

Análisis de la producción de biobutanol en la fermentación acetobutilica con *clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564

Analysis of the production of biobutanol in the acetobutylc fermentation with *clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564

*Juan Jacobo Jaramillo Obando, Carlos Ariel Cardona**

Departamento de Ingeniería Química, Plantas Piloto de Biotecnología y Agroindustria. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. Carrera 27 N.º 64-60

(Recibido el 11 de noviembre de 2009. Aceptado el 27 de octubre de 2010)

Resumen

Se estudiaron las condiciones y características de la producción de biobutanol en la fermentación ABE. Se usó un modelo cinético de crecimiento celular estructurado siguiendo la vía metabólica propuesta por Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para el *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564 en un esquema de reacción de flujo continuo y tanque agitado. Se realizó un análisis de sensibilidad y una optimización con base en las variables de decisión de productividad de butanol, rendimiento de glucosa a butanol y conversión global de glucosa para diferentes concentraciones de alimentación y tasa de dilución resultando en valores de productividad de 27,46 mM h⁻¹, rendimiento de 0,65 mmol de butanol por mmol de glucosa y conversión de 95,38% finales a una concentración de alimentación óptima de 295 mM y tasa de dilución final de 0,15 h⁻¹.

----- **Palabras clave:** Biobutanol, fermentación ABE, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564

Abstract

The conditions and characteristics of biobutanol production in ABE fermentation were studied. A cell growth kinetic model structured according to the proposed metabolic pathway Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway

* Autor de correspondencia: teléfono: + 57 + 6 + 887 94 00 ext. 55880, fax: + 57 + 6 + 887 93 00 ext. 50199, correo electrónico: ccardonaal@unal.edu.co (C. Cardona). Manizales. Colombia

for the *Clostridium Saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564 reaction scheme was used in a continuous flow stirred tank. A sensitivity analysis and optimization based on the decision variables butanol productivity, glucose to butanol yield and glucose global conversion for different feed concentrations and dilution rate were performance. Productivity values of 27,46 mM h⁻¹, yield of 0,65 mmol of butanol per mmol of glucose and final conversion of 95,38% at optimal food concentration of 295 mM and optimal final dilution rate of 0,15 h⁻¹ were obtained.

----- **Keywords:** Biobutanol, ABE fermentation, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564

Introducción

Diversos procesos microbianos fueron desarrollados, antes de la Primera Guerra Mundial. Uno de los pioneros de aquel momento fue Chaim Weizmann, quién realizó una importantísima investigación sobre la producción de acetona utilizada en explosivos, butanol y etanol a través de la fermentación llevada a cabo por la bacteria *Clostridium acetobutylicum*, denominada luego como la fermentación ABE.

La fermentación ABE (producción biotecnológica de Acetona, Butanol y Etanol) fue utilizada por numerosos países hasta los años 50, momento en que los procesos basados en petróleo reemplazaron a aquellos de fermentación por microorganismos. Las plantas con fermentadores fueron cerradas. Pero en 1973, la crisis del petróleo renovó el interés en la investigación, desarrollo e implantación de los procesos de fermentación.

Gracias a los avances relacionados al genoma del *Clostridium acetobutylicum*, sumado al abaratamiento de los sustratos utilizados, y con el desarrollo de nuevas técnicas que mejoran el rendimiento, renació el interés por la fermentación ABE en los últimos años acentuada a la producción de butanol.

Este compuesto al ser utilizado como combustible (en forma de mezclas) es llamado “biobutanol” esto con el fin de remarcar su origen vegetal, puesto que el butanol puede producirse también a partir de combustibles fósiles, con las mismas propiedades químicas.

Expertos de diferentes empresas del sector químico como BP y DuPont [1] destacan las ventajas del butanol como carburante con respecto al etanol:

- Alcanza el 95% de energía que el mismo volumen de gasolina, mientras que el etanol no pasa del 75%.
- Se puede mezclar con la gasolina convencional, sin tener que hacer adaptaciones en los automóviles, en una proporción mayor que el etanol.
- Tolera mejor la contaminación por agua, es menos corrosivo y tiene una menor presión de vapor que el etanol, por lo que se puede mezclar directamente con la gasolina en la refinería y enviarlo por las mismas infraestructuras petroleras de transporte, algo que no es posible con el etanol.
- El proceso fermentativo ABE es completamente anaerobio, por lo tanto no es necesario mantener una oxigenación constante y uniforme en todo el mosto.
- No requiere sacarificación del almidón debido a que el *Clostridium acetobutylicum* posee y produce las enzimas necesarias para la sacarificación del almidón, con lo cual se ahorra este proceso previo. [1,2]

Después de analizar y simular el proceso de fermentación ABE con el uso de expresiones cinéticas basados en el modelo estructurado propuesto por Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) [3] se es-

tudió la forma de aumentar la productividad de butanol, el rendimiento de glucosa a butanol y la conversión global de glucosa en la fermentación ABE. Se analizaron procesos continuos y discontinuos con diferentes arreglos de biorreactor identificando los rendimientos y productividades en cada uno, esto con el fin de proponer una opción tecnológica eficiente para la fermentación ABE.

