



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

**MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL**  
**ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES**  
**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Transformación de gases de efecto invernadero (CO/CO<sub>2</sub>) en bioproductos de valor añadido mediante procesos de fermentación.**

Autor: Valentina Scutari

Tutores: Mónica Coca Sanz;

Juan Carlos López Linares

Valladolid, Julio, 2024



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

**MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL**  
**ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES**  
**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Transformación de gases de efecto invernadero (CO/CO<sub>2</sub>) en bioproductos de valor añadido mediante procesos de fermentación.**

Autor: Valentina Scutari

Tutores: Mónica Coca Sanz;

Juan Carlos López Linares

Valladolid, Julio, 2024



## Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Beca STEM WOMEN UVA-SANTANDER IBEROAMÉRICA+ASIA por haberme dado la oportunidad de descubrir este máster y expandir mis conocimientos en el área de Ingeniería Ambiental. También quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Beca de Colaboración del Consejo Social, por el apoyo de mi formación en investigación en mi Trabajo Final de Máster. A mis tutores, quienes me han brindado guía y apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso, les extiendo mi más sincera gratitud.

Por último, quiero agradecer especialmente a mi familia y amigos, cuya constante motivación y aliento han contribuido significativamente a mi crecimiento personal durante este periodo.



## Resumen

El cambio climático es una de las mayores problemáticas que enfrenta la humanidad en la actualidad. Las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), son los mayores causantes de este fenómeno, lo que ha generado el interés en esta última década en desarrollar tecnologías innovadoras para realizar la captura y valorización de dichos gases. La fermentación con microorganismos se presenta como una alternativa innovadora y sostenible para capturar y valorizar los GEI, mediante la obtención de productos de valor comercial, como biocombustibles y otros bioproductos.

Este TFM se centró en la valorización de los gases C1 (CO/CO<sub>2</sub>) mediante procesos fermentativos, en sistemas de co-cultivos con *C. aceticum* y *C. beijerinckii* para la obtención de bioproductos.

Para ello, se estudiaron las condiciones óptimas del medio de cultivo de la fermentación, como pH, temperatura, estrategia de alimentación fed-batch de los gases, relación de volumen del medio, uso de fructosa como co-sustrato (30 g/L), agregado de hierro cero valente (50 g/L), en búsqueda de maximizar la producción de ácido acético mediante la ruta Wood Ljungdahl Pathway (WLP) por *C. aceticum*. Se obtuvieron 2,8 g/L de ácido acético, bajo condiciones óptimas.

Además, se analizaron diferentes estrategias de inoculación de *C. beijerinckii* en el co-cultivo de los dos microorganismos: simultánea, secuencial a las 24 y 48 horas de fermentación, a valores de pH 6 y pH 9. Los mejores resultados en cuanto a concentración de butanol se alcanzaron con la estrategia de inoculación secuencial (24 horas) a pH 9 (2,6 g/L), y de inoculación simultánea a pH 6 (1,8 g/L); mientras que las mayores concentraciones de ácido butírico se alcanzaron mediante co-cultivo secuencial con inoculación de *C. beijerinckii* a las 48 horas: 8,5 g/L a pH 6 y 7,8 g/L a pH 9.

**Palabras claves:** Butanol, ácido butírico, cocultivos, *C. beijerinckii*, *C. aceticum*, Wood Ljungdahl Pathway

## Abstract

Climate change is one of the biggest problems facing humanity today. Greenhouse gas (GHG) emissions are the main causes of this phenomenon, which has generated interest in the last decade in developing innovative technologies to capture and recover these gases. Fermentation with microorganisms is presented as an innovative and sustainable alternative to capture and valorize GHGs, by obtaining products of commercial value, such as biofuels and other bioproducts.

This TFM focused on the valorization of C1(CO/CO<sub>2</sub>) gases through fermentation processes, in co-culture systems with *C. aceticum* and *C. beijerinckii* to obtain bioproducts.

For this, the optimal conditions of the fermentation culture medium were studied, such as pH, temperature, feed-batch feeding strategy of gases, volume ratio of the medium, use of fructose as co-substrate (30 g/L), addition of zero valent iron (50 g/L), in search of maximizing the production of acetic acid through the Wood Ljungdahl Pathway (WLP) by *C. aceticum*. 2,8 g/L of acetic acid were obtained, under optimal conditions.



In addition, different inoculation strategies of *C. beijerinckii* were analyzed in the co-culture of the two microorganisms: simultaneous, sequential at 24 and 48 hours of fermentation, at values of pH 6 and pH 9. The best results in terms of concentration of butanol were achieved with the strategy of sequential inoculation (24 hours) for pH 9 (2,6 g/L), and simultaneous inoculation at pH 6 (1,8 g/L); while the highest concentrations of butyric acid were reached in the sequential co-culture with inoculation at 48 hours: 8,5 g/L pH 6 and 7,8 g/L at pH 9.

