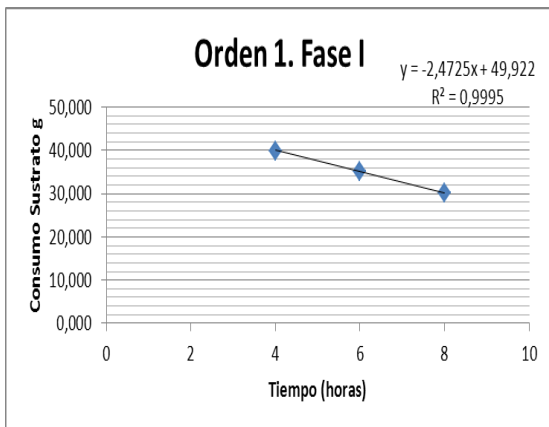
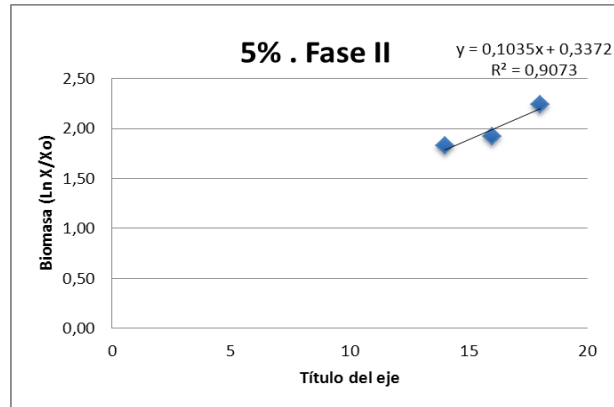
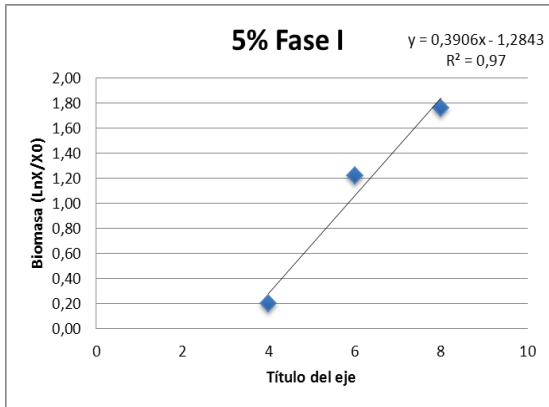
8. Promedio de las concentraciones en g/L para los metabolitos.

Tiempo (h)	Acido Acético (g/L)						Acido Butírico (g/L)					
	5%	Desv est	10%	Desv est	15%	Desv est	5%	Desv est	10%	Desv est	15%	Desv est
0	0,072	0,001	0,234	0,02	0,271	0,001	0	0	0,827	0,002	0,309	0,001
2	0,064	0,002	0,215	0,001	0,282	0,002	0,037	0,001	0,195	0,001	0,333	0,002
4	0,062	0,001	0,209	0,003	0,278	0,01	0,063	0,003	0,258	0,003	0,33	0,002
6	0,22	0,001	0,291	0,001	0,284	0,005	0	0	0,351	0,002	0,346	0,001
8	0,065	0,003	0,23	0,003	0,293	0,004	0,38	0,002	0,259	0,001	0,323	0,003
10	0,417	0,002	0,493	0,001	0,323	0,001	0,999	0,001	1,018	0,003	0,513	0,001
12	0,593	0,03	0,472	0,002	0,502	0,002	1,77	0,02	1,189	0,002	1,102	0,001
14	0,717	0,001	0,55	0,005	0,547	0,003	2,045	0,001	1,505	0,01	1,293	0,002
16	0,805	0,003	0,734	0,006	0,69	0,001	2,443	0,001	2,115	0,002	1,843	0,003
18	0,88	0,004	0,662	0,005	0,817	0,001	2,106	0,002	1,95	0,002	2,157	0,01
20	0,861	0,001	0,776	0,001	0,866	0,003	2,476	0,02	2,167	0,001	2,251	0,001
22	0,897	0,002	0,812	0,002	0,902	0,002	2,52	0,001	2,185	0,002	2,273	0,001
24	0,969	0,003	0,848	0,001	0,913	0,01	2,564	0,001	2,211	0,003	2,296	0,002