Fundamento teórico

La tecnología y aplicación de la fermentación ABE para la producción de biobutanol como el combustible del futuro presenta en la actualidad gran desarrollo y objeto de investigación alrededor del mundo. La DuPont y British Petroleum que han presentado sus desarrollos para producir butanol conjuntamente con la British Sugar anunciaron que van a construir la 1ª planta de producción de butanol en Norfolk - Inglaterra, la cual tendrá un costo de US\$ 46 millones. En este caso, la materia prima será preferentemente remolacha azucarera, aunque también puede obtenerse de maíz, caña de azúcar o cualquier producto rico en azúcar o almidón. En la figura 1 por ejemplo, podemos ver un esquema de un bioproceso para la elaboración de acetona, butanol y etanol en la antigua URSS [4] en el cual la producción es de alrededor de 70000 ton/año de solventes, seguido por una producción secundaria de vitaminas y proteína de levadura. Es interesante observar las posibilidades que brinda el sector agroindustrial y sus residuos a los bioprocesos, y a su vez, el tratamiento de estos para aprovecharlos al máximo en subproductos de alto valor agregado y que tienen un bajo impacto ambiental y residual.

Sin embargo, la fermentación ABE cuenta con desventajas económicas, que son asociadas fundamentalmente a la estequiometría y a la primera ley de la termodinámica, es decir, que el balance de materia y energía durante el proceso fermentativo nunca se va a satisfacer, esto debido a las necesidades de mantenimiento celular y factores de tipo metabólico en el proceso. Para el caso específico de la fermentación ABE, existen ciertas inquietudes en cuanto al desempeño económico del proceso. [5] El rendimiento máximo de la fer-

mentación ABE varía según el microorganismo utilizado, pero se ha llegado a valores de alrededor de $Y_{PG}^{max} = 37\%$ (se refiere al rendimiento de butanol con respecto al sustrato glucosa).

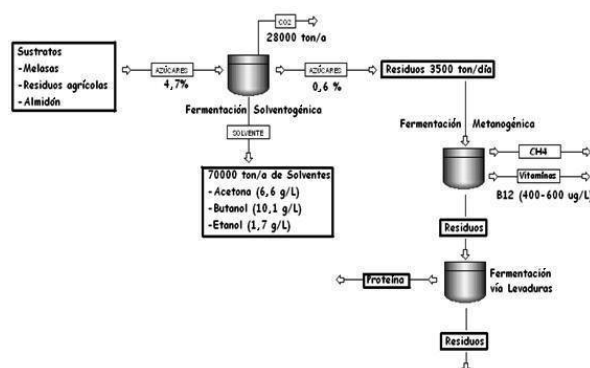


Figura 1. Bioproceso para elaboración de acetona / butanol / etanol en la Unión Soviética

Aspectos económicos de la fermentación ABE

Las proyecciones hechas por las multinacionales BP y DUPONT para el biobutanol al 2010 indican que este combustible va a ser más caro que los combustibles convencionales mientras entra en el mercado, se desarrollan la tecnología y se montan las plantas de producción masiva. Al respecto, se ha estimado un coste de producción de alrededor 2-3 Euros/Kg [5]. Es clave analizar los costos de inversión para una planta Discontinua y una planta en Continuo (Fig.2). Si se compara ambas instalaciones, los costos directos son más representativos en el caso continuo debido al grado de equipamiento y especialización de los mismos y representa un 83% del total de inversión de capital. En el proceso Discontinuo este ítem representa tan solo el 60% de la inversión capital, siendo representativos los costos indirectos, (30 % del total), en tanto que este tipo de costos para el proceso en continuo solo es un 7% del costo total de la inversión. La inversión de capital total es mucho mayor en el proceso continuo, pero a una mayor tasa de producción anual, lo cual, puede representar una tasa de retorno rápida en alrededor de 5 a 10 años.

