



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

“Sistemas de electrofermentación para la producción de biobutanol a partir de *Clostridium acetobutylicum*”

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de
Maestra en Ciencias de la Energía

Presenta:
QFB. Claudia Odette Flores Pérez

Dirigida por
Dr. Aldo Amaro Reyes

Querétaro, Qro. a octubre 2022



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Sistemas de electrofermentación para la producción
de biobutanol a partir de *Clostridium acetobutylicum*

por

Claudia Odette Flores Pérez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-221421



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencias de la Energía

Sistemas de electrofermentación para la producción de biobutanol a partir de
Clostridium acetobutylicum

Que como para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias de la Energía

Presenta
QFB. Claudia Odette Flores Pérez

Dirigido por:
Dr. Aldo Amaro Reyes

Dr. Aldo Amaro Reyes
Presidente

Dr. Jorge Gracida Rodríguez
Secretario

Dr. Rufino Nava Mendoza
Vocal

Dr. Adrián Sosa Domínguez
Suplente

Dr. Julio Armando De Lira Flores
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
octubre de 2022
México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A mi asesor y sinodales por las observaciones y aportaciones brindadas durante este periodo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitirme realizar este proyecto en sus instalaciones.

Agradezco el apoyo de aquellos profesores que estuvieron en la amable disposición de atender mis dudas y proponerme soluciones durante los momentos oscuros de este proceso.

A mis amigos, a los que siempre han estado a mi lado y a los que hice en el posgrado por soportar mis quejas durante estos dos años y siempre intentar motivarme.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	4
ÍNDICE DE CUADROS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Panorama mundial	5
2.2 Alternativas energéticas	6
2.2.1. Biocombustibles	7
2.2.2. Biobutanol	7
2.3. Proceso de fermentación ABE	9
2.3.2. <i>Clostridium acetobutylicum</i>	11
2.3.3. Metabolismo de la producción de butanol	12
2.4 Electrofermentación	14
2.5 Aplicación de campos magnéticos	18
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVO GENERAL	21
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1 Material biológico	22
6.2 Experimentos preliminares	22
6.2.1 Preinóculo	22
6.2.2 Inóculo	22

6.3 Efecto de la relación carbono nitrógeno sobre la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando <i>Clostridium acetobutylicum</i>	22
6.4 Comparación de la producción de biomasa y consumo de sustrato por <i>Clostridium acetobutylicum</i> bajo el efecto de diferentes sistemas de electrofermentación.	23
6.4.1 Reactor de fermentación electroestática	23
6.4.2 Reactor de fermentación electroestática modificado	24
6.4.3 Reactor 3. Campo magnético generado a partir de una bobina	25
6.4.4 Reactor 4. Celda electrolítica con electrodos de acero inoxidable	25
6.4.5 Reactor 5. Celda electrolítica con electrodos de grafito	26
6.5 Métodos analíticos	27
6.5.1 Cuantificación de biomasa	27
6.5.2 Determinación de sustrato consumido	27
6.5.3 Determinación de la presencia de butanol y ácido butírico	27
6.6 Análisis estadístico	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
7.1 Efecto de la relación C/N sobre la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando <i>Clostridium acetobutylicum</i>	29
7.2 Comparación de la producción de biomasa y consumo de sustrato por <i>Clostridium acetobutylicum</i> bajo el efecto de diferentes sistemas de electrofermentación	30
7.3 Evaluación del efecto de un campo magnético a partir de un embobinado, en el crecimiento y producción de biobutanol en <i>Clostridium acetobutylicum</i>	31
7.4 Efecto del potencial constante aplicado al sistema de electrofermentación, así como su aplicación en dos diferentes etapas del ciclo de crecimiento de <i>Clostridium acetobutylicum</i> sobre la producción de biobutanol.	34
7 CONCLUSIONES	44
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
9. ANEXOS	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Comparación de las propiedades fisicoquímicas de algunos combustibles	8
Cuadro 2	Ejemplos donde se ha obtenido butanol por fermentación ABE	11
Cuadro 3	Ejemplos donde se ha utilizado la electrofermentación para producción de metabolitos de interés.	17
Cuadro 4	Cantidades de glucosa y sulfato de amonio para las distintas relaciones carbono/nitrógeno	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Producción mundial de petróleo por tipo en el escenario de nuevas políticas. Tomada de World Energy Outlook 2010	6
Figura 2	Estructura química del butanol	8
Figura 3	Ruta metabólica que conduce a la producción de etanol	9
Figura 4	Ciclo de vida de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	12
Figura 5	Ruta metabólica de <i>C. acetobutylicum</i>	14
Figura 6	Sistema de electro-fermentación	16
Figura 7	Estructura química del NADH	17
Figura 8	Generación de un campo magnético por una bobina	18
Figura 9	<i>Canales iónicos dependientes de voltaje</i>	19
Figura 10	Reactor 1. Sistema de fermentación electroestática	24
Figura 11	Reactor 2. Modificación del reactor de fermentación electroestática	24
Figura 12	Reactor 3. Bobina.	25
Figura 13	Reactor 4. Sistema de electrofermentación con electrodos de acero inoxidable	26
Figura 14	Reactor 5. Sistema de electrofermentación con electrodos de grafito.	26
Figura 15	Rendimiento a distintas relaciones C/N y concentraciones de glucosa	30
Figura 16	Biomasa obtenida de <i>Clostridium acetobutylicum</i> después de 120 horas en el Reactor 1 a 10, 20 y 30 V	31
Figura 17	Rendimiento de <i>Clostridium acetobutylicum</i> después de 120 horas en el reactor 1 a 10, 20 y 30 V	31
Figura 18	Biomasa generada contra consumo de glucosa en la fase exponencial en el reactor 2.	32
Figura 19	Biomasa generada contra consumo de glucosa en la fase exponencial en el reactor 3.	34

Figura 20	Ejemplo de la formación de un depósito en el reactor 4	35
Figura 21	Biomasa generada contra consumo de glucosa en la fase exponencial en el reactor 5	36
Figura 22	Rendimientos de los sistemas de electrofermentación y sus controles.	37
Figura 23	Biomasa generada contra consumo de glucosa en fase exponencial y estacionaria en el reactor 5	38
Figura 24	Valores de pH del medio de cultivo	39
Figura 25	Cromatograma de la mezcla de estándares	40
Figura 26	Cromatogramas	42
Figura 27	Áreas de las señales del butirato/butanol	43

RESUMEN

Los biocombustibles ayudan a reducir las emisiones de gases contaminantes en contraste con los combustibles fósiles. Sin embargo, estos procesos aún no pueden competir en el mercado energético debido a su elevado costo de producción, de ahí el interés por aumentar su rendimiento y los sistemas bioelectroquímicos son una estrategia emergente para eficientar la producción. El presente trabajo se centró en la generación de biomasa, aprovechamiento del sustrato y producción de biobutanol a partir de distintos sistemas que puedan modular el metabolismo de *C. acetobutylicum*. La bacteria fue crecida en medios definidos con distintas relaciones carbono-nitrógeno (C/N) para encontrar el mejor rendimiento, resultando la concentración de 20 g/L de glucosa con una C/N de 15. Dicho medio fue empleado en 5 diferentes reactores. Se probó la influencia de campos electromagnéticos débiles a partir de un embobinado de cobre y el uso de celdas electrolíticas con electrodos de acero inoxidable y de grafito con un potencial constante de 0.4 V. El sistema generador de campos magnéticos tuvo un efecto negativo en el crecimiento bacteriano mientras que la celda electrolítica con los electrodos de acero inoxidable generó reacciones indeseables a partir de los componentes del medio inhibiendo el crecimiento bacteriano. El sistema con mejores resultados consistió en la celda con electrodos de grafito en donde se encontró un incremento de 2.05 veces en la producción de butanol además de, acelerar la conversión del butirato a butanol en las primeras 12 horas de fermentación. Se comprobó la modulación del metabolismo de *C. acetobutylicum* en sentido favorable mediante la electrofermentación con electrodos de grafito.

Palabras clave: Biocombustibles, biobutanol, electro-fermentación, campo magnético, *Clostridium acetobutylicum*.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presente en el documento.



Q.F.B. Claudia Odette Flores Pérez

ABSTRACT

Biofuels help reduce polluting gas emissions in contrast to fossil fuels. However, these processes still cannot compete in the energy market due to their high production cost, hence the interest in increasing their performance and bioelectrochemical systems are an emerging strategy to make production more efficient. The present work focused on biomass generation, substrate utilization and biobutanol production from different systems that can modulate the metabolism of *C. acetobutylicum*. The bacteria were grown in defined media with different carbon-to-nitrogen (C/N) ratios to find the best performance, resulting in a concentration of 20 g/L of glucose with a C/N of 15. The influence of weak electromagnetic fields from a copper winding and the use of electrolytic cells with stainless steel and graphite electrodes with a constant potential of 0.4 V were tested. The magnetic field generator system had a negative effect on bacterial growth while the electrolytic cell with stainless steel electrodes generated undesirable reactions from the medium components inhibiting bacterial growth. The system with the best results consisted of the cell with graphite electrodes where a 2.05-fold increase in butanol production was found, in addition to accelerating the conversion of butyrate to butanol in the first 12 hours of fermentation. The modulation of the metabolism of *C. acetobutylicum* in a favorable direction was verified by electrofermentation with graphite electrodes.

Keywords: Biofuels, biobutanol, electro-fermentation, magnetic field, *Clostridium acetobutylicum*.

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La creciente demanda de energía y la inminente disminución de los combustibles fósiles responsables del daño ecológico, ha obligado a dirigir la atención de científicos, empresarios y políticos al desarrollo de tecnologías limpias capaces de aprovechar los recursos naturales de manera más eficiente y sostenible (Bhatt et al., 2018). El daño atmosférico causado por las emisiones de CO₂ entre otros gases contaminantes, liberadas por el sector industrial y el del transporte se está intentando subsanar con el uso de biocombustibles, los cuales se mezclan en determinadas proporciones con gasolina o de forma pura (Smith y Workman, 2014).

Los biocombustibles son aquellos obtenidos a través de la biomasa, aprovechando la energía intrínseca de ciertos microorganismos o especies vegetales. De los cuales podemos producir u obtener compuestos como alcoholes o aceites que fácilmente pueden ser combustibles para motores de combustión interna, con la ventaja de ser biodegradables, tener una combustión completa, es decir, más eficiente generando menos CO y provenir de recursos renovables (Ho et al., 2014).

La forma de obtener bioetanol y biobutanol, entre otros es por medio de la fermentación de azúcares, es decir, la descomposición de estas moléculas por medio de las enzimas de ciertos microorganismos (hongos o bacterias). La manera en que los azúcares se descomponen para dar lugar a la formación de alcoholes está mediada por reacciones de óxido-reducción de los cofactores presentes en las enzimas que intervienen en el proceso. Al ser la transferencia de electrones de los principales parámetros para regular la cinética de las biotransformaciones, se han diseñado experimentos para introducir corriente eléctrica en caldos fermentativos para potenciar la producción de los metabolitos de interés. En la última década se ha introducido el concepto de sistemas bioelectroquímicos los cuales van encaminados a poder aumentar la rentabilidad del proceso aumentando su productividad (Bhagchandani et al., 2020; Liu y Yu, 2020).

Debido a la alta tasa de emisiones de CO₂ y su negativo impacto ambiental, muchos países se han involucrado para poder dar un paso atrás a las consecuencias del cambio climático y subsanar de alguna manera el deterioro al medio ambiente. En

los últimos años se han establecido pactos o acuerdos como “Los acuerdos de Paris” o “Los 17 objetivos de la sustentabilidad”. En los que poco a poco se hacen compromisos para abandonar lentamente los combustibles fósiles e ir adoptando en la medida de lo posible, alternativas energéticas, las cuales puedan seguir asistiendo las necesidades de la población de manera satisfactoria. Ello implica que, las instituciones de investigación y de los países comiencen a redirigir sus esfuerzos en el entendimiento, innovación y desarrollo de tecnologías productoras de energías más limpias (Carriquiry, 2010).

Una de las opciones, sobre todo en el caso de la necesidad de transporte, son los biocombustibles, los cuales emiten menos contaminantes atmosféricos y cumplen con un ciclo cerrado del carbono. Pueden utilizarse en mezclas con gasolina o directamente en motores de combustión interna como el caso del butanol. Esto último debido a las semejanzas que tiene con la gasolina en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas (Costa y de Morais, 2011). Lamentablemente su producción aún no puede competir con el mercado petroquímico y es por eso por lo que se están buscando estrategias para mejorar el rendimiento de su producción. Un ejemplo es someter a las bacterias butanogénicas a un estrés físico como la aplicación de voltaje que permita modular el ambiente oxido-reductor requerido para su producción (Moscoviz et al., 2018).

Por estas razones la propuesta de este trabajo fue la aplicación de nuevas técnicas como la electro-fermentación para la producción de biobutanol. Así como la búsqueda de medios de cultivo con la mejor relación carbono/nitrógeno en la cual *Clostridium acetobutylicum* aumente su producción de biobutanol.

2. ANTECEDENTES

2.1 Panorama mundial

Actualmente, el 80 % de la energía consumida por el mundo es obtenida a partir de combustibles fósiles, sólo el sector del transporte consume el 58 % de los combustibles fósiles (Bharathiraja et al., 2017). Tales combustibles fósiles como el petróleo o el gas metano son recursos finitos y no renovables en escalas cortas de tiempo, por lo que el agotamiento de estas fuentes de energía es un hecho.

La teoría del pico de Hubert que predice la tasa de agotamiento del petróleo a largo plazo es la más aceptada. Dicha teoría modela el comportamiento de los pozos petroleros como una curva gaussiana con un pico máximo seguido de un declive, cabe destacar que el factor limitante para la extracción del petróleo crudo será la energía requerida y no su coste económico. Por lo cual, que en algún punto extraer un barril de petróleo implicará gastar la misma energía proporcionada por otro barril o más y su costo será inviable (Donev et al.; 2015).

La agencia internacional de la energía (AIE) anunció en el 2010 que la producción del petróleo crudo llegó a su pico máximo en el 2006. El informe pronostica que después de una breve caída, la producción de crudo alcanzará una “meseta ondulante” en cuanto a la producción de miles de barriles por día (mb/d) entre el 2020 y el 2035 (Figura 1). No obstante, la demanda energética por parte de ciertos países como China va en aumento, por lo que la estabilidad de la producción no será suficiente para satisfacer dichas necesidades (Rudolf., 2010).

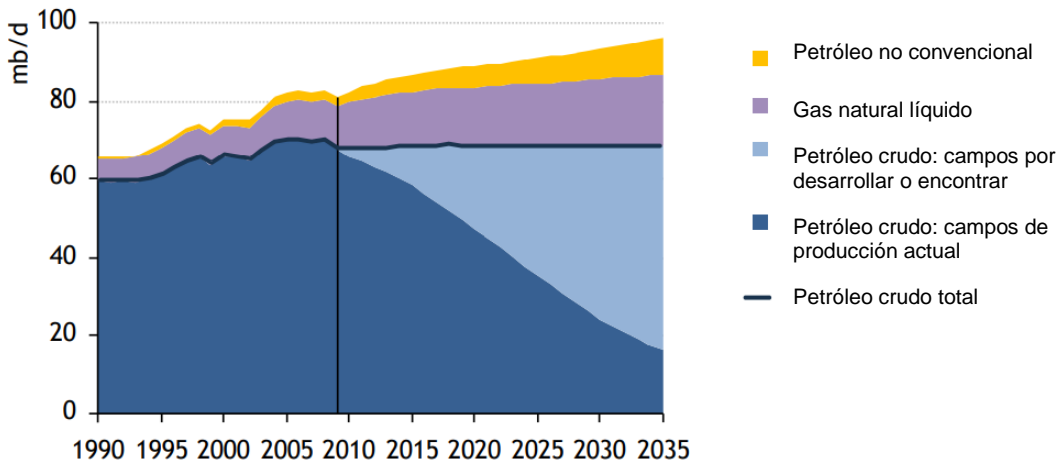


Figura 1. Producción mundial de petróleo por tipo en el escenario de nuevas políticas. Tomada de World Energy Outlook 2010.