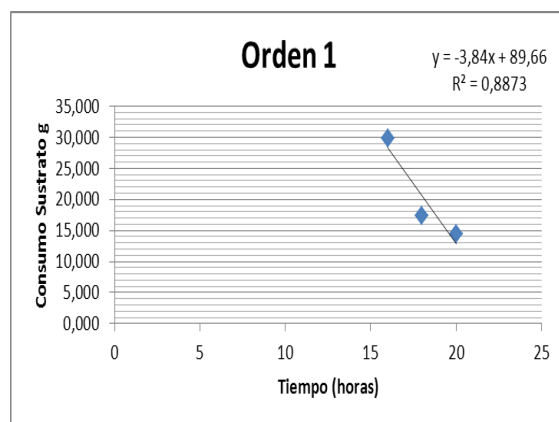
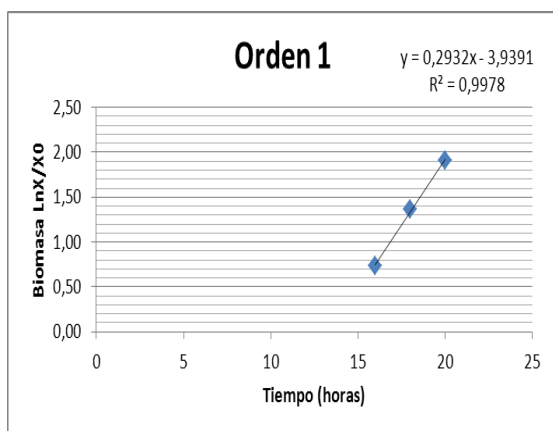
Tiempo (h)	Acetona						Butanol					
	5%	Desv est	10%	Desv est	15%	Desv est	5%	Desv est	10%	Desv est	15%	Desv est
0	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-
2	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-
4	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-
6	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-	N.D	-
8	N.D	-	N.D	-	N.D	-	0,055	0,001	N.D	-	N.D	-
10	N.D	-	N.D	-	N.D	-	0,071	0,002	0,058	0,002	N.D	-
12	N.D	-	N.D	-	N.D	-	0,094	0,003	0,08	0,001	0,085	0,002
14	0,027	0,001	N.D	-	N.D	-	0,214	0,01	0,1	0,001	0,11	0,001
16	0,048	0,002	N.D	-	N.D	-	0,127	0,02	0,15	0,002	0,17	0,001
18	0,033	0,003	0,037	0,003	0,111	0,001	0,255	0,03	0,366	0,003	0,508	0,001
20	0,05	0,001	0,127	0,001	0,128	0,002	0,281	0,002	0,502	0,004	0,569	0,004
22	0,051	0,002	0,13	0,02	0,131	0,002	0,283	0,001	0,521	0,005	0,591	0,003
24	0,055	0,001	0,133	0,002	0,132	0,003	0,284	0,005	0,528	0,003	0,609	0,002

9. Graficas de las cinéticas de Orden 1 y Orden 0 de los tres experimentos.

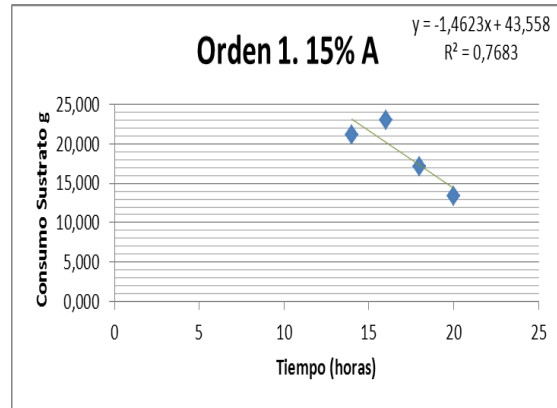
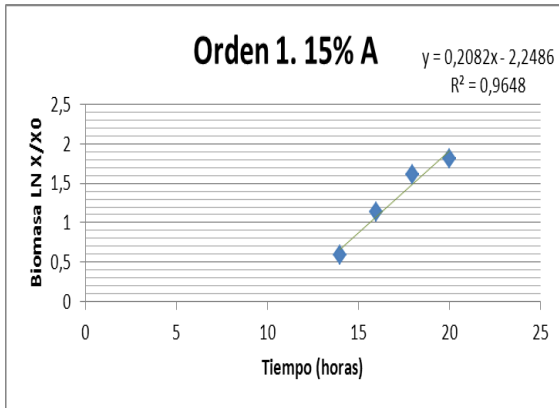
Cinética Orden 1 para la concentración 5% de inóculo



Cinética Orden 1 para la concentración 10% de inóculo



Cinética Orden 1 para la concentración 15% de inóculo



10. Cálculo de los parámetros cinéticos

Velocidad específica de crecimiento - μ_x (h^{-1}) = a la pendiente de la ecuación de la recta en la gráfica de cinética de Orden 1.

Tiempo de duplicación t_d (h) = $\ln 2 / \mu_x$

Sustrato consumido g/L = sustrato inicial – sustrato final

Rendimiento producto – sustrato (g/L) = $\frac{\text{producto final} - \text{producto inicial}}{\text{Sustrato inicial} - \text{sustrato final}}$

Productividad (g/h) = $\frac{\text{producto final}}{\text{Tiempo fina}}$

11. Resultados estadísticos – ANOVA

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
RendButanol	Inter-grupos	.000	2	.000	1920.219	.000
	Intra-grupos	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
ProdButanol	Inter-grupos	.000	2	.000	1145.748	.000
	Intra-grupos	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
RendAcetona	Inter-grupos	.000	2	.000	2209.723	.000
	Intra-grupos	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
ProducAcetona	Inter-grupos	.000	2	.000	1200.500	.000
	Intra-grupos	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
RendAsButirico	Inter-grupos	.003	2	.002	13687.000	.000
	Intra-grupos	.000	6	.000		
	Total	.003	8			
ProducAcButirico	Inter-grupos	.000	2	.000	2960.592	.000
	Intra-grupos	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
RendAcAcetico	Inter-grupos	.000	2	.000	61.012	.000
	Intra-grupos	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
ProductAcAcetico	Inter-grupos	.000	2	.000	646.750	.000
	Intra-grupos	.000	6	.000		
	Total	.000	8			

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Velocmax	Inter-grupos	.137	3	.046	4580.051	.000
	Intra-grupos	.000	8	.000		
	Total	.137	11			
Td	Inter-grupos	43.582	3	14.527	13351.349	.000
	Intra-grupos	.009	8	.001		
	Total	43.591	11			
Sustconsu	Inter-grupos	97.062	3	32.354	800.255	.000
	Intra-grupos	.323	8	.040		
	Total	97.386	11			
Velconsu	Inter-grupos	7.374	3	2.458	124.127	.000
	Intra-grupos	.158	8	.020		
	Total	7.532	11			