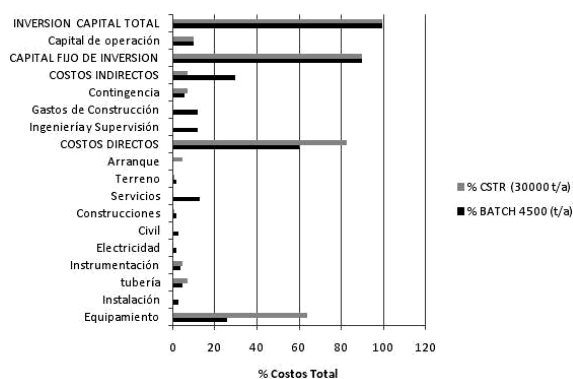


Figura 2. Costos de inversión de la fermentación ABE basado en resultados de Gapes et. al [5]

Al hablar de costos de producción para las mismas plantas, el costo para una planta continua en comparación al de la planta Discontinua es mucho mayor, siendo el ítem más representativo el costo de la operación, que se traduce en los costos directos, que oscila en un 27 %, debido a la automatización y la operación como tal de la planta instalada. De nuevo, la inversión se puede recuperar rápido para una demanda grande del mercado en comparación a la operación discontinua.

Microorganismos para la fermentación Abe

El microorganismo más estudiado y alterado genéticamente para la producción de acetona, butanol y etanol es el *Clostridium acetobutylicum*. Las bacterias del genero *Clostridium* son bacterias Gram positivas, formadoras de endosporas, anaerobias estrictas y entre su gama se encuentran tanto microorganismos patógenos (*Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*) y no-patógenos. Las bacterias del genero *Clostridium* son fermentadoras pro excelencia, dependiendo del sustrato, la vía metabólica y la cepa, sintetizan variedad de ácidos orgánicos, grasos y solventes.

Sin embargo, el *Clostridium acetobutylicum* es el microorganismo que resulta más especializado en la producción de solventes, y en este caso, muestra una gran producción de butanol vía metabólica. Los estudios sobre este microorganismo han llevado a descubrir variedades del mismo género y a alterarlo genéticamente para aumentar el

rendimiento hacia el metabolito principal de la fermentación ABE [6,7]. Entre los *Clostridium* involucrados en la fermentación ABE se citan:

- *Clostridium acetobutylicum*
- *Clostridium beijerinckii*
- *Clostridium saccharobutylicum*
- *Clostridium tetanomorphum*

En el presente trabajo se realizó una comparación de rendimientos de cada microorganismo de este género con respecto a la concentración de sustrato (glucosa) en un medio TYA. Con base en los resultados obtenidos en publicaciones anteriores [6,7]. El mejor rendimiento se presenta en la cepa modificada *Clostridium saccharoperacetobutylicum NI-4* e igual a 32,5%, que disminuye con respecto al aumento en porcentaje de glucosa en el medio de cultivo. De este estudio se concluye que existe una concentración crítica de glucosa que inhibe por completo el crecimiento del microorganismo.

La variedad de cadenas de microorganismos modificadas genéticamente para la fermentación ABE revela la optimización del medio de cultivo que mejor favorezca el crecimiento de la bacteria evitándose con esto, la inhibición tanto por sustrato (usualmente glucosa) y por producto (butanol) en las fases acidogénica y solvatogénica.

Vía metabólica de la fermentación Abe

La ruta metabólica para la producción de acetona-butanol-etanol [3] (Fig. 3) comprende 2 fases distintas pero características de la fermentación, que son nombradas comúnmente como fases de Acidogénesis y Solventogénesis. La primera fase comprende la formación de ácido Acético y Butírico con ATP durante el crecimiento exponencial de las células. A este le sigue una fase de crecimiento estacionario, donde la Solventogénesis toma lugar, los ácidos son reasimilados, y acetona-butanol-etanol aparecen como metabolitos secundarios. Se ha demostrado experimentalmente [8] que se puede acelerar la producción de butanol mediante la alimentación de una cantidad de ácido butírico al medio reaccionante.

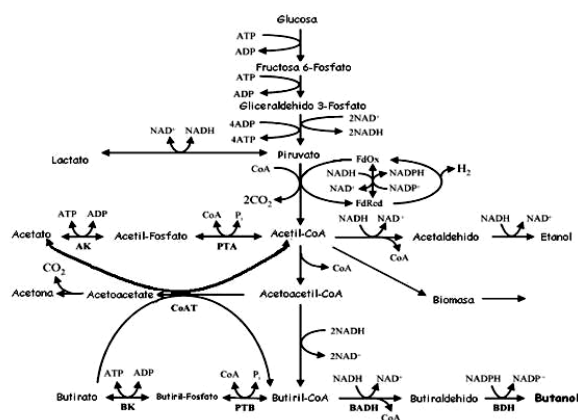


Figura 3. Ruta metabólica en *Clostridium acetobutylicum* ATCC824T

Las enzimas involucradas se abrevian como PTA: Fosfotransacetilasa; AK: Acetatokinasa; CoAT: CoA transferasa; PTB: Fosfotransbutirilasa; BK: Butirato kinas; BADH: Butiraldehído deshidrogenada; BDH: Butanol Deshidrogenada