La reciente pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2 dentro de sus consecuencias ha provocado una mayor incertidumbre en el mercado energético, modificando la demanda. Mientras que las predicciones indican un incremento en la demanda de energías renovables (IEA, 2020).

Los gases generados a partir de la combustión contribuyen al famoso efecto invernadero quien ha tenido como consecuencias, la perdida de la biodiversidad, aumento en el nivel del mar, el derretimiento de los glaciares, etc. (Bharathiraja et al., 2017).

2.2 Alternativas energéticas

La crisis de los combustibles fósiles, la creciente demanda energética de un mundo globalizado y las temibles consecuencias del cambio climático han hecho a diversos países redirigir su mirada a tecnologías. Las cuales vayan encaminadas a la producción de energías más amigables con el medio ambiente, económicamente rentables y competitivas (Ajala et al., 2015).

2.2.1. Biocombustibles

Los biocombustibles son sustancias energéticas elaboradas por el ser humano a partir de materia orgánica la cual es producida por organismos vivos y se le conoce como “biomasa” Podemos encontrar biocombustibles en estado sólido, líquido o gaseoso y tienen como finalidad liberar energía contenida en su composición a partir de una reacción de combustión (Ho et al., 2014).

De acuerdo con el sustrato o materia prima utilizada para su producción, se han dividido en 3 generaciones. Los biocombustibles de primera generación son aquellos que son obtenidos mediante fuentes alimenticias como azúcares, aceites vegetales, glucosa o grasa animal, ejemplo la caña de azúcar o el maíz. Los de segunda generación son producidos a partir de partes de plantas no comestibles, distintos tipos de biomasa, desechos agroindustriales, etc. Esta generación de biocombustibles puede ayudar a solucionar los problemas éticos y ecológicos asociados a los de su generación anterior. No obstante, dichos procesos de producción no están lo suficientemente desarrollados. Por último, están los de tercera generación derivados de “cultivos energéticos” es decir, insumos vegetales no alimenticios de rápido crecimiento con una alta densidad energética contenida, un ejemplo son las microalgas o los pastos perenes (Bhatt et al., 2018).

2.2.2. Biobutanol

El concepto de biobutanol consiste en el butanol producido a partir de azúcares debido al metabolismo de determinados microorganismos. El butanol es un alcohol de cuatro carbonos como se observa en la Figura 2, incoloro e inflamable. Actualmente dicho solvente está considerado como un biocombustible con un alto potencial por encima del etanol debido a sus características fisicoquímicas como energéticas. En el Cuadro 1 se describen sus características comparadas con las del etanol (Bharathiraja et al., 2017; Khosravanipour et al., 2016).

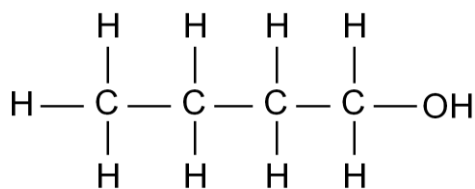


Figura 2. Estructura química desarrollada del butanol.

El atractivo del biobutanol como biocombustible, radica en su similitud con la gasolina y que puede ser usado en motores de combustión interna sin la necesidad de modificaciones en el diseño de estos. No obstante, su producción a gran escala enfrenta grandes retos en cuanto a costes energéticos y por ende económicos (Bhatt et al., 2018).

Cuadro 1. Comparación de las propiedades fisicoquímicas de algunos combustibles (Bhatt et al., 2018).

<i>Propiedades</i>	<i>Butanol</i>	<i>Etanol</i>	<i>Gasolina</i>
<i>Punto de fusión (°C)</i>	-89.3	-114	-57.1 a -56.6
<i>Punto de ebullición (°C)</i>	117-118	78	27-221
<i>Solubilidad en agua (100 g)</i>	inmiscible	miscible	inmiscible
<i>Densidad energética (MJ/L)</i>	27-29.2	19.6	32
<i>Calor de vaporización (MJ/Kg)</i>	0.43	0.92	0.36
<i>RON*</i>	96	129	91-99
<i>MON*</i>	78	102	81-89
<i>Relación aire-combustible</i>	11.2	9	14.6

*RON: octanaje medido en laboratorios. MON: Motor octanaje en motor estático

La manera convencional de obtener butanol se basa en una ruta sintética a partir del propileno (derivado del petróleo) mediante una hidrogenación catalizada por rodio. Por lo que el precio del butanol actualmente está ligado al mercado del petróleo crudo (Niemistö et al., 2013). Producir un kilogramo de butanol de la manera tradicional tiene un valor de 1.57 dólares, mientras que producir la misma cantidad mediante un proceso de fermentación ronda los 1.87 dólares. Es evidente que el biobutanol aún no puede competir con el butanol sintético, pero países como

China están apostando por dicho mercado mejorando biotecnológicamente sus procesos y teorizando en la reducción de su costo/producción (Kaminski et al., 2011; Yang et al., 2015).

2.3. Proceso de fermentación ABE

La fermentación es de los procesos más antiguos conocidos por la civilización y se ha utilizado para la producción de alimentos, medicinas, solventes, entre muchos otros compuestos de gran valor comercial. La fermentación más conocida es la fermentación alcohólica que da como producto el etanol debido a la degradación de azúcares mediada por organismos como levaduras. Al ser un proceso metabólico, requiere de enzimas específicas para degradar el sustrato principal, el cual suelen ser azúcares, ya sea hexosas o pentosas. Por lo que el primer paso es la glucolisis. Una vez obtenido el piruvato, en el caso de la fermentación alcohólica, se descarboxila formando acetaldehído el cual se reduce para formar etanol, tal como se observa en la Figura 3 (Steinkraus, 1997).

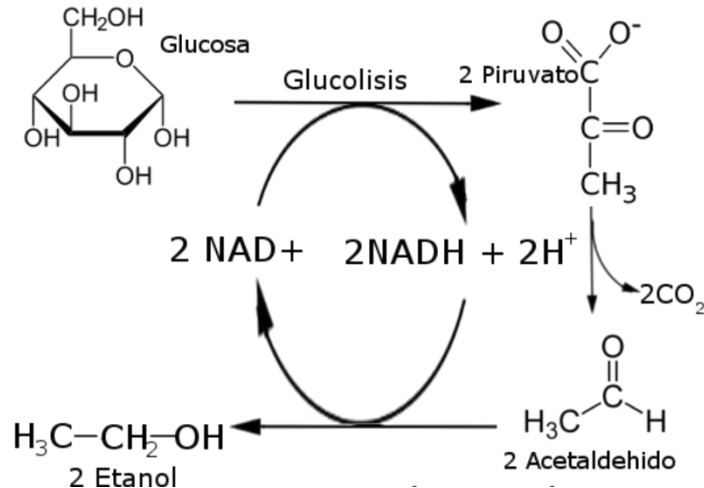


Figura 3. Ruta metabólica que conduce a la producción de etanol.

Por otro lado, existe un tipo de fermentación llevada a cabo por familias específicas de bacterias, las cuales son capaces de producir acetona, butanol y etanol en una proporción de 3:6:1 respectivamente, por lo que se le denominó fermentación ABE. Fue descubierta por Pasteur en 1861 y en 1914 Wiezmann aisló la cepa *Clostridium*

acetobutylicum capaz de realizar la fermentación ABE, la cual dio un mayor rendimiento de acetona y butanol, mejor que otros organismos aislados previamente. Más tarde el butanol se produjo industrialmente mediante el proceso de Wiezmann empleando dicha cepa. Tuvo su auge a nivel comercial durante la primera y segunda guerra mundial, con plantas que operaron en China, Egipto y Sudáfrica. Sin embargo, después de la segunda guerra mundial, entre la década de 1950 y 1960, el butanol obtenido por fermentación no pudo competir con la industria petroquímica y sus derivados, la última planta cerró en 1980 en Sudáfrica (Bharathiraja et al., 2017; Qureshi, 2009).

Después de décadas, la fermentación ABE para la producción de biobutanol nuevamente es de interés debido al interés por tener alternativas con menor impacto ambiental económico. No obstante, este proceso de fermentación sigue teniendo retos a enfrentar para lograr establecerse como mercado y una forma rentable para la producción de butanol. El primer reto es la toxicidad del producto final, pues el butanol a bajas concentraciones, normalmente menor a 20 g L^{-1} , provoca la inhibición de los microorganismos fermentadores lo que provoca un fin prematuro a la fermentación (Liu et al., 2014). El mecanismo por el cual el butanol resulta tóxico a las bacterias se relaciona con el flujo pasivo de protones por parte de éste, lo que provoca fugas en la membrana celular y la alteración de la estructura lipídica de las mismas, por ende, la actividad de las enzimas unidas a la membrana se ven alteradas. El segundo reto o problema, es la alta cantidad de energía, que se ve reflejada en costos, para la recuperación del butanol, debido a la baja concentración que se obtiene de éste ($< 20 \text{ g L}^{-1}$) y que su punto de ebullición es de $117 \text{ }^\circ\text{C}$ (Feng et al., 2012).

Los métodos tradicionales para la obtención de butanol son la destilación, la extracción líquido-líquido y la adsorción, siendo la destilación el proceso más costoso. Otros métodos han surgido en los últimos años como las técnicas de separación por membranas como la pervaporación o la extracción con disolventes de membrana. Es cierto que estas novedosas técnicas tienen ventaja por sobre las tradicionales en algunos aspectos, pero no totalmente (Bharathiraja et al., 2017).

En el Cuadro 2 se muestran estudios previos de producción de butanol con distintas bacterias del género *Clostridium* y su rendimiento, sustrato utilizado así como el tiempo de fermentación.

Cuadro 2. Producción de butanol por fermentación ABE por diferentes cepas de *Clostridium*.

Cepa	Sustrato	Tiempo (horas)	Producción (g L ⁻¹)	Referencia
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Glucosa	30	9.8	Desai et al., 1999
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1731	Glucosa	No indicado	12.6	Papoutsakis, 2000
<i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013	Glicerol	48	10	Malaviya et al., 2012
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Maltodextrina	72	18.6	Qureshi et al., 2000

2.3.2. *Clostridium acetobutylicum*

También denominado organismo de Wiezmann, *Clostridium acetobutylicum* es una bacteria Grampositiva de morfología bacilar, forma endosporas termo-resistentes y exhibe un metabolismo fermentativo estrictamente anaerobio. *C. acetobutylicum* también se caracteriza por tener un metabolismo fermentativo bifásico. Durante la fase exponencial de crecimiento, las células vegetativas transforman los azúcares en ácido acético y ácido butírico por lo que se le conoce como la fase de acidogénesis. Al final de la fase exponencial las células se diferencian, éstas se hinchan de manera notable y adquieren una morfología de cigarro (fases clostridiales). La bacteria comienza a acumular el polisacárido granulosa, un polímero similar al glucógeno que consiste en D-glucosa, el cual se espera que funcione como depósito de energía para la fase de formación de esporas. Es entonces cuando el metabolismo de la célula pasa a la producción de disolventes (solventogénesis), a lo que se le conoce como el cambio solventogénico en la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE). Los clostridios solventogénicos

convierten los ácidos producidos en disolventes neutros (acetona y butanol). La bacteria ahora se diferencia en esporas ovaladas y la geminación de éstas completa el ciclo celular clostridial (Figura 4) (Janssen et al., 2014).

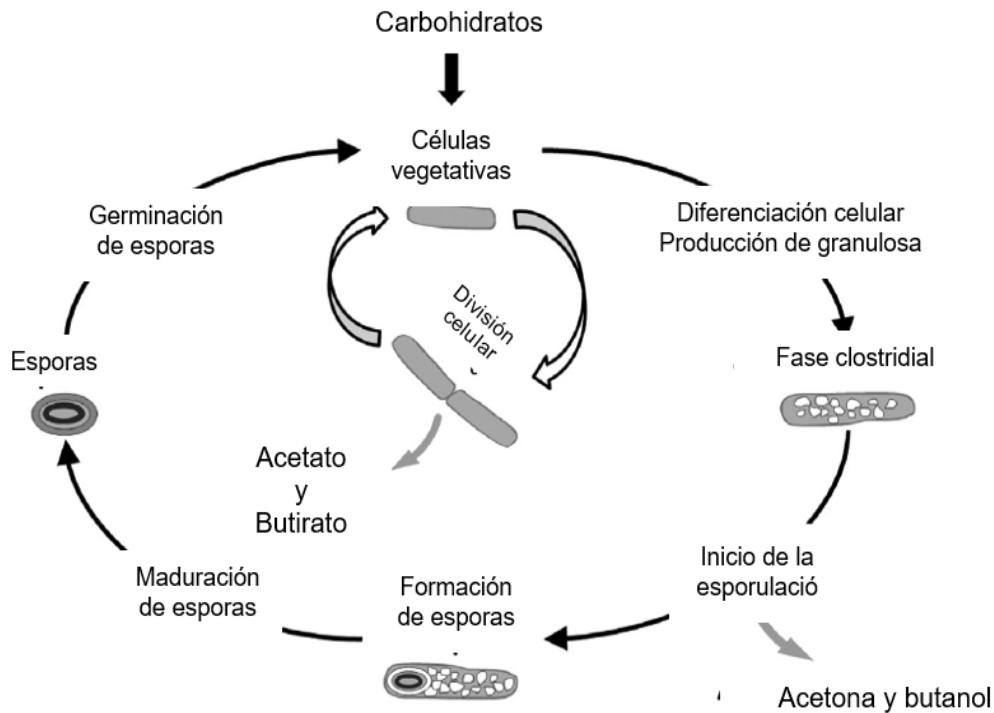


Figura 4. Ciclo de vida de *Clostridium acetobutylicum* (Janssen et al., 2014).

Su temperatura óptima de crecimiento es entre 35 y 37 °C, la biotina y el 4-aminobenzoato son necesarios como factores de crecimiento a un pH de 6. Las esporas suelen ser activadas mediante choque térmico (2 minutos a 100 °C o 10 minutos a 80 °C) y crecidas en medio líquido (Janssen et al., 2014).

2.3.3. Metabolismo de la producción de butanol

La secuencia metabólica que llevan a cabo bacterias como *C. acetobutylicum* con glucosa como sustrato se muestra en la Figura 5. Se destaca la transferencia de electrones implicadas en las reacciones redox. Las flechas verdes representan las reacciones de reducción, mientras que las naranjas representan las reacciones de oxidación. Las reacciones abarcadas por la banda verde pertenecen al flujo principal del metabolismo, mientras que las que se presentan sobre la banda azul son las

sucedidas en la fase de acidogénesis, que dan lugar al ácido acético y al butírico, las bandas lila son las reacciones que se llevan a cabo en la fase de solventogénesis. En concreto, un mol de glucosa se oxida en condiciones anaerobias en dos moles de piruvato a través de la glucólisis, tal proceso está acompañado por la producción de dos moles de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) y ATP (adenosín trifosfato), estas moléculas energéticas liberadas son almacenadas y pueden utilizarse para futuras conversiones. Después, el ácido pirúvico es oxidado por la piruvato-ferredoxina oxidorreductasa a acetil-coenzima A (acetil-CoA), que es el intermediario importante para las vías de producción de ácido y disolventes. Por un lado, el acetil-CoA se convierte en acetil-P por la fosfotransacetilasa (PTA) y luego en acetato por la acetato quinasa (ACK), como se muestra en la vía acidogénica. Por otro lado, el acetil-CoA puede transformarse en butiril-CoA mediante una reacción enzimática de 4 pasos en el flujo principal, mientras que el butiril-CoA puede convertirse además en butiril-P por la fosfotransbutirilasa (PTB) y finalmente en butirato por la butirato quinasa (BUK). El paso de los ácidos a los disolventes también puede describirse a nivel bioquímico en términos de fluctuaciones en las reservas de ATP y NAD(P)H y de transducción de señales para iniciar la síntesis de las enzimas correspondientes. Recientemente, se ha demostrado que un mutante influenciado por el acervo de NAD(P)H demostró una producción más temprana de disolventes y, en consecuencia, mayores concentraciones finales de EBA. Sin embargo, la regulación del cambio metabólico aún está por dilucidar (Janssen et al., 2014; Konur, 2018; Liu y Yu, 2020).