Modelación y discusión

Con base en el modelo estudiado [3], se resolvieron los balances para un CSTBR y se obtuvieron los perfiles de concentración y rendimiento en función del tiempo de residencia en estado estable (Figura 4 y 5). Posteriormente se realizó la optimización de las variables de decisión como productividad de butanol, rendimiento de glucosa a butanol y conversión de glucosa en estado transitorio. Todo esto con el fin de tratar de solventar los problemas de convergencia debido a la alta no linealidad del modelo y los múltiples estados estables que podrían presentarse. El modelo cinético y matemático se observa a continuación:

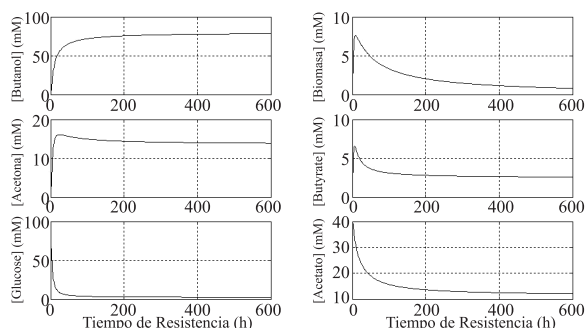


Figura 4. Perfiles de concentración en la fermentación ABE

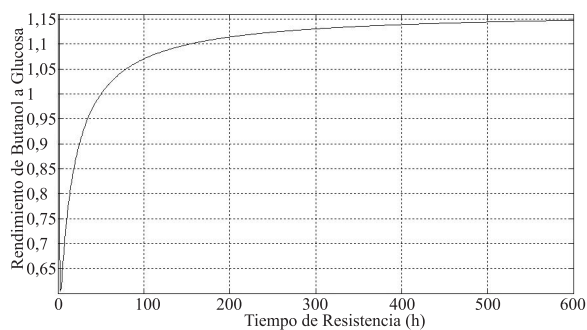


Figura 5. Rendimiento de glucosa a butanol en la fermentación ABE

Modelo cinético

Contempla las velocidades de reacción que se dan en el modelo estructurado de la vía metabólica reportada en la figura 3 y cuyos parámetros se reportan en el estudio de Hideki Shinto, et al. [3]. Así:

$$r_1 = \frac{V_{max1} [Glucosa][Biomasa]}{K_{m1} \left(1 + \frac{[Glucosa]}{K_{is1}}\right) + [Glucosa] \left(1 + \frac{[Butanol]}{K_{ii1}}\right)} * F \quad (1)$$

$$r_2 = \frac{V_{max2} [F6P][Biomasa]}{K_{m2} + [F6P]} * F \quad (2)$$

$$r_3 = \frac{V_{max3} [G3P][Biomasa]}{K_{m3} + [G3P]} * F \quad (3)$$

$$r_4 = \frac{V_{max4} [Lactato][Biomasa]}{K_{m4} + [Lactato]} * F \quad (4)$$

$$r_5 = \frac{V_{max5} [Piruvato][Biomasa]}{K_{m5} + [Piruvato]} * F \quad (5)$$

$$r_6 = \frac{V_{max6} [Piruvato][Biomasa]}{K_{m6} + [Piruvato]} * F \quad (6)$$

$$r_7 = \frac{V_{max7} [Acetato][Biomasa]}{K_{m7} + [Acetato]} * F \quad (7)$$

Modelo matemático

$$r_8 = V_{\max 8} \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m8A}}{[\text{Acetato}]}} \right) \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m8B}}{[\text{AACoA}]}} \right) [\text{Biomasa}] \quad (8)$$

$$r_9 = \frac{V_{\max 9} [\text{ACoA}] [\text{Biomasa}] * F}{K_{m9} + [\text{ACoA}]} \quad (9)$$

$$r_{10} = \frac{V_{\max 10} [\text{ACoA}] [\text{Biomasa}]}{K_{m10} + [\text{ACoA}]} \quad (10)$$

$$r_{11} = \frac{V_{\max 11} [\text{ACoA}] [\text{Biomasa}] * F}{K_{m11} + [\text{ACoA}]} \quad (11)$$

$$r_{12} = \frac{V_{\max 12} [\text{ACoA}] [\text{Biomasa}]}{K_{m12} \left(1 + \frac{[\text{Butanol}]}{K_{ii12}} \right) + [\text{ACoA}] \left(1 + \frac{[\text{Butanol}]}{K_{ii12}} \right)} \quad (12)$$

$$r_{13} = k_{13} [\text{Biomasa}] \quad (13)$$

$$r_{14} = \frac{V_{\max 14} [\text{AACoA}] [\text{Biomasa}] * F}{K_{m14} + [\text{AACoA}]} \quad (14)$$

$$r_{15} = V_{\max 15} \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m15A}}{[\text{Butirato}]}} \right) \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m15B}}{[\text{AACoA}]}} \right) [\text{Biomasa}] \quad (15)$$

$$r_{16} = \frac{V_{\max 16} [\text{Acetoacetato}] [\text{Biomasa}]}{K_{m16} + [\text{Acetoacetato}]} \quad (16)$$

$$r_{17} = \frac{V_{\max 17} [\text{Butirato}] [\text{Biomasa}] * F}{K_{m17} \left(1 + \frac{K_{a17}}{[\text{Butirato}]} \right) + [\text{Butirato}]} \quad (17)$$

$$r_{18} = \frac{V_{\max 18} [\text{BCoA}] [\text{Biomasa}] * F}{K_{m18} + [\text{BCoA}]} \quad (18)$$

$$r_{19} = \frac{V_{\max 19} [\text{BCoA}] [\text{Biomasa}] * F}{K_{m19} \left(1 + \frac{K_{a19}}{[\text{Butirato}]} \right) + [\text{BCoA}] \left(1 + \frac{[\text{Butanol}]}{K_{ii19}} \right)} \quad (19)$$

Se propone un balance completo de masa en estado transitorio considerando las simplificaciones pertinentes para el biorreactor discontinua y CSTBR. En el caso del biorreactor CSTBR se desarrolló el modelo en estado estable para reproducir los perfiles de concentración de cada metabolito y rendimiento, en tanto que se simulo el modelo en estado transitorio para el análisis de sensibilidad y optimización para las variables mencionadas. Los balances generales para cada metabolito son:

$$\frac{d[\text{Glucosa}]}{dt} = D([\text{Glucosa}]_0 - [\text{Glucosa}]) - r_1 \quad (20)$$

$$\frac{d[\text{F6P}]}{dt} = D([\text{F6P}]_0 - [\text{F6P}]) + r_1 - r_2 \quad (21)$$

$$\frac{d[\text{G3P}]}{dt} = D([\text{G3P}]_0 - [\text{G3P}]) + r_2 - r_3 \quad (22)$$

$$\frac{d[\text{Piruvato}]}{dt} = D([\text{Piruvato}]_0 - [\text{Piruvato}]) + r_3 + r_4 - r_5 - r_6 \quad (23)$$

$$\frac{d[\text{Lactato}]}{dt} = D([\text{Lactato}]_0 - [\text{Lactato}]) + r_6 - r_4 \quad (24)$$

$$\frac{d[\text{ACoA}]}{dt} = D([\text{ACoA}]_0 - [\text{ACoA}]) + r_6 + r_7 + r_8 - r_9 - r_{10} - r_{11} - r_{12} \quad (25)$$

$$\frac{d[\text{Biomasa}]}{dt} = D([\text{Biomasa}]_0 - [\text{Biomasa}]) + r_{12} - r_{13} \quad (26)$$

$$\frac{d[\text{Acetato}]}{dt} = D([\text{Acetato}]_0 - [\text{Acetato}]) + r_9 - r_7 - r_8 \quad (27)$$

$$\frac{d[\text{Etanol}]}{dt} = D([\text{Etanol}]_0 - [\text{Etanol}]) + r_{11} \quad (28)$$

$$\frac{d[\text{AACoA}]}{dt} = D([\text{AACoA}]_0 - [\text{AACoA}]) + r_{10} - r_8 - r_{14} - r_{15} \quad (29)$$

$$\frac{d[\text{Acetoacetato}]}{dt} = D([\text{Acetoacetato}]_0 - [\text{Acetoacetato}]) + r_8 - r_{15} - r_{16} \quad (30)$$

$$\frac{d[\text{BCoA}]}{dt} = D([\text{BCoA}]_0 - [\text{BCoA}]) + r_{14} + r_{15} + r_{17} - r_{18} - r_{19} \quad (31)$$

$$\frac{d[\text{Butirato}]}{dt} = D([\text{Butirato}]_0 - [\text{Butirato}]) + r_{18} - r_{15} - r_{17} \quad (32)$$

$$\frac{d[\text{Acetona}]}{dt} = D([\text{Acetona}]_0 - [\text{Acetona}]) + r_{16} \quad (33)$$

$$\frac{d[\text{CO}_2]}{dt} = D([\text{CO}_2]_0 - [\text{CO}_2]) + r_6 + r_{16} \quad (34)$$

$$\frac{d[\text{Butanol}]}{dt} = D([\text{Butanol}]_0 - [\text{Butanol}]) + r_{19} \quad (35)$$