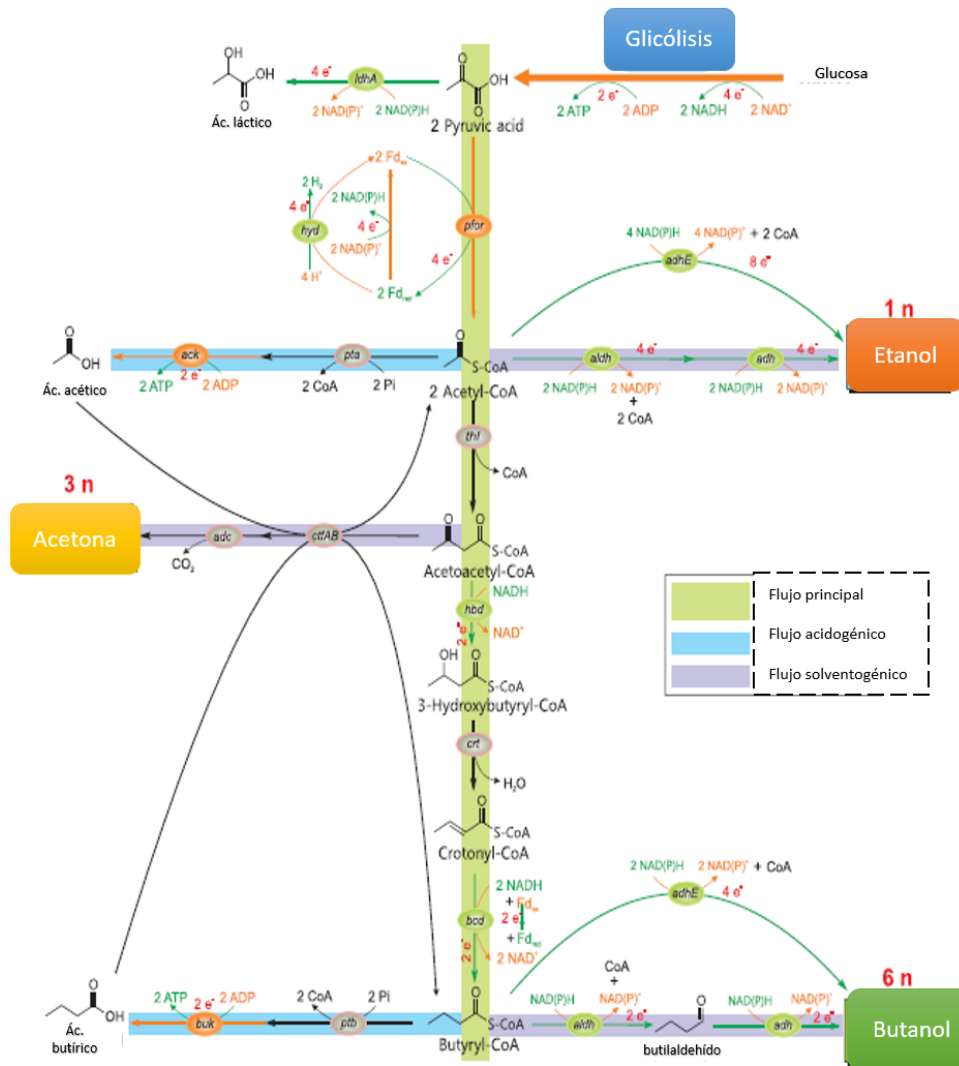


Figura 5. Ruta metabólica de *C. acetobutylicum*. (Liu y Yu., 2020).

2.4 Electrofermentación

En la actualidad, la fermentación se utiliza para producir una increíble variedad de productos de interés, ya no está limitada a la producción o conservación de alimentos como en la antigüedad. Al ser uno de los principales procesos biotecnológicos, la fermentación está en constante desarrollo, desde la optimización de los medios de cultivo, el mejoramiento de cepas por medio de la ingeniería genética, etc. Sin embargo, los reactivos empleados para potenciar rutas metabólicas selectivas o los métodos para producir una cepa mutada suelen elevar los costos del proceso. Motivo por el cual, los estudios sobre los sistemas

bioelectroquímicos surgidos a finales del siglo XX, han cobrado relevancia en la última década (Toledo-Alarcón et al., 2020).

Las fermentaciones anaerobias usualmente tienen limitantes o deficiencias en cuanto a la producción de metabolitos específicos debido a múltiples factores involucrados en el proceso y uno de ellos es un desbalance redox (Sravan et al., 2018). Un proceso electro fermentativo, es capaz de manipular el metabolismo de la bacteria utilizando electrodos en estado sólido, ya que actúan como mediadores de electrones donde la terminal anódica se utiliza como aceptor de electrones y la terminal catódica como donante de electrones (Figura 6). Al ser las reacciones bioquímicas, reacciones de óxido-reducción pueden ser catalizadas por un sistema electroquímico. La relación entre las reacciones electroquímicas y bioquímicas ayuda a inhibir las limitaciones termoquímicas de un proceso convencional induciendo un equilibrio redox y una regulación simultanea de las rutas electro-metabólicas que dan lugar a productos específicos (Bhagchandani et al., 2020).

En la biología la molécula que se usa como moneda energética es el ATP (adenosín trifosfato) y la energía contenida en esta molécula que un microbio o cualquier organismo vivo puede obtener de una determinada vía metabólica, es directamente proporcional a la diferencia de energía potencial (ΔE°), en voltios entre el donante y el aceptor de electrones. Dicho potencial puede ser calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta E^\circ = \frac{\Delta G}{nF}$$

Donde ΔG es la energía libre de Gibbs (J/mol), n el número de electrones involucrados en la reacción (moles) y F es la constante de Faraday (96485.3 C/mol). El signo de ΔE° determina si el sistema produce electricidad o se debe suplementar dicha energía para que la reacción deseada ocurra (Schievano et al., 2016).

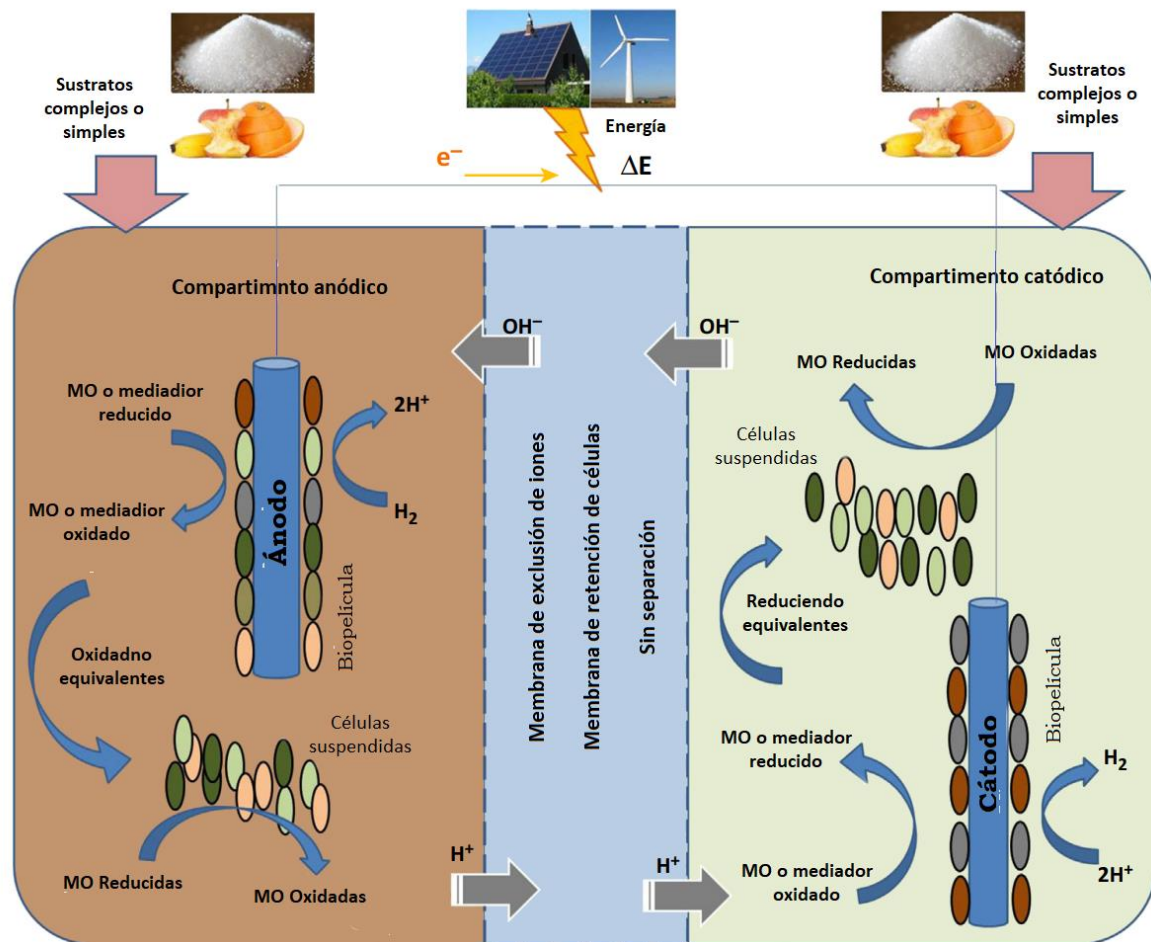


Figura 6. Sistema de electro-fermentación. MO: Moléculas orgánicas (Schievano et al., 2016).

Diversos estudios han reportado que la eficiencia en la transferencia de electrones es un factor clave en la cinética de las bioconversiones (Cuadro 3) lo que se ve reflejado en el rendimiento de los productos finales. Para entender la naturaleza de las reacciones redox, es importante comprender que el flujo de electrones está acoplado a la conversión de energía lo que es fundamental para la producción de los metabolitos de interés, en este caso del butanol (Gong et al., 2020).

Dado que el butanol se obtiene a partir del ácido butírico según el metabolismo de la bacteria (Figura 5), se habla de una reacción de reducción es decir una ganancia de electrones por lo que dicha reacción debería ser auxiliada por el cátodo y la

energía necesaria para que se lleve a cabo la reducción del butirato a butanol es de -0.37 V (Yoruklu et al., 2018).

Cuadro 3. Ejemplos donde se ha utilizado la electrofermentación para producción de metabolitos de interés.

<i>Microorganismo</i>	<i>Condiciones</i>	<i>Metabolito</i>	<i>Referencia</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Electrofermentación con 15 V	Etanol	Mathew et al., 2015
<i>Shewanella oneidensis</i>	Electrofermentación anódica (Electrodo de trabajo a 0.4 V, electrodo de referencia de Ag/AgCl)	Acetato	Nakagawa et al., 2015
<i>Clostridium pasteurianum</i> DSM 525	Transferencia directa de electrones	Butanol	Choi et al., 2014

En las vías de biosíntesis del butanol, se ha confirmado que los principales cofactores asociados a las enzimas implicadas en su producción son principalmente el NADH y las ferredoxinas, el primero posee dos estados, uno oxidado y uno reducido, por lo que su función es donar o aceptar electrones (Liu y Yu, 2020) y su estructura se observa en la Figura 7.

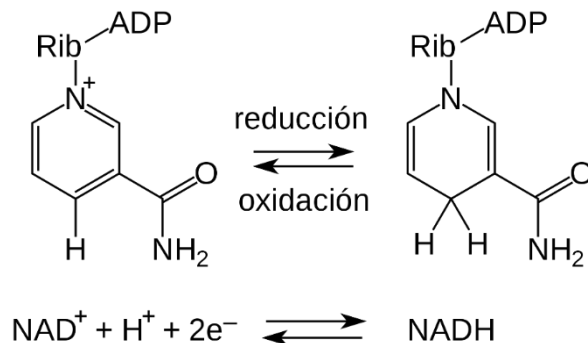


Figura 7. Estructura química del NADH.

Cabe destacar que la relación que tenga el sistema electroquímico con el microorganismo es muy particular y propia de cada bacteria e incluso depende del

material del electrodo empleado. En este tipo de técnicas se sigue buscando una mayor selectividad para no interferir en otras vías metabólicas que puedan afectar el rendimiento del producto de interés (Bhagchandani et al., 2020).

Por el momento no se han encontrado reportes sobre la producción de biobutanol en un sistema de fermentación electroestática, ni se han reportado proporciones adecuadas de carbono nitrógeno en cuanto a la producción del biobutanol, únicamente se ha estudiado su efecto en la producción de H₂ en *Clostridium pasteurianum* (Lin y Lay, 2004).

2.5 Aplicación de campos magnéticos

Un campo magnético se puede definir como la región ubicada en el espacio, que ejerce una fuerza magnética de atracción o repulsión y que, aunque no pueda ser visto, ejerce una fuerza sobre los compuestos o moléculas que son sensibles al magnetismo. Como característica principal, es la presencia de dos polos, el polo norte y el polo sur (Figura 8), cuando existen dos polos iguales estos se repelen y cuando son distintos se atraen. Dichos campos magnéticos pueden ser generados por medio de imanes o a través de corrientes eléctricas que están en movimiento, conocido también como electroimán, el cual consiste en una bobina de un material capaz de conducir la electricidad con un metal en su interior (Briceño., 2019).

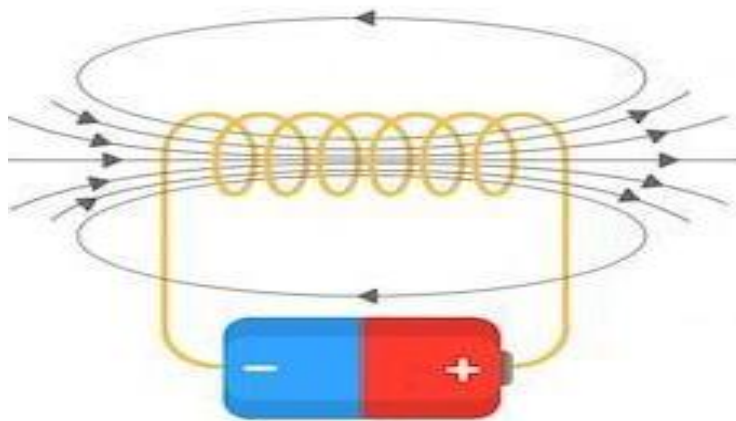


Figura 8. Generación de un campo magnético por una bobina.

A finales del siglo XX y principios del siglo XXI diversos estudios sobre la exposición de microorganismos a campos magnéticos (CM) se realizaron con el fin de averiguar si éstos tenían algún efecto negativo o positivo en las funciones vitales de los organismos. Una de las principales teorías sobre la influencia que tienen los CM sobre el metabolismo es que, tienen efecto sobre la permeabilidad de los canales iónicos dependientes de voltaje (Figura 9) situados en la membrana celular, afectando el transporte de iones de las células, dando lugar a cambios biológicos en el organismo. En varias investigaciones se han observado efectos tanto estimulantes como inhibitorios de los campos débiles sobre la tasa de crecimiento bacteriano (Strašák et al., 2002, Masood et al., 2020).

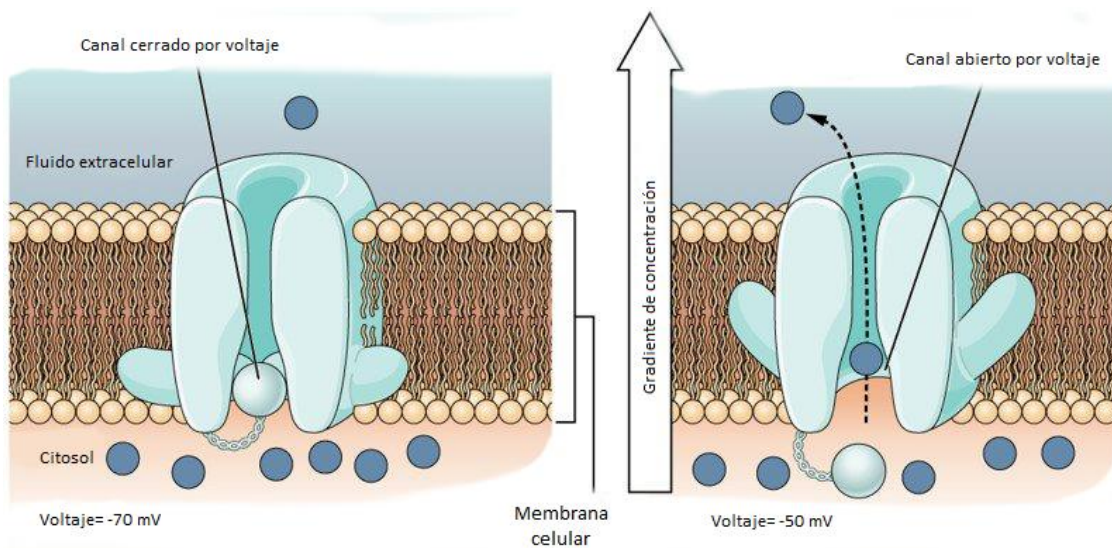


Figura 9. Canales iónicos dependientes de voltaje.