Dichos balances alrededor del biorreactor se generalizaron para n reactores según la ecuación (36) en donde el subíndice i indica la salida de cada biorreactor y j la reacción involucrada. Cuando i es igual a cero, se toma como condición de alimentación. Los términos entre corchetes indican la concentración del metabolito en mM y D es la tasa de dilución en h^{-1} .

$$\frac{d[\text{Metabolito}]}{dt} = D_{i+1}([\text{Metabolito}]_i - [\text{Metabolito}]_{i+1}) + \sum r_j \quad (36)$$

En la figura 3 los valores finales de concentración de butanol son alrededor de 78 mM a un tiempo de residencia de 600 h, tiempo a partir del cual, la concentración de butanol no cambia de manera apreciable y se puede considerar en un valor promedio constante. De forma similar se comporta el sustrato o glucosa, agotándose hasta un valor 2,5 mM. Este valor es muy importante ya que se encuentra por encima del valor contemplado para el agotamiento energético (menor o igual a 1 mM) por ende el mecanismo de muerte celular en el modelo nunca se hace efectivo, aspecto que en el esquema Discontinuo es una limitante. Esta primera aproximación lleva a examinar la viabilidad de implantar un esquema de reacción en serie para aumentar la productividad y el rendimiento de glucosa a butanol que para el caso de un solo CSTBR es de alrededor de 1,16 mmol de butanol por mmol de glucosa. Es de anotar que los tiempos de residencia son muy altos y afectarían económicamente el proceso, más aun cuando se habla de la producción de biobutanol como un combustible emergente.

Análisis de sensibilidad y optimización

Para realizar el análisis de sensibilidad en el diseño del bioreactor se escogieron 3 concentraciones de alimentaciones de sustrato válidas y representativas en el intervalo apto del modelo cinético escogido [3] de forma tal que se observe su comportamiento y respectiva respuesta al momento de optimizar las variables escogidas. Las concentraciones de alimentación contempladas fueron de 70,6, 122 y 295 mM dado a que se pueden corroborar experimentalmente acorde a la referencia [3]. Los resultados obtenidos se observan en la figura 6, y figura 7.

Como se puede observar en la figura 6 el intervalo de tasa de dilución contemplado revela para los 3 casos de concentración de alimentación de sustrato, el régimen de lavado, el cual se incrementa conforme disminuye dicha concentración de glucosa alimentada. A su vez, es claro que aumentar la concentración de alimentación, aumenta la concentración de butanol al final de la fermentación, pero también, aumenta la cantidad de glucosa residual. Ahora, si se observa la figura 7 y tomando como variable de decisión la productividad maximizada, vemos que a medida que aumentamos la cantidad de sustrato alimentado, aumenta también la productividad, pero disminuye la conversión de glucosa a rendimientos muy parecidos para cada caso. Una visualización más completa de la situación contemplada lleva a ver el comportamiento de la productividad con respecto a la tasa de dilución y las concentraciones de alimentación con el fin de solventar el problema del tiempo de residencia tan alto hallado anteriormente. En la , se puede apreciar dicha situación de forma clara, en donde la productividad llega a un valor máximo de alrededor de 5 mM h^{-1} a altas concentraciones de alimentación de sustrato y tasas de dilución óptimas de 0,1 a 0,15 h^{-1} . Los rendimientos llegan a valores máximos de alrededor de 0,75 mM para cualquier caso de concentración de alimentación y la conversión claramente demuestra ser grande de casi 95% a valores de concentración de sustrato pequeños, aumentando conforme disminuye la tasa de dilución, que representaría un volumen de reactor grande.