3. HIPÓTESIS

La aplicación de un campo magnético débil y un suministro de electrones externo será capaz de dirigir el metabolismo de *Clostridium acetobutylicum*, modificando la cinética de bioconversión con el fin de aumentar la producción de biobutanol.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto tanto de la relación C/N como de estímulos eléctricos y magnéticos en la proliferación celular y producción de biobutanol a partir de *Clostridium acetobutylicum*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estimar el efecto de la relación carbono nitrógeno sobre la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando *Clostridium acetobutylicum*.

Comparar la producción de biomasa y consumo de sustrato por *Clostridium acetobutylicum* bajo el efecto de diferentes sistemas de electrofermentación.

Evaluar el efecto de un campo magnético a partir de un embobinado, en el crecimiento y producción de biobutanol en *Clostridium acetobutylicum*.

Relacionar el efecto del potencial constante aplicado al sistema de electrofermentación, así como su aplicación en dos diferentes etapas del ciclo de crecimiento de *Clostridium acetobutylicum* sobre la producción de biobutanol.

6. METODOLOGÍA

6.1 Material biológico

La cepa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 cultivada en placas de agar nutritivo fue empleada en los experimentos. La cepa se propagó en medio líquido GYP mineral descrito por (Montoya et al., 1999) el cual contiene (g/L): extracto de levadura 10, peptona 5, fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 4, fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) 1, cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.1, cloruro de sodio (NaCl) 2, cloruro de calcio (CaCl_2) 0.5, cloruro de potasio (KCl) 0.1, sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.0011, L-cisteína 0.5. Para la preservación de la cepa, se llevará a crioconservación a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ con glicerol al 20 % v/v.

6.2 Experimentos preliminares

6.2.1 Preinóculo

El preinóculo se preparó cultivando una colonia aislada de un cultivo en caja Petri con agar nutritivo en 100 mL de medio estándar GYP mineral, se incubó por 12 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$, 120 rpm y pH 6.1 hasta obtener una densidad óptica aproximada de 0.8.

6.2.2 Inóculo

Cada reactor o medio definido fue al 10 % del volumen de trabajo.

6.3 Efecto de la relación carbono nitrógeno sobre la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando *Clostridium acetobutylicum*

Distintas relaciones carbono/nitrógeno fueron probadas sobre la producción de biomasa y consumo de sustrato utilizando como fuente de carbono glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) y como fuente de nitrógeno, sulfato de amonio (NH_4)₂SO₄. Las cantidades que se utilizaron se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Cantidades de glucosa y sulfato de amonio para las distintas relaciones carbono/nitrógeno.

Glucosa (g/L)	20			30			50			60		
C/N	7	15	30	7	15	30	7	15	30	7	15	30
$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	5.39	2.52	1.26	8.09	3.78	1.89	13.48	6.29	3.15	11.321	5.29	2.64

Dichos experimentos se llevaron a cabo en frascos de vidrio de 55 mL y el volumen de trabajo utilizado fue de 50 mL, los frascos fueron sellados con tela quirúrgica y una liga los cuales se almacenaron en recipientes herméticos en los cuales se generó un ambiente anaerobio mediante la combustión de oxígeno presente en los recipientes para el óptimo crecimiento de la bacteria.

El medio de cultivo utilizado fue el GYP citado en el apartado 6.1 sustituyendo el extracto de levadura y la peptona por la sal de amonio como fuente de nitrógeno. El medio fue previamente ajustado a un pH de entre 6.0 y 6.2 y esterilizado a 15 psi a 121 °C por 15 minutos al igual que el resto del material empleado. Las mediciones se realizaron 5 días después de la inoculación.

6.4 Comparación de la producción de biomasa y consumo de sustrato por *Clostridium acetobutylicum* bajo el efecto de diferentes sistemas de electrofermentación.

6.4.1 Reactor de fermentación electroestática

El sistema de fermentación electroestática consistió en frascos de plástico con tapa de 100 mL embobinados con 300 vueltas de alambre de cobre calibre 24 recubierto con una capa de aislante tipo SNS. El electrodo se fijó en el tapón del frasco y sumergido en el medio de cultivo conectado a través de una fuente con voltaje en corriente continua modelo GPS-3030DD en paralelo. Se incubó a 37 °C por 72 horas tal como se muestra en la Figura 10. Con una agitación magnética de 120 rpm. El volumen de trabajo fue de 125 mL. Los voltajes aplicados fueron los siguientes: 0, 10, 20, y 30 V, siendo la ausencia de voltaje el control negativo.

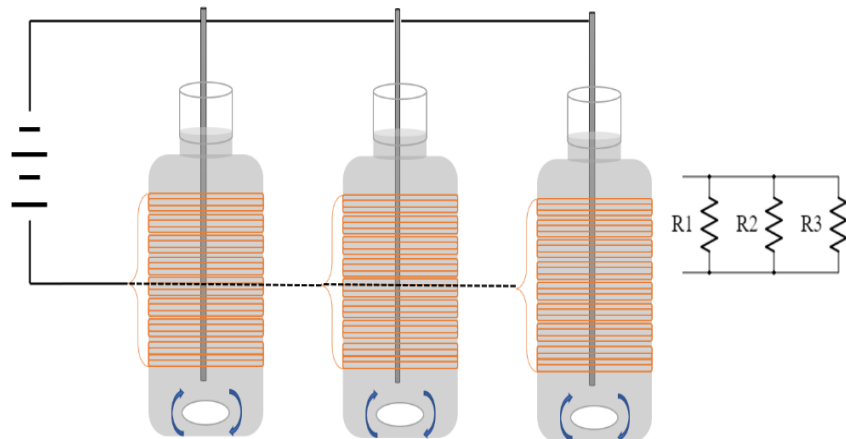


Figura 10. Reactor 1. Sistema de fermentación electrostática.

6.4.2 Reactor de fermentación electrostática modificado

El reactor 1 se modificó separando las puntas de las bobinas y una de ellas se enrolló en torno a un electrodo de acero inoxidable con un área de contacto de 16.305 cm^2 , los extremos del alambre de cobre fueron previamente lijados para eliminar el aislante que los recubre y fueron conectados a la fuente de poder a 10 V en paralelo.

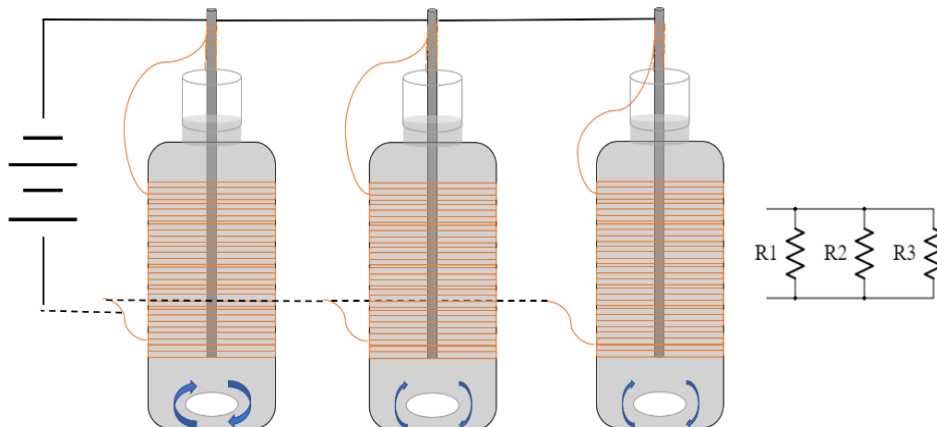


Figura 11. Reactor 2. Modificación del reactor de fermentación electrostática.

6.4.3 Reactor 3. Campo magnético generado a partir de una bobina

El efecto de un campo magnético se evaluó en un arreglo de reactor con los mismos materiales que el reactor 1 pero con las siguientes modificaciones: se retiró el electrodo de acero inoxidable, con tapas sin orificios, las puntas de las bobinas se despegaron y fueron conectados cada una al polo positivo y negativo de la fuente de poder, respectivamente. Se ajustó a una intensidad de corriente de 0.73 A para generar un campo magnético de aproximadamente $2 \mu\text{T}$, el cual fue medido con un TM-190 Multi-field EMF meter Tenmars®. El arreglo de este sistema fue una conexión en serie (Figura 12).

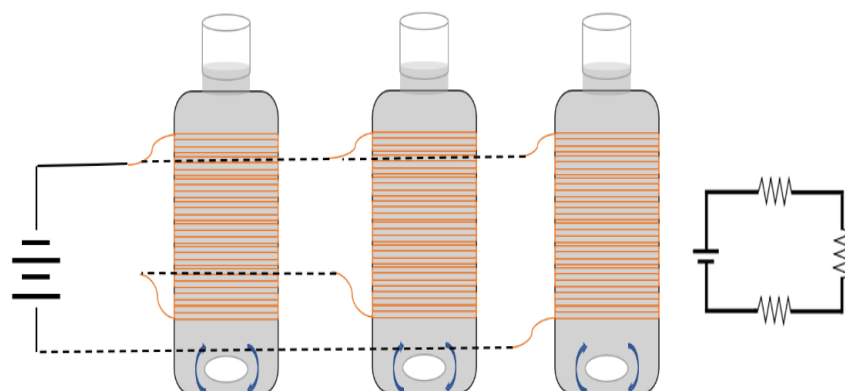


Figura 12. Reactor 3, bobina.

6.4.4 Reactor 4. Celda electrolítica con electrodos de acero inoxidable

Se utilizaron frascos de plástico con un volumen de trabajo de 120 mL con tapones de rosca a los cuales se les hizo dos agujeros del tamaño del diámetro del electrodo de acero inoxidable los cuales se conectaron a través de caimanes a la fuente de poder en paralelo. El voltaje aplicado fue de 0.4 volts con un área de contacto final de 16.305 cm^2 (Figura 13).

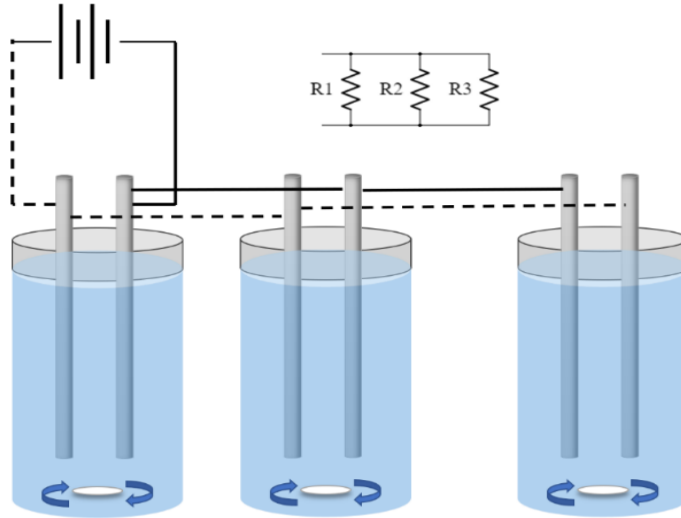


Figura 13. Reactor 4 Sistema de electrofermentación con electrodos de acero inoxidable.

6.4.5 Reactor 5. Celda electrolítica con electrodos de grafito

Para este reactor se utilizaron frascos de vidrio con un volumen de trabajo de 60 mL los cuales fueron sellados con tapones de aluminio tipo inyectables. Se colocaron dos barras de grafito con un área de contacto de 4.784 cm^2 cada barra fue conectada a un polo de la fuente de poder a 0.4 V en paralelo (Figura 14).

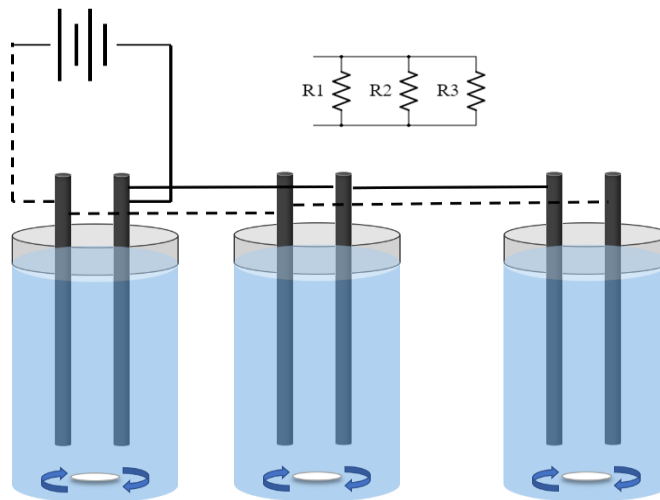


Figura 14. Reactor 5. Sistema de electrofermentación con electrodos de grafito.

La cuantificación de biomasa y consumo de sustrato se hicieron cada 6 horas durante 24 horas con el método de sacrificio para no alterar las condiciones anaeróbicas en cada medición para todos los reactores ensayados. Las condiciones de crecimiento fueron a 37 °C, 120 rpm, pH 6.1 y volumen de trabajo de 125 mL en todos los reactores descritos a anteriormente.

6.5 Métodos analíticos

6.5.1 Cuantificación de biomasa

Se determinó la curva de crecimiento de *Clostridium acetobutylicum*, por medio de la absorbancia con un espectrofotómetro (iMark™ Microplate reader, Estados Unidos) a una longitud de onda de 600 nm para hacer su correlación en peso seco. Se tomaron tres alícuotas de 10 mL, se centrifugaron a 4, 4000 × g durante 10 min, se resuspendió la pastilla para hacer 3 lavados con agua destilada, después un secado en horno de convección forzada (AP60 Air Performance, Froilabo, E.U.A.) a 70 °C por 15 minutos.

6.5.2 Determinación de sustrato consumido

Al sobrenadante del medio fermentado se le cuantificó la glucosa remanente por medio del método ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). La concentración de azúcares reductores se calculó usando curvas estándar de glucosa (0-25 mM) y se expresó en gramos de glucosa consumida por litro.

6.5.3 Determinación de la presencia de butanol y ácido butírico

Los análisis de cromatografía de gases (CG) se realizaron utilizando un equipo de la marca Agilent modelo 7890A acoplado un espectrómetro de masas (EM) Agilent modelo 5973N operado en modo de ionización electrónica con helio de ultra alta pureza como gas acarreador y compuesto por un cuadrupolo simple como analizador de masas. La separación cromatográfica de los compuestos se realizó utilizando como fase estacionaria una columna DB-35MS (60 m x 250 µm x 0.25 µm) con una rampa de temperatura, la cual tuvo una temperatura inicial de 50 °C durante 6 minutos, seguido de un gradiente de temperatura de 70 °C/min hasta 200 °C y finalmente a 300 °C a un gradiente de 50 °C/min. Se inyectó 1 microlitro de cada muestra y estándar en modo Split (1:10), el módulo de inyección a 300 °C, el

flujo de helio se estableció en 1.5 mL/min a flujo constante. Respecto a las condiciones del espectrómetro de masas, la línea de transferencia, la fuente de electrones y el cuadrupolo se mantuvieron a 300 °C, 230 °C y 150 °C respectivamente. El análisis se realizó en modo SIM y los valores de m/z monitoreados fueron: 26, 27, 28, 29, 31, 41, 42, 43, 55, 56, 70 y 73.