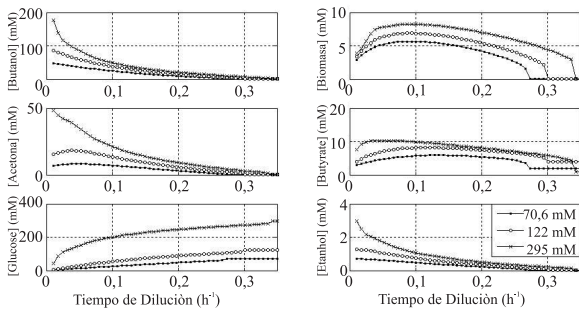


Figura 6. Análisis de sensibilidad de los perfiles de concentración de los metabolitos en consideración en CSTBR

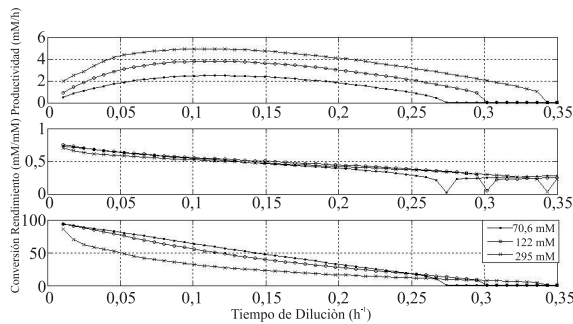


Figura 7. Análisis de sensibilidad de productividad, rendimiento y conversión en un CSTBR

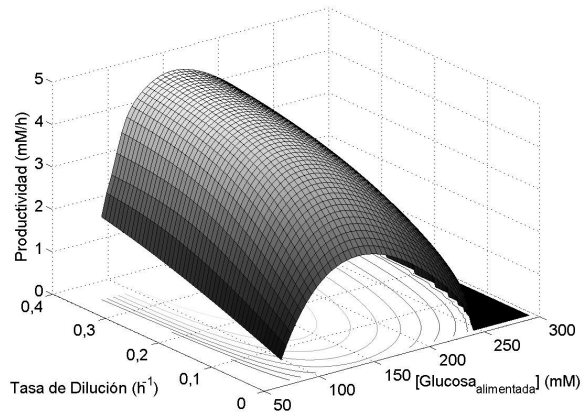


Figura 8. Comportamiento de la productividad de butanol con la concentración de alimento y la tasa de dilución

El siguiente paso a realizar para tomar una decisión sobre la concentración de alimentación óptima para diseñar sobre ella y optimizar la tasa de dilución a un máximo de productividad, conversión alta

y rendimiento grande es contemplar todos los máximos locales de la figura 8 y encontrar el máximo global o el valor más representativo de productividad de butanol. En la figura 9 se observa que los óptimos de productividad aumentan conforme se aumenta la concentración de sustrato alimentada continuamente, de ahí que tomando como criterio aumentar la productividad de butanol, se toma como ideal la concentración de alimentación de 295 mM de glucosa.

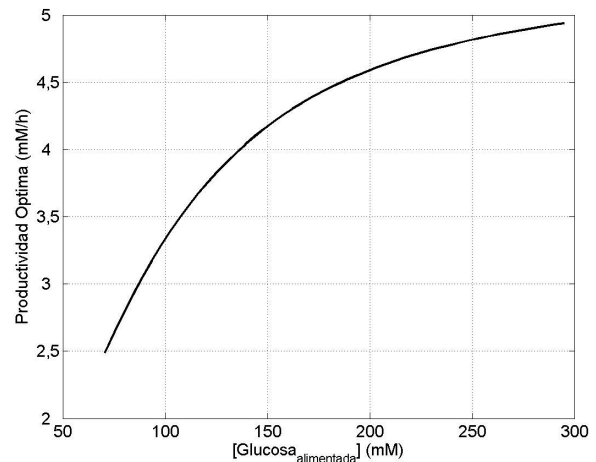


Figura 9. Productividad de butanol óptima con respecto a la concentración de alimento de glucosa

En el punto óptimo de productividad de butanol de $4,9384 \text{ mM h}^{-1}$ en un solo CSTBR se registran valores de rendimiento de glucosa a butanol de $0,5138 \text{ mmol mmol}^{-1}$ y conversión de glucosa de $30,2097 \%$ a una tasa de dilución de $0,1079 \text{ h}^{-1}$ que se traduce en $9,2678 \text{ h}$ de tiempo de residencia. (Fig. 10) Estos resultados abren la puerta para considerar el aumentar la conversión en un arreglo en serie de CSTBR tomando como base el primer biorreactor optimizado a productividad máxima. Es claro observar de la figura 10 que la productividad de butanol aumentará para cada biorreactor contemplado en el arreglo, pero como la variable de decisión ahora es la conversión hacia glucosa, dicho valor no será el óptimo, ya que optimizar al óptimo de productividad en la batería de biorreactores implicaría una serie muy larga de equipos que económicamente no sería viable para obtener un grado de conversión alto.

La optimización se realizó haciendo un balance equitativo entre conversión y productividad, dado que el rendimiento en la batería como se demostró

anteriormente es muy parecido a partir del segundo biorreactor. Los resultados de la batería de CSTBR óptimos se reportan en la tabla 1.

Tabla 1 Valores Consolidados en un arreglo de 4 biorreactores en serie para la producción de Butanol

<i>Biorreactor</i>	<i>Tasa de dilución (h⁻¹)</i>	<i>Productividad (mM h⁻¹)</i>	<i>Rendimiento (mmol/mmol)</i>	<i>Conversión (%)</i>
1	0,1078	4,9384	0,5138	30,2097
2	0,1169	12,4184	0,5825	61,8051
3	0,1315	20,0371	0,6192	83,4280
4	0,15	27,4597	0,6506	95,3798

Es de anotar además, que hay un equilibrio y una barrera natural a vencer en este montaje, debido a que en el primer CSTBR hay una baja conversión, lo que indica una gran cantidad de glucosa residual que inhibe al microorganismo por sustrato, y a medida que aumentamos dicha conversión, la inhibición por sustrato disminuye pero la inhibición por producto, es decir, butanol aumenta, llegándose a estar casi completamente inhibido el microorganismo en el 4º biorreactor. Considerando este planteamiento, la batería se optimizó a valores intermedios de productividad a partir del segundo biorreactor, dejando al último biorreactor con una inhibición grande por productos y casi nula por sustrato de modo que el mecanismo de muerte celular entre en operación en el modelo matemático.

Conclusiones

La vía metabólica para la fermentación acetobutílica contempla un estudio de modelos estructurados según Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) utilizando como sustrato glucosa, permitiendo la modelación y simulación tanto en estado estable y transitorio. En estado estable, el análisis de rendimiento demuestra que una serie de biorreactores no aumenta el rendimiento de glucosa a butanol haciendo innecesario dicho esquema, al igual que visualiza la alta no linealidad del modelo estudiado y los posibles estados estables que

reducen la convergencia hacia las solución física real sobre la que se está simulando.

Un análisis en estado transitorio sobre el estado estable en el cual los límites cinéticos son válidos, revela la capacidad de optimizar las variables de decisión: productividad de butanol, rendimiento de glucosa a butanol y conversión de global de glucosa. Los resultados obtenidos dejan ver un arreglo óptimo de 4 biorreactores de tanque agitado en flujo continuo en donde el primer reactor de la serie se encuentra maximizado hacia la productividad de butanol, a un alto rendimiento de glucosa a butanol y una baja conversión, de donde, la decisión operacional permite que en el segundo y tercer bioreactor se aumente la conversión bajo un equilibrio entre la inhibición por sustrato y por producto para que no disminuya la productividad a valores no deseables y dejando un cuarto biorreactor máximo hacia la conversión e inhibido por butanol casi por completo.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional sede Manizales (DIMA) y COLCIENCIAS.

Referencias

1. T. Ezeji, N. Qureshi, H. P. Blaskchek. "Production of acetone-butanol-ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and Clostridium

- beijerinckii". *Process Biochemistry*. Vol. 42. 2007. pp. 34-39.
2. N. Qureshi, L. L. Lai, H. P. Blaskchek. "Scale-up of a high productivity continuous biofilm reactor to produce butanol by adsorbed cells of *Clostridium beijerinckii*". *Food and Bioproducts Processing*. Vol. 82. 2004. pp. 164-173.
3. H. Shinto, Y. Tashiro, M. Yamashita, G. Kobayashi, T. Sekiguchi, T. Hanai, Y. Kuriya, M. Okamoto, K. Sonomoto. "Kinetic modeling and sensitivity analysis of Acetone-Butanol-Ethanol production". *Journal of Biotechnology*. Vol. 131. 2007. pp. 45-56.
4. A. Ishizaki, S. Michiwaki, E. Crabbe, G. Kobayashi, K. Sonomoto, S. Yoshino. "Extractive Acetone-Butanol-Ethanol fermentation using methylated crude palm oil as extractant in batch culture of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564)". *Journal of bioscience and bioengineering*. Vol. 87. 1999. pp. 352-356.
5. J. R. Gapes. "The Economics of Acetone-Butanol Fermentation: Theoretical and Market Considerations". *J. Mol. Microbiol.* Vol. 2. 2000. pp. 27-32.
6. K. P. Stim-Herndon, R. Nair, E. T. Papoutsakis, G. N. Bennet. "Analysis of Degenerate Variants of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824". *Anaerobe*. Vol. 2. 1996. pp. 11-18.
7. E. Papoutsakis. "Engineering solventogenic clostridia". *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 19. 2008. pp. 420-429.
8. Y. Tashiro, H. Shinto, M. Yamashita. "High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed-discontinua culture with pH-stat continuous butyric acid and glucose feeding method". *J. Biosci. Bioeng.* Vol. 98. 2004. pp. 263-268.