6.6 Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron de forma aleatoria. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron reportadas como la media de los ensayos \pm la desviación estándar. Se realizó comparación de medias por el método ANOVA con un valor de significancia $p > 0.05$ utilizando el paquete estadístico de Excel.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Efecto de la relación C/N sobre la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando *Clostridium acetobutylicum*

La suplementación con diferentes relaciones C/N mostró diferencias en la cantidad de biomasa producida y en la utilización del sustrato, que se reflejan en el rendimiento microbiano. Cuando la cantidad de glucosa se redujo a 20 g/L independientemente de la relación C/N, se obtuvieron mayores rendimientos en comparación con cuando se utilizaron concentraciones superiores a 30 g/L. Los rendimientos más bajos se obtuvieron con concentraciones de glucosa más elevadas, como muestra la Figura 15. Las altas concentraciones de glucosa pueden provocar la inhibición del crecimiento bacteriano porque su concentración afecta a la presión osmótica del medio, que es otro factor capaz de regular la proliferación celular (Castellarnau et al., 2008).

Los mejores rendimientos se alcanzaron cuando la concentración de glucosa fue de 20 g/L ya que en los tratamientos con 30, 50 y 60 g/L el rendimiento se encuentra por debajo del 0.05 de g de biomasa por g de sustrato consumido. En cuanto a las relaciones C/N de la concentración óptima de glucosa, la que presenta un rendimiento cercano a 0.09 es la 15. Indicando que la bacteria se desarrolla mejor cuando no limitamos la fuente de nitrógeno y tampoco a altas concentraciones de éste. El efecto de la suplementación también repercute en la expresión génica (Amaro-Reyes et al., 2016) y por tanto también en el metabolismo celular. Esta combinación de nutrientes tiene un efecto positivo sobre el rendimiento de biomasa a partir de glucosa en *Clostridium acetobutylicum*, por lo que se considera que también repercutirá en la producción de biobutanol, motivo por el cual éste, fue el medio definido utilizado en las electrofermentaciones posteriores.

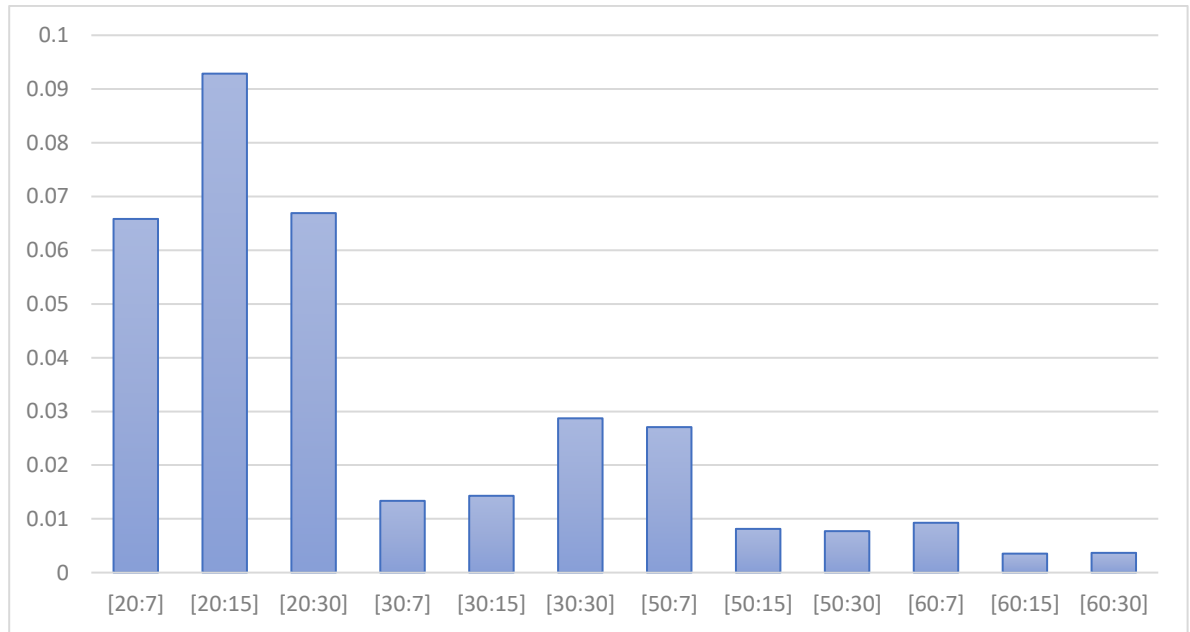


Figura 15. Rendimiento de biomasa respecto al sustrato a distinta concentración de glucosa (20, 30, 50 y 60) relaciones C/N (7, 15 y 30).

7.2 Comparación de la producción de biomasa y consumo de sustrato por *Clostridium acetobutylicum* bajo el efecto de diferentes sistemas de electrofermentación

Reactor 1

La producción de biomasa y el consumo de sustrato fue cuantificado a las 120 h en el Reactor 1 o primer arreglo de reactor para electrofermentación suministrando 10, 20 y 30 V al sistema. Los tratamientos fueron comparados con controles de fermentación el cuál no fue conectado a la fuente de poder. En las Figuras 16 y 17 se aprecia la biomasa generada al final de la fermentación, así como el rendimiento. No se observan diferencias significativas entre los tres distintos potenciales con respecto al control. Por otro lado, no fue posible proponer un mecanismo de acción por parte del reactor como sistema bioeléctrico. El sistema del reactor 1 prolonga la tensión a lo largo de las conexiones de cada reactor, pero nunca cierra un circuito (Alonso & Finn, S , 1976), mediante el cual se pueda llevar a cabo la transferencia de electrones necesarios para oxidar o reducir a los cofactores presentes en las enzimas involucradas en la biosíntesis de butanol.

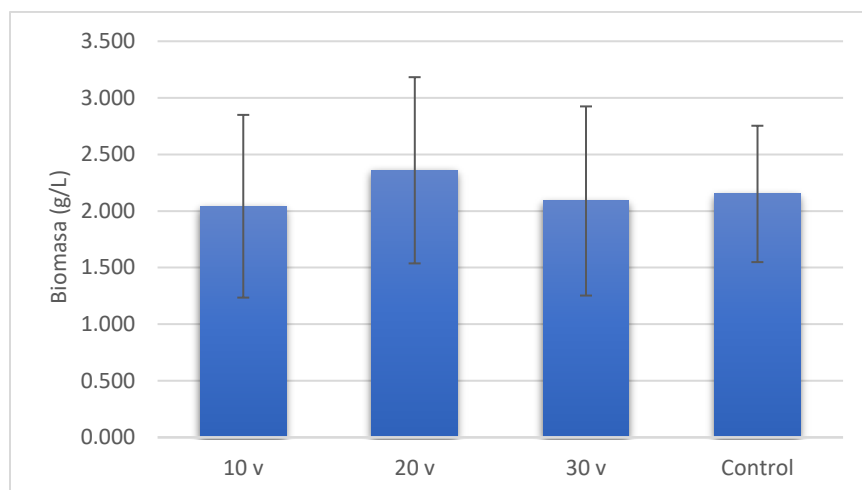


Figura 16. Biomasa obtenida de *Clostridium acetobutylicum* después de 120 horas en el Reactor 1 a 10, 20 y 30 V.

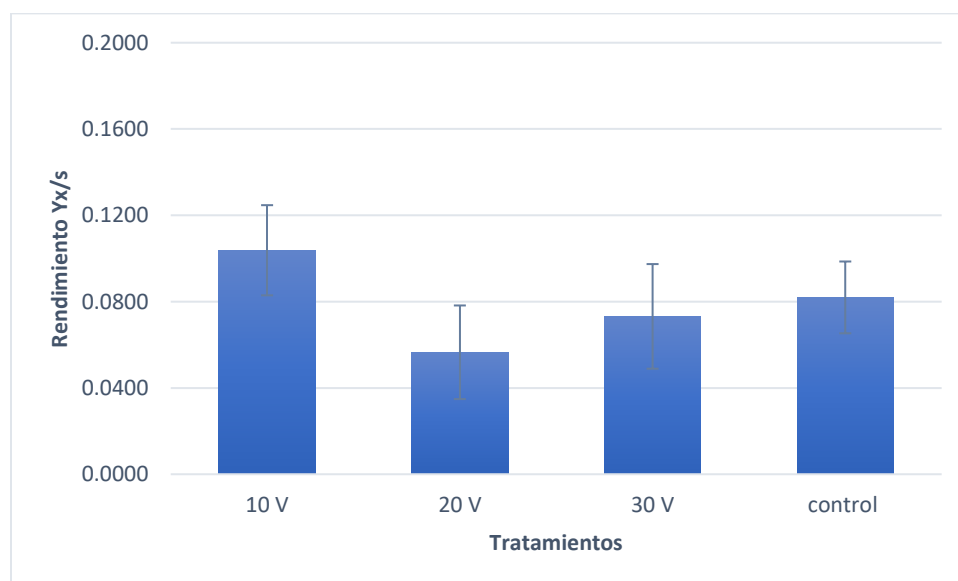


Figura 17. Rendimiento de *Clostridium acetobutylicum* después de 120 horas en el reactor 1 a 10, 20 y 30 V. El 100 % corresponde a 20 g/L de glucosa.

7.3 Evaluación del efecto de un campo magnético a partir de un embobinado, en el crecimiento y producción de biobutanol en *Clostridium acetobutylicum*

Reactor 2.

Para solucionar el problema del circuito abierto manteniendo la configuración del sistema original descrito en el reactor 1, se propuso una modificación de tal manera que la bobina que envuelve al frasco tuviera una entrada y salida a la fuente de poder sin dejar de lado el electrodo de acero inoxidable y se trabajó con el menor

de los voltajes anteriormente propuestos (10 V). El tiempo de fermentación fue de 24 horas lo que corresponde mayoritariamente a la fase exponencial de crecimiento de *C. acetobutylicum*. Cada 6 horas se sacrificaron unidades a las cuales se les midió la glucosa restante y la producción de biomasa, las cuales se pueden observar en la Figura 18. Podemos apreciar que los comportamientos son similares al control ($p > 0.05$), tanto el crecimiento de la bacteria como la asimilación del sustrato a través del tiempo. Por lo que esta configuración también fue descartada al no encontrar cambios en la modulación del metabolismo del microorganismo.

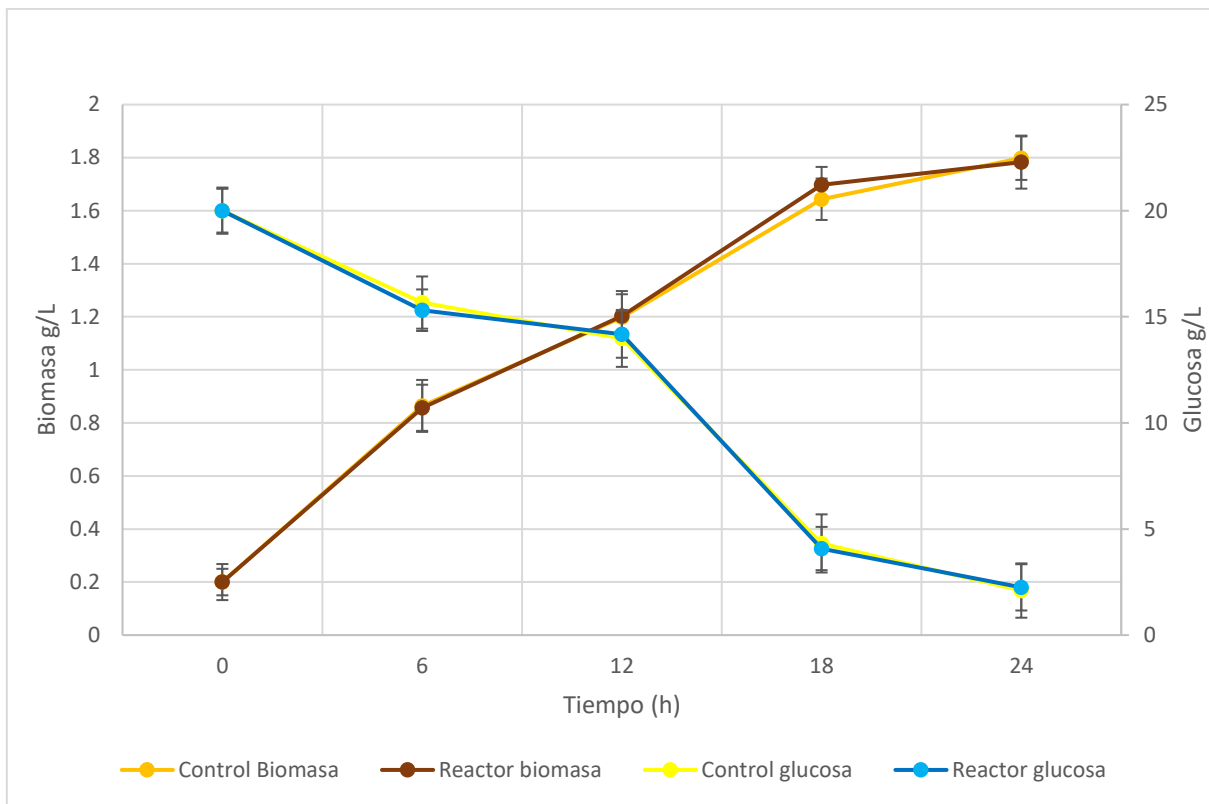


Figura 18. Biomasa generada contra consumo de glucosa en la fase exponencial en el reactor 2.

Por lo que se decidió probar la influencia de un campo magnético débil a partir de la bobina de cobre. Se retiró el electrodo y las dos puntas de la bobina se conectaron a la fuente de poder y pasó de un arreglo en paralelo a un arreglo en serie.

La conexión en serie se hizo con la finalidad de llevar a todas las unidades experimentales la misma intensidad de corriente para poder generar un campo magnético uniforme en cada unidad experimental y dejando el valor del potencial de lado. Debido a que la intensidad de corriente y el voltaje en una conexión en serie se comportan de la siguiente manera (Alonso & Finn, 1976):

$$I_T = I_1 = I_2 = I_3 = \dots I_n$$

$$V_T = V_1 + V_2 + V_3 + \dots V_n$$

Podemos observar en la Figura 18 el efecto del campo magnético débil en la proliferación celular de la bacteria. Se encontró que de las 0 a las 12 horas el crecimiento en el reactor es ligeramente mayor al del control y posterior a este lapso, es en el control donde se encuentra mayor biomasa aunque sin diferencia estadística significativa ($p > 0.05$). En estudios anteriores se ha reportado que la presencia de campos magnéticos en bacterias como *E. coli* suele tener un efecto bacteriostático (Strašák et al., 2002). Dicho efecto podría explicar el declive de una tendencia de crecimiento superior al control, pero sin caer en una drástica disminución de la población que significaría un efecto bactericida por parte del CM. Cabe destacar que en el reactor 3 tuvo otra variable inherente al sistema y esta fue el incremento de temperatura debido al calentamiento del recubrimiento de cobre, generado por la resistencia al flujo de electrones propia de cada material. Por lo que a lo largo del experimento se encontraban temperaturas 3 o 4 °C por encima de los 37 °C de incubación, a los cuales la bacteria también es susceptible (Janssen et al., 2014).

En cuanto al comportamiento de la asimilación del sustrato observamos que la mayor diferencia se encuentra en la segunda mitad del tiempo de fermentación. Un consumo menor de glucosa estaría relacionado con una menor población bacteriana, no obstante, al término de la fermentación la cantidad de glucosa es muy similar tanto en el reactor como en el control.

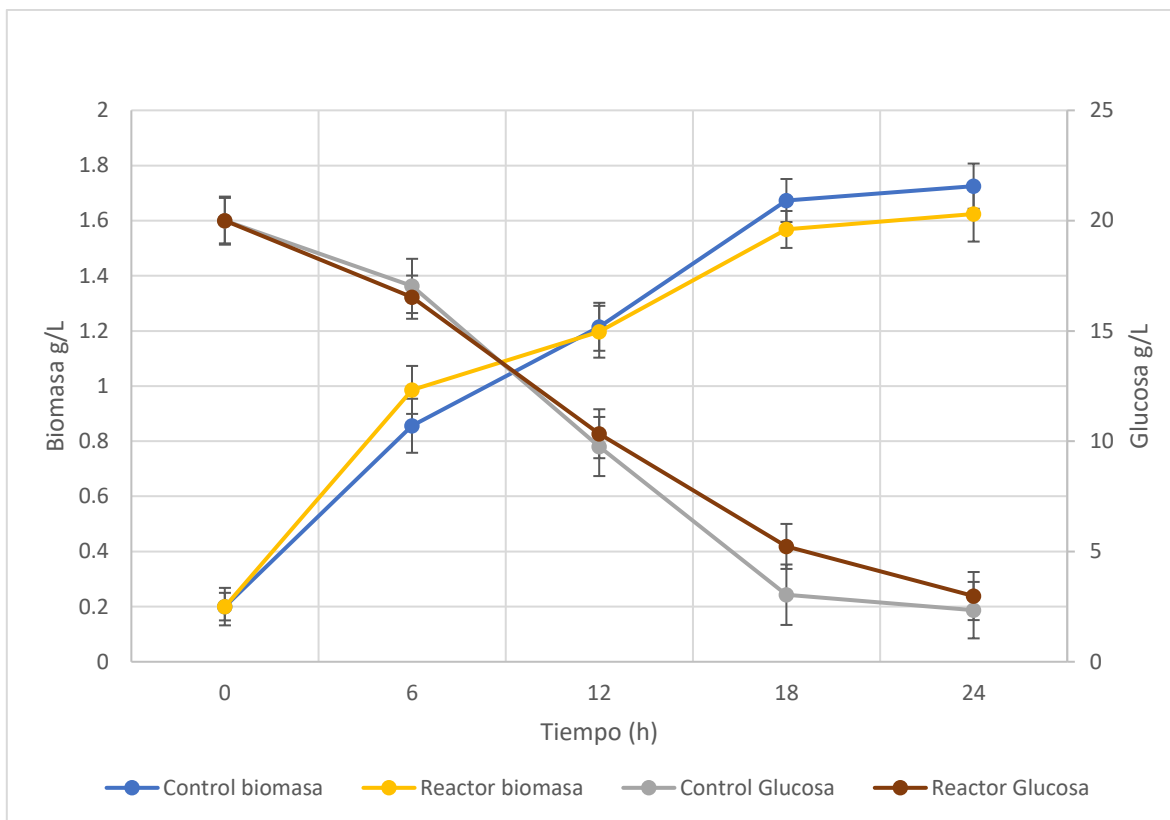


Figura 19. Biomasa generada contra consumo de glucosa en la fase exponencial en el reactor 3.

7.4 Efecto del potencial constante aplicado al sistema de electrofermentación, así como su aplicación en dos diferentes etapas del ciclo de crecimiento de *Clostridium acetobutylicum* sobre la producción de biobutanol.

Los resultados del reactor 4 no pudieron ser cuantificados debido a la formación de un lodo café depositado principalmente en el cátodo. Figura 19, se descartó que fuera formación de biomasa ya que el compuesto se observó en un control abiótico. Dicho depósito obstaculizó el crecimiento bacteriano. La formación de reacciones parásitas inducidas por el sistema (García-Segura et al., 2011) hizo que se descartara dicho reactor en las pruebas posteriores.



Figura 20. Ejemplo de la formación de un depósito en el reactor 4.

Reactor 5.

Este reactor de tipo celda electrolítica con electrodos de grafito a 0.4 V demostró un comportamiento distinto al control. Se puede observar en la Figura 20 un incremento de biomasa entre el 5 y 16 %, el mayor incremento se da en las primeras 6 horas de fermentación. En el caso del consumo de sustrato, se aprecia una mayor cantidad de glucosa remanente en el medio. La combinación de estos dos factores resulta en una mejora en el rendimiento del proceso de fermentación en un 49 %, debido a que se necesita menos materia prima para tener un ritmo de crecimiento igual o mayor que el control. Materiales como el grafito o el grafeno son derivados del carbono y este último es un material biocompatible. Su superficie porosa lo convierte en un electrodo con una mayor área electroactiva. La gran mayoría de los trabajos de electro fermentación cuenta con un material derivado del carbono como electrodo de trabajo (Bhagchandani et al., 2020). En este trabajo se refuerza la justificación de la elección de un material con mayor aceptabilidad biológica en comparación al acero inoxidable. Las características principales que debe tener un electrodo de trabajo dentro de los sistemas bioeléctricos son una conductividad de moderada a alta, estabilidad biológica, química y física, económico y una alta superficie específica, no obstante, se han registrado estudios con materiales como acero inoxidable y Pt, encontrando mejores resultados con materiales derivados del carbono (Khosravanipour et al., 2016).

El flujo de electrones adicional que se da debido a estos conductores sólidos proporciona a la bacteria una mayor capacidad de pasar de NAD^+ a NADH mediante el suministro de electrones representado por el cátodo. Los electrones artificialmente suministrados se transfieren del ánodo al cátodo y directamente a la bacteria que permanece en constante agitación en el medio, lo que provoca un contacto con los electrodos, lo que produce interacciones electroestáticas que favorecen la condición redox intracelular. Este aumento en el poder reductor da como resultado una mayor concentración de los productos de fermentación (Lovley, 2011; He et al., 2016). El NADH no es el único cofactor que aprovecha el suministro de electrones y que también está inmerso en la ruta metabólica, algunos citocromos, ferredoxinas y el NAD(P) se ven favorecidos en sus estados de oxidación-reducción dentro de un sistema de electrofermentación (Hirose et al., 2019; Paiano et al., 2019).

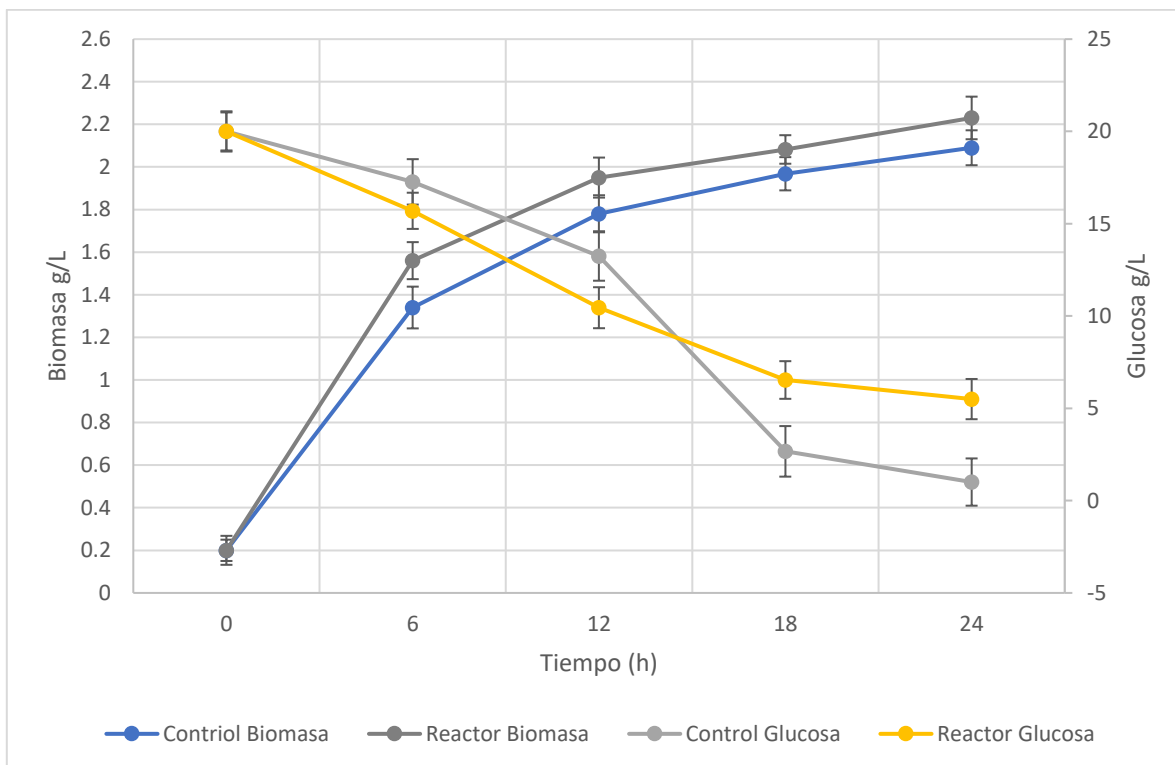


Figura 21. Biomasa generada contra consumo de glucosa en la fase exponencial en el reactor 5.

Se analizaron los rendimientos finales de los reactores 2, 3 y 5 con sus respectivos controles para verificar si había diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento y el control con un α de 0.05 mediante un ANOVA. Los reactores señalados con un asterisco (*) en la Figura 22 resultaron tener un valor $p < 0.05$. Los datos pertenecientes a los análisis estadísticos se muestran en el apartado de Anexos.

La diferencia entre el reactor 3 y su control confirma la existencia de un efecto negativo en la proliferación de *Clostridium acetobutylicum*, ya sea por la presencia del CM o por el incremento en la temperatura del sistema (Dürre, 2016).

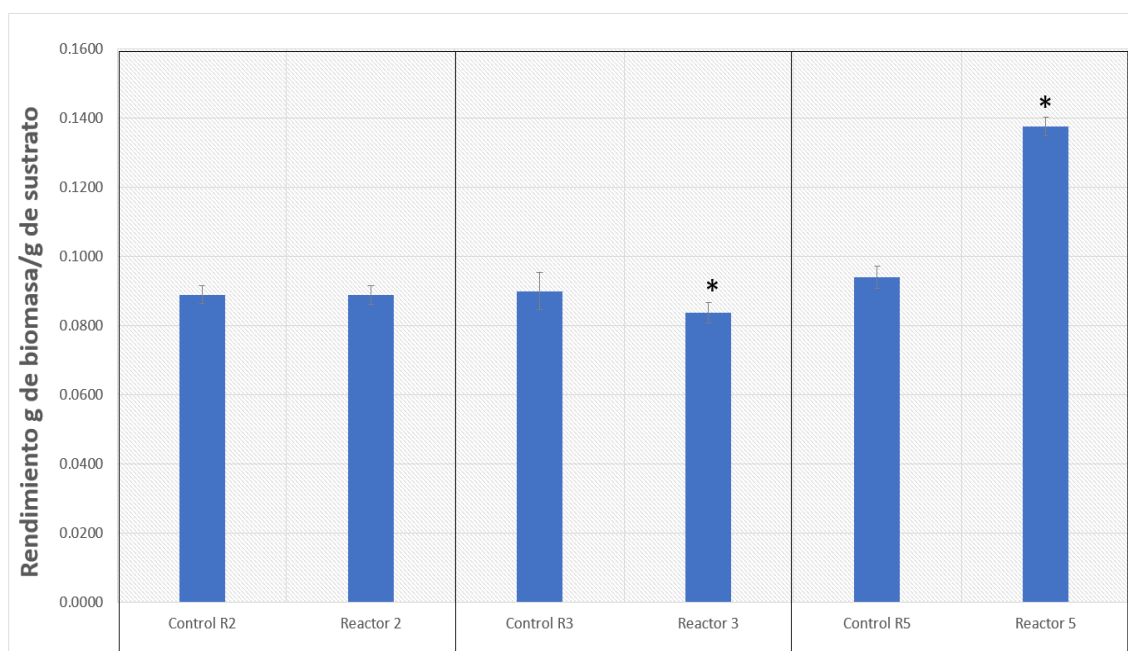


Figura 22. Rendimiento de biomasa respecto a sustrato de los sistemas de electrofermentación y sus controles. (* indica una diferencia significativa $p < 0.05$)

Dado que el sistema de electrofermentación con mejores resultados fue el perteneciente al reactor 5, se llevó a cabo el proceso de fermentación más allá de la fase exponencial de crecimiento, prolongando su operación por 5 días. La cinética de la fermentación prolongada se observa en la Figura 23 y podemos apreciar que el comportamiento anterior se mantiene, es decir, dentro de la celda electrolítica se genera mayor cantidad de biomasa y el consumo de sustrato es menor comparado al control. En este tiempo se alcanza la fase estacionaria de crecimiento de

Clostridium acetobutylicum. El rendimiento final tanto en el reactor como en el control fueron de 0.14 y 0.11 g de biomasa por gramo de glucosa, respectivamente. Durante el periodo de fermentación también se midió el pH del medio, partiendo de un valor de 6.2 tanto para el tratamiento como el control, el pH fue disminuyendo durante las primeras 24 horas (Figura 24).

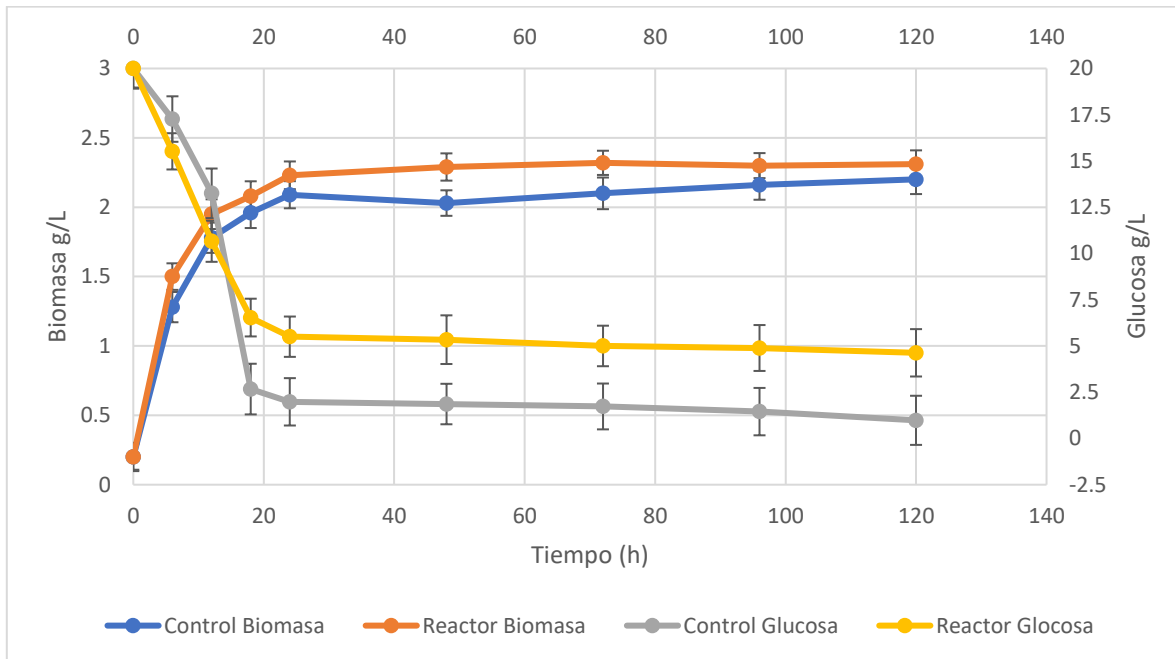


Figura 23. Biomasa generada contra consumo de glucosa en fase exponencial y estacionaria en el reactor 5.

El descenso del pH tanto en el control como en el reactor no fue el mismo, dado que en el reactor se alcanzaron valores más ácidos durante las primeras 18 horas y a las 24 el pH comienza a restablecerse por encima del 5.5. En el control el valor más ácido es cercano a 4.5 y el valor al final de la fermentación es de 5. Los cambios de pH están relacionados con la concentración de los compuestos sintetizados por la bacteria en función de su metabolismo, el cual varía según la fase o estadio activo de acuerdo con su ciclo de vida (Yoo et al., 2020). *Clostridium acetobutylicum* presenta dos principales fases, la fase acidogénica, cuando produce tanto ácido acético como ácido butírico para la obtención de ATP. Dicha fase se presenta durante su crecimiento exponencial dado que es cuando más energía necesita para

sus procesos de división y maduración (Papoutsakis, 2000). La presencia de estos ácidos en el medio, ya que son excretados por la bacteria, acidifica el pH el medio, no obstante, existe un valor de pH limitante para la bacteria (Huang et al. 1985). reporta que debajo de 4.5 resulta perjudicial para *Clostridium acetobutylicum* por lo que comienza a asimilar los ácidos producidos para reducirlos y convertirlos en solventes. A esta fase se le conoce como solventogénesis y se da en la fase estacionaria de la bacteria hasta el momento en el que comienza a formar esporas (Moon et al., 2016). La asimilación tanto del ácido acético como ácido butírico por la bacteria produce acetona, etanol y butanol, estos compuestos ya no poseen un carácter tan ácido como los anteriores y es por ello que se da un aumento de pH en el medio (Malaviya et al., 2012).

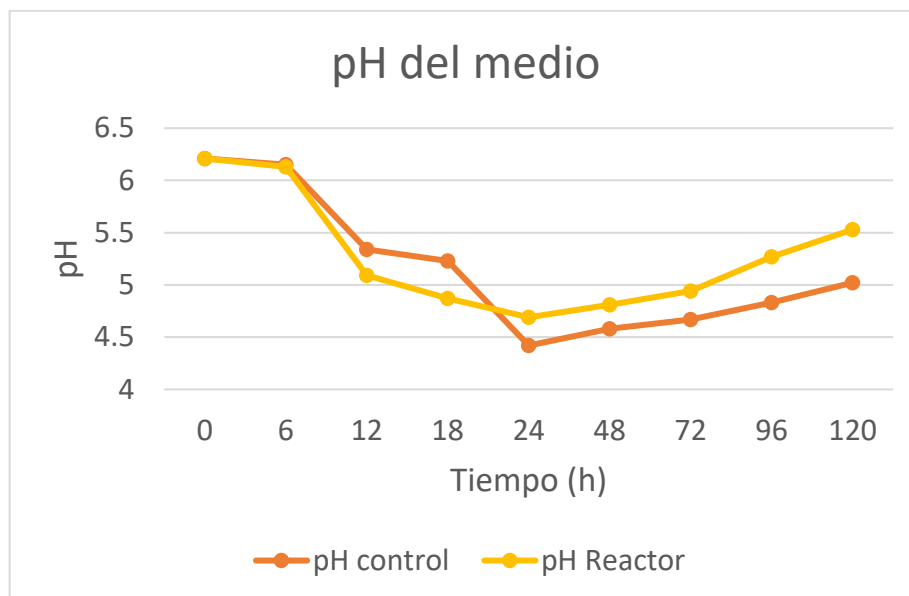


Figura 24. Valores de pH del medio de cultivo.

El hecho de que el comportamiento del pH en el reactor 5 y el control sean diferentes principalmente entre las 0 y 24 horas, indica un cambio en el comportamiento metabólico en la fase exponencial de crecimiento. Puede interpretarse como una aceleración en la producción de los ácidos, al mismo tiempo que ocurre una pronta asimilación de estos para producir los solventes. En este caso el solvente de interés es el butanol (Yoo et al., 2020).

Para finalizar, se identificó el contenido de ácido butírico y butanol en las primeras 24 horas de fermentación, tanto en el control como en el sistema de electrofermentación con electrodos de grafito, mediante cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas. En la Figura 25 podemos observar la mezcla de estándares tanto para el ácido como para el solvente, siendo los tiempos de retención de 7.2 y 5.2 respectivamente. Los patrones de fragmentación que corroboran la presencia de dichas compuestas se encuentran en los Anexos 4 y 5.

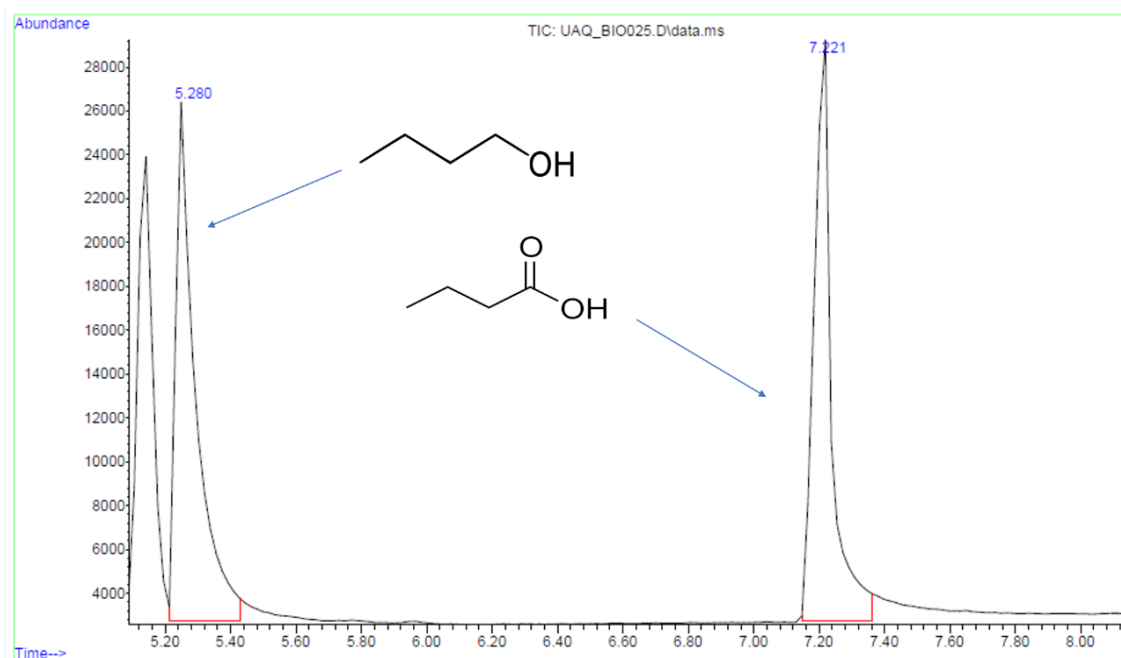


Figura 25. Cromatograma de la mezcla de estándares.

La transformación de ácido butírico a butanol consiste en una reacción de reducción con la formación de butilaldehído como intermediario, lo que significa que los cofactores de las enzimas involucradas en dicho proceso deben oxidarse, es decir que el NAD(P)H pasa a NADP⁺. Mediante los electrodos, en especial el cátodo podemos regenerar al cofactor o cofactores con el fin de que sigan catalizando la síntesis de butanol (Rabaey y Rozendal, 2010).

En la Figura 26 muestra los cromatogramas obtenidos tanto para el control como para el reactor a las 6, 12, 18 y 24 horas. Los picos que aparecen a las 6 horas en

ambos casos pertenecen al ácido butírico. Como ya se mencionó, durante las primeras horas del crecimiento de la bacteria lo que se produce son principalmente ácidos a partir de la descomposición de la glucosa. A las 12 horas los picos del ácido butírico continúan apareciendo con sus áreas incrementadas tanto para el control como para el reactor 5, sin embargo, cabe destacar que la presencia de un segundo pico con el tiempo de retención igual al butanol en el cromatograma concerniente al reactor 5 comprueba la aceleración del metabolismo de *Clostridium acetobutylicum*. Ya que en el control la presencia del pico del butanol se hace presente hasta las 18 horas. Dichos resultados correlacionan con el comportamiento en los cambios de pH descritos con anterioridad. A las 24 horas, el pico del butirato ya no está presente en ningún caso por lo que posterior a este tiempo se llega a la fase estacionaria de crecimiento, la mayor parte de butirato ha pasado a ser asimilado por la bacteria para ser transformado en solvente.

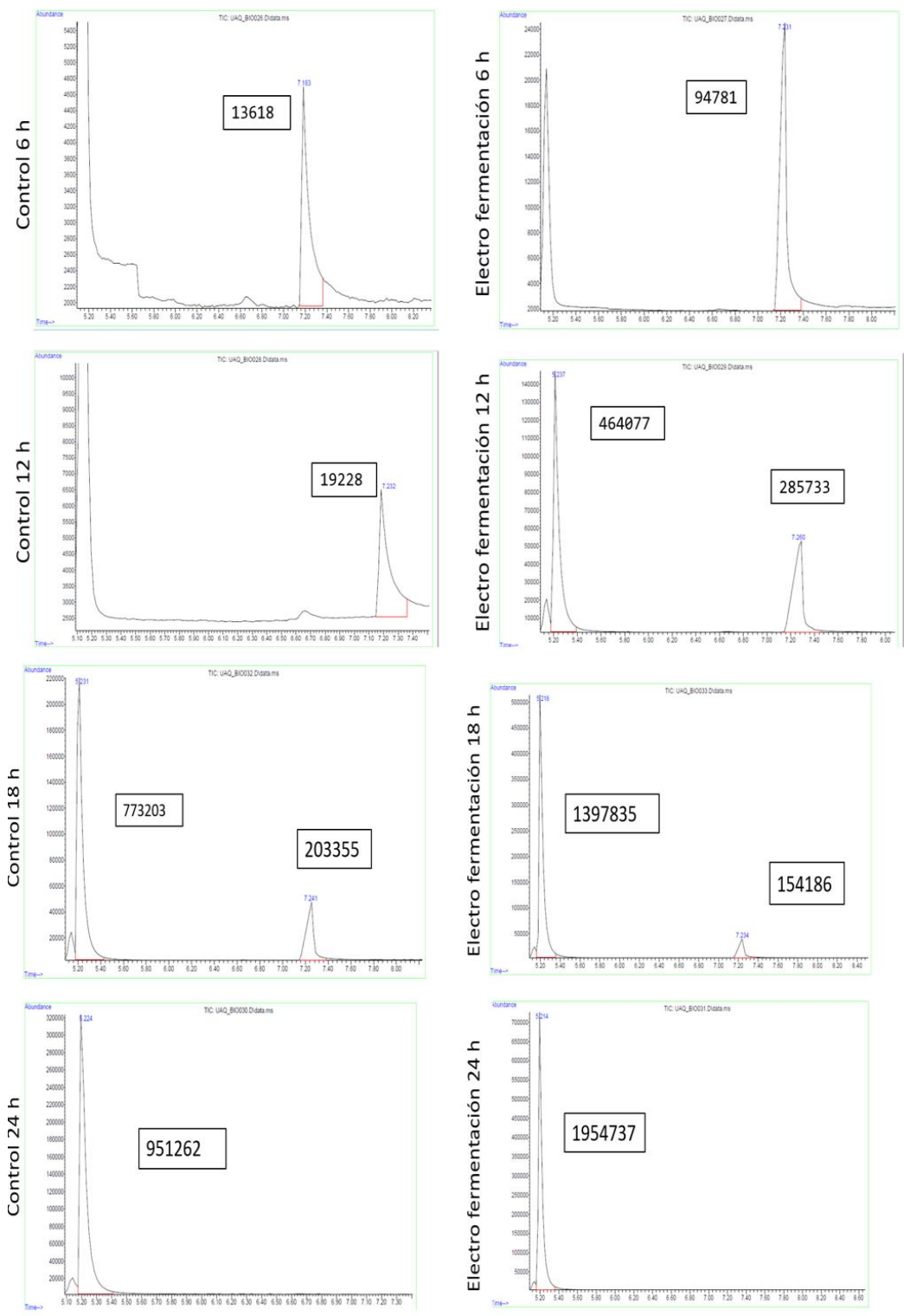


Figura 26. Cromatogramas.

Dado que no se realizó previamente una curva de calibración para los análisis de cromatografía de gases, los resultados no pueden ser expresados en unidades de concentración y tampoco se puede reportar una cantidad final de butanol, no obstante, se pueden comparar las áreas de los picos de las cuales se puede obtener una proporción en cuanto al incremento. En la Figura 25 se muestran las áreas de los picos de la Figura 24. Se puede observar mejor el comportamiento de la producción del butirato y el butanol a lo largo del tiempo. En color verde claro y azul se aprecian los picos de producción de butirato para el control y el reactor 5, observamos que están desfasados por un periodo de 6 horas además de presentar un incremento en el reactor. Para el caso del butanol que se muestra con el color amarillo y verde oscuro, su producción comienza cuando sucede el máximo de producción de ácido y para el caso del sistema de electrofermentación hay un incremento del 2.05 con respecto a sus áreas, es decir un incremento de poco más del doble.

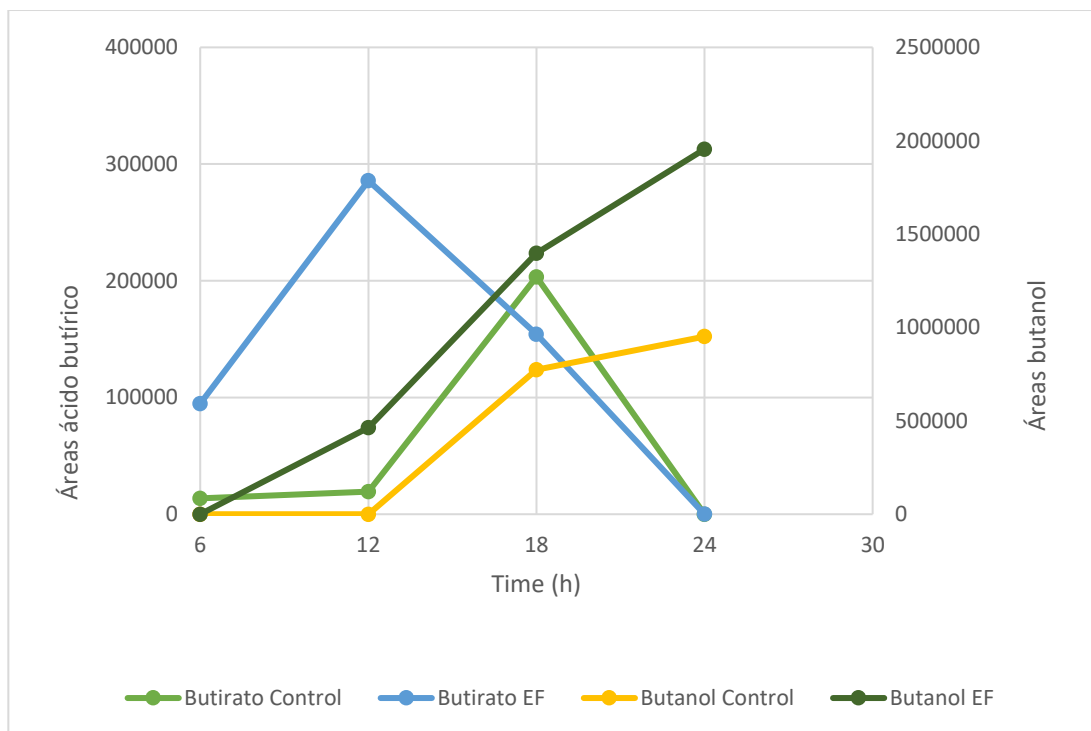


Figura 27. Áreas de las señales del butirato/butanol.

7 CONCLUSIONES

La suplementación del medio fue determinante en el rendimiento de *Clostridium acetobutylicum* siendo inversamente proporcional a la concentración de glucosa. La relación C/N tuvo efecto sobre la producción de biomasa en *Clostridium acetobutylicum* obteniéndose un máximo rendimiento para dichas pruebas de 0.092

La aplicación de campos magnéticos débiles generados a partir de un embobinado mostró una diferencia significativa en el rendimiento para el caso de *Clostridium acetobutylicum*, pero en un sentido desfavorable, no obstante, se sugiere probar la aplicación de CM mediante otros sistemas para descartar la variación de temperatura inherente a los sistemas probados en el presente trabajo.

Las características de los materiales que son empleados como electrodos, influyen en las reacciones que suceden en el medio de cultivo. El grafito al poseer una mayor biocompatibilidad mostró ser el material idóneo para ser usado en sistemas de electrofermentación.

La adición de un sistema de flujo de electrones mediante conductores sólidos de grafito logró modular en sentido positivo el metabolismo de *Clostridium acetobutylicum*. Se obtuvo un rendimiento 0.14 contra rendimientos por debajo de 0.1. Se identificó una aceleración en la producción tanto del butirato como del butanol sin aumentar considerablemente la población bacteriana. Finalmente se obtuvo un incremento del doble en la producción del biocombustible de interés.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ajala, O., Aberuagba, F., Odetoye, T., y Ajala, A. (2015). Biodiesel: Sustainable Energy Replacement to Petroleum-Based Diesel Fuel - A Review. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 145–156.
- Alonso, M., Finn, J. (1976). *FÍSICA Volumen II: Campos y ondas*. Fondo de cultura interamericano.
- Amaro-Reyes, A., Gracida, J., Huizache-Peña, N., Elizondo-García, N., Salazar-Martínez, J., García Almendárez, B. E., & Regalado, C. (2016). On-site hydrolytic enzymes production from fungal co-cultivation of Bermuda grass and corn cob. *Bioresource Technology*, 212, 334–337.
- Bhagchandani, D., Babu, R., & Sonawane, J. (2020). A Comprehensive Understanding of Electro-Fermentation. *Fermentation*, 1–31.
- Bharathiraja, B., Jayamuthunagai, J., Sudharsana, T., Bharghavi, A., Praveenkumar, R., Chakravarthy, M., & Devarajan, Y. (2017). Biobutanol – An impending biofuel for future: A review on upstream and downstream processing techniques. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 68, 788–807.
- Bhatt, A., Rathour, R., Ahuja, V., y Bhatia, R. (2018). Biobutanol: New era of biofuels. *International Journal of Energy Research*, 42(15), 4532–4545.
- Briceño V., Gabriela. (2019). *Campo magnético*. Recuperado el 15 mayo, 2022, de Euston96: <https://www.euston96.com/campo-magnetico/>
- Castellarnau, M., Zine, N., Bausells, J., Madrid, C., Juárez, A., Samitier, J., y Errachid, A. (2008). ISFET-based biosensor to monitor sugar metabolism in bacteria. *Materials Science and Engineering C*, 28(5–6), 680–685.
- Choi, O., Kim, T., Woo, H. M., & Um, Y. (2014). Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*. *Scientific Reports*, 4. 3(1)3–329
- Costa, J. A. V., & de Morais, M. G. (2011). The role of biochemical engineering in

the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, 102(1), 2–9.

Desai, R., Harris, L. M., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. (1999). Metabolic Flux Analysis Elucidates the Importance of the Acid-Formation Pathways in Regulating Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*. *Metabolic Engineering*, 1(3), 206–213.

Dürre, P. (2016). Physiology and sporulation in clostridium. *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems*, 313–329.

Feng, H., Dhamole, P., Wang, Z., Liu, Y., y Wang, B. (2012). Extractive fermentation with non-ionic surfactants to enhance butanol production. *Biomass and Bioenergy*, 40, 112–119.

Garcia-Segura, S., Centellas, F., Arias, C., Garrido, J. A., Rodríguez, R. M., Cabot, P. L., & Brillas, E. (2011). Comparative decolorization of monoazo, diazo and triazo dyes by electro-Fenton process. *Electrochimica Acta*, 58(1), 303–311.

Gong, Z., Yu, H., Zhang, J., Li, F., & Song, H. (2020). Microbial electro-fermentation for synthesis of chemicals and biofuels driven by bi-directional extracellular electron transfer. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(4), 304–313.

He, A., Yin, C., Xu, H., Kong, X., Xue, J. W., Zhu, J., Jiang, M., y Wu, H. (2016). Enhanced butanol production in a microbial electrolysis cell by *Clostridium beijerinckii* IB4. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(2), 245–254.

Hirose, A., Kouzuma, A., y Watanabe, K. (2019). Towards development of electrogenetics using electrochemically active bacteria. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107351.

Ho, D., Ngo, H., y Guo, W. (2014). A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresource Technology*, 169, 742–749. 2

Huang, L., Gibbins, L., y Forsberg, C. (1985). Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. *Applied and Environmental*

Microbiology, 50(4), 1043–1047.

- Janssen, H., Wang, Y., & Blaschek, H. P. (2014). Clostridium: Clostridium acetobutylicum. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 29(1), 41–45
- Kaminski, W., Tomczak, E., & Gorak, A. (2011). Bioutanol - Production and Purification Methods. *Ecological Chemistry and Engineering*, 18(1), 31–37.
- Khosravanipour Mostafazadeh, A., Drogui, P., Brar, S., Tyagi, R., Le Bihan, Y., Buelna, G., y Rasolomanana, S. (2016). Enhancement of biobutanol production by electromicrobial glucose conversion in a dual chamber fermentation cell using *C. pasteurianum*. *Energy Conversion and Management*, 130, 165–175.
- Konur, O. (2018). Cyanobacterial Bioenergy and Biofuels Science and Technology: A Scientometric Overview. In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*, 18(1), 31–37.
- Lin, C. Y., y Lay, C. H. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(1), 41–45.
- Liu, X., y Yu, X. (2020). Enhancement of Butanol Production: From Biocatalysis to Bioelectrocatalysis. *ACS Energy Letters*, 5(3), 867–878.
- Lovley, D. (2011). Powering microbes with electricity: Direct electron transfer from electrodes to microbes. *Environmental Microbiology Reports*, 3(1), 27–35.
- Malaviya, A., Jang, Y., y Lee, S. (2012). Continuous butanol production with reduced byproducts formation from glycerol by a hyper producing mutant of Clostridium pasteurianum. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(4), 1485–1494.
- Masood, S., Saleem, I., Smith, D., y Chu, W. (2020). Growth Pattern of Magnetic Field-Treated Bacteria. *Current Microbiology*, 77(2), 194–203.
- Mathew, A., Wang, J., Luo, J., y Yau, S. (2015). Enhanced ethanol production via electrostatically accelerated fermentation of glucose using *Saccharomyces*

- cerevisiae. *Scientific Reports*, 5, 1–6.
- Moon, H. G., Jang, Y. S., Cho, C., Lee, J., Binkley, R., & Lee, S. Y. (2016). One hundred years of clostridial butanol fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 363(3).
- Nakagawa, G., Kouzuma, A., Hirose, A., Kasai, T., Yoshida, G., y Watanabe, K. (2015). Metabolic characteristics of a glucose-utilizing shewanella oneidensis strain grown under electrode-respiring conditions. *PLoS ONE*, 10(9), 1–14.
- Niemistö, J., Saavalainen, P., Pongrácz, E., & Keiski, R. (2013). Biobutanol as a potential sustainable biofuel - Assessment of lignocellulosic and waste-based feedstocks. *Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems*, 1(2), 58–77.
- Paiano, P., Menini, M., Zeppilli, M., Majone, M., y Villano, M. (2019). Bioelectrochemistry Electro-fermentation and redox mediators enhance glucose conversion into butyric acid with mixed microbial cultures. *Bioelectrochemistry*, 130, 107333.
- Papoutsakis, E. (2000). Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(6), 813–826.
- Toledo-Alarcón, J., Fuentes, L., Etchebehere, C., Bernet, N., y Trably, E. (2020). Glucose electro-fermentation with mixed cultures: A key role of the Clostridiaceae family. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(2), 1694–1704.
- Rabaey, K., y Rozendal, R. (2010). Microbial electrosynthesis - Revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 706–716.
- Schievano, A., Pepé Sciarria, T., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S., Rabaey, K., y Pant, D. (2016). Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 866–878.

- Sravan, J., Butti, S., Sarkar, O., Mohan, S. (2018). Electrofermentation: Chemicals and Fuels. *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Microbial Electrochemical Technology: Sustainable Platform for Fuels, Chemicals and Remediation*, 723–737.
- Strašák, L., Vetterl, V., & Šmarda, J. (2002). Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectrochemistry*, 55(1–2), 161–164.
- Toledo-Alarcón, J., Fuentes, L., Etchebehere, C., Bernet, N., & Trably, E. (2020). Glucose electro-fermentation with mixed cultures: A key role of the Clostridiaceae family. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(2), 1694–1704.
- Yoruklu, H., Koroglu, E., Demir, A., y Ozkaya, B. (2018). The electromotive-induced regulation of anaerobic fermentation: Electrofermentation. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Microbial Electrochemical Technology: Sustainable Platform for Fuels, Chemicals and Remediation*. Elsevier B.V.
- Yoo, M., Nguyen, N., y Soucaille, P. (2020). Trends in Systems Biology for the Analysis and Engineering of *Clostridium acetobutylicum* Metabolism. *Trends in Microbiology*, 28(2), 118–140.

9. ANEXOS

DESCRIPTION		Alpha			0.05			
<i>Group</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Mean</i>	<i>Variance</i>	<i>SS</i>	<i>Std Err</i>	<i>Lower</i>	<i>Upper</i>
Control R2	3	0.26742	0.08914	5.868E-07	1.1736E-06	0.0044537	0.08790345	0.09037655
Reactor 2	3	0.2654	0.08846667	6.0333E-07	1.2067E-06	0.0044537	0.08723012	0.08970322
ANOVA								
<i>Sources</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>	<i>Eta-sq</i>	<i>RMSSE</i>	<i>Omega Sq</i>
Between Groups	6.8007E-07	1	6.8007E-07	1.14284114	0.34527449	0.2222198	0.61720908	0.02325327
Within Groups	2.3803E-06	4	5.9507E-07					
Total	3.0603E-06	5	6.1207E-07					

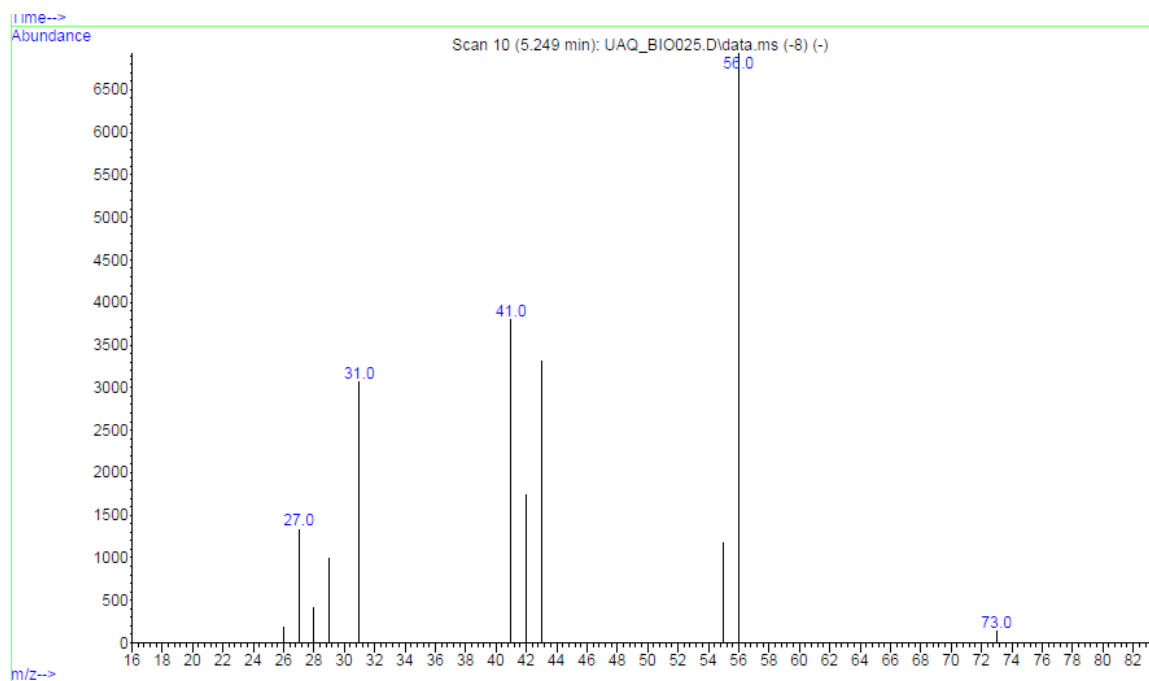
Anexo 1. ANOVA para Reactor 2 y Control

DESCRIPTION		Alpha			0.05			
<i>Group</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Mean</i>	<i>Variance</i>	<i>SS</i>	<i>Std Err</i>	<i>Lower</i>	<i>Upper</i>
Control R3	3	0.2702	0.09006667	4.4333E-07	8.8667E-07	0.0061554	0.08835766	0.09177568
Reactor 3	3	0.2511	0.0837	1.83E-06	3.66E-06	0.0061554	0.08199099	0.08540901
ANOVA								
<i>Sources</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>	<i>Eta-sq</i>	<i>RMSSE</i>	<i>Omega Sq</i>
Between Groups	6.0802E-05	1	6.0802E-05	53.4912023	0.00185913	0.93042414	4.22260592	0.89742047
Within Groups	4.5467E-06	4	1.1367E-06					
Total	6.5348E-05	5	1.307E-05					

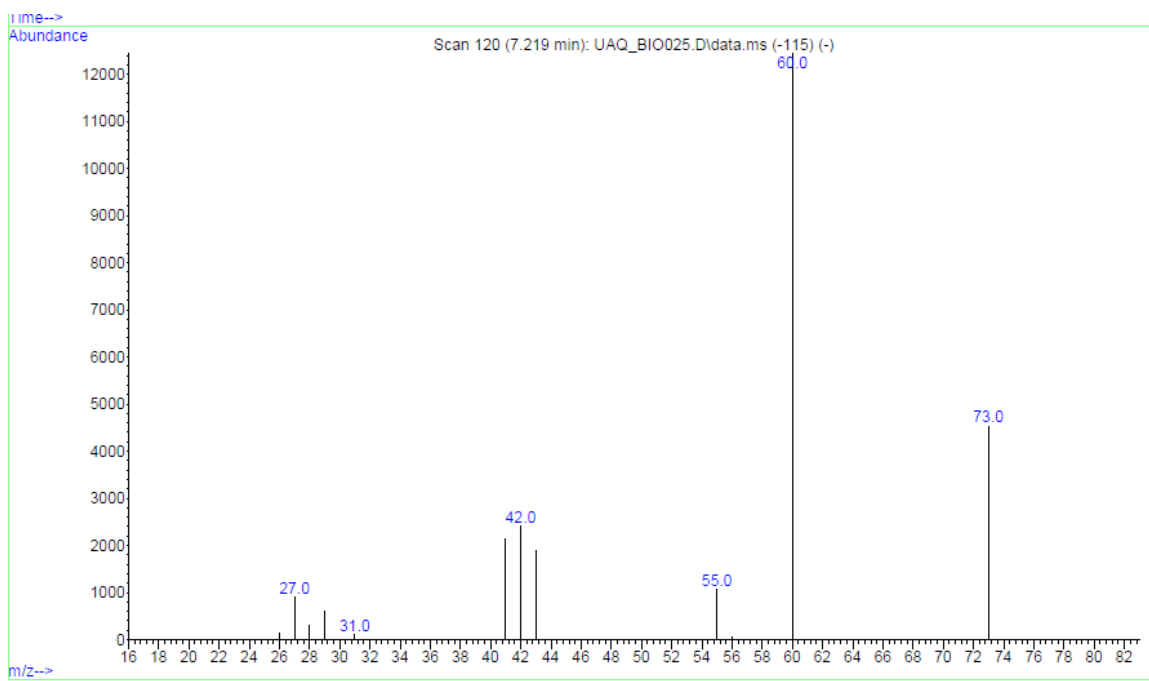
Anexo 2. ANOVA para Reactor 3 y Control

DESCRIPTION		Alpha			0.05			
<i>Group</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Mean</i>	<i>Variance</i>	<i>SS</i>	<i>Std Err</i>	<i>Lower</i>	<i>Upper</i>
Control R5	3	0.28182	0.09394	2.08E-08	4.16E-08	0.00334417	0.0846551	0.1032249
Reactor 5	3	0.4128	0.1376	0.00006708	0.00013416	0.00334417	0.1283151	0.1468849
ANOVA								
<i>Sources</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>	<i>Eta-sq</i>	<i>RMSSE</i>	<i>Omega Sq</i>
Between Groups	0.00285929	1	0.00285929	85.2238245	0.00076524	0.95516892	5.32991008	0.93349872
Within Groups	0.0001342	4	3.355E-05					
Total	0.0029935	5	0.0005987					

Anexo 3. ANOVA para Reactor 5 y Control



Anexo 4. Patrón de fragmentación para el ácido butírico



Anexo 5. Patrón de fragmentación para el butanol