**Keywords:** Butanol, butyric acid, cocultures, *C. beijerinckii*, *C. aceticum*, Wood Ljungdahl Pathway



## Índice

|  |    |
|--|----|
| 1. Introducción.....   | 1  |
| 1.1. Emisiones GEI: Situación actual y Políticas Ambientales Europeas .....  | 1  |
| 1.2. Fermentación de CO/CO <sub>2</sub> para la obtención de bioproductos .....  | 4  |
| 1.3. Fermentación de CO/CO <sub>2</sub> con <i>Clostridium aceticum</i> .....  | 6  |
| 1.4. Fermentación en co-cultivos con <i>C. aceticum</i> .....  | 10 |
| 1.5. Fermentación con <i>C. beijerinckii</i> .....   | 10 |
| 2. Objetivos .....   | 13 |
| 3. Materiales y métodos .....  | 14 |
| 3.1. Microorganismos y medio de cultivo.....   | 14 |
| 3.1.1. Activación y mantenimiento de las cepas .....   | 14 |
| 3.1.2. Preparación del inóculo de <i>C. aceticum</i> .....   | 14 |
| 3.1.3. Preparación del inóculo de <i>C. beijerinckii</i> .....   | 15 |
| 3.2. Fermentación con <i>C. aceticum</i> .....   | 15 |
| 3.2.1. Selección del medio de crecimiento de <i>C. aceticum</i> .....  | 15 |
| 3.2.2. Evaluación de diferentes estrategias de alimentación en fed-batch para la fermentación de <i>C. aceticum</i> .....                  | 16 |
| 3.2.3. Evaluación de la relación de volumen del medio en la fermentación de <i>C. aceticum</i> .....                                       | 16 |
| 3.2.4. Evaluación de la adición de hierro al medio de cultivo en la fermentación de <i>C. aceticum</i> .....                               | 17 |
| 3.3. Fermentación con co-cultivos de <i>C. aceticum</i> y <i>C. beijerinckii</i> .....   | 17 |
| 3.4. Métodos analíticos.....   | 18 |
| 4. Resultados y discusión.....   | 19 |
| 4.1. Selección de medio de crecimiento de <i>C. aceticum</i> .....   | 19 |
| 4.1.1. Selección del medio para el co-cultivo: crecimiento de <i>C. aceticum</i> en su medio y en el medio de <i>C. beijerinckii</i> ..... | 19 |
| 4.1.2. Fermentación con <i>C. aceticum</i> utilizando fructosa como co-sustrato ...  | 22 |
| 4.1.3. Fermentación de <i>C. aceticum</i> en botellas de 1L.....   | 23 |
| 4.2. Evaluación de la influencia de la adición de hierro en la fermentación de <i>C. aceticum</i> .....                                    | 27 |
| 4.2.1. Evaluación de alimentación fed-batch de gases con adición de hierro al medio de cultivo .....                                       | 28 |
| 4.3. Resumen de resultados con monocultivos de <i>C. aceticum</i> .....  | 29 |
| 4.4. Fermentación en co-cultivo con <i>C. aceticum</i> y <i>C. beijerinckii</i> .....  | 30 |
| 4.4.1. Estudio de crecimiento de <i>C. aceticum</i> y <i>C. beijerinckii</i> como monocultivo en MCAB .....                                | 31 |
| 4.4.2. Fermentación en sistema de co-cultivos secuenciales .....   | 33 |
| 4.4.3. Fermentación de co-cultivos con inoculación simultánea .....  | 38 |
| 4.5. Resumen de resultados de co-cultivos.....   | 39 |



|                       |    |
|-----------------------|----|
| 5. Conclusiones ..... | 42 |
| 6. Bibliografía ..... | 43 |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> Emisiones de CO <sub>2</sub> eq por sector. Obtenido de European Environment Agency Datasets [2].   | 1  |
| <b>Figura 2</b> Gases de efecto invernadero emitidos en el sector de energía en 2022. Obtenido de European Environment Agency Datasets [2].   | 2  |
| <b>Figura 3</b> Evolución de las emisiones de CO <sub>2</sub> . Obtenido del Informe de la Agencia Internacional de la Energía "CO <sub>2</sub> Emissions in 2023"[3].  | 2  |
| <b>Figura 4</b> Cargas evitadas de emisiones de CO <sub>2</sub> por el uso de energías verdes. Obtenido del Informe de la Agencia Internacional de la Energía "CO <sub>2</sub> Emissions in 2023"[3].         | 3  |
| <b>Figura 5</b> Diagrama de usos de CO <sub>2</sub> [10].   | 4  |
| <b>Figura 6</b> Mapa de rutas de fijación de CO <sub>2</sub> para procariotas. Obtenido a partir de KEGG y JGI Genome Portal  | 8  |
| <b>Figura 7</b> Ruta metabólica Wood Lunhdahl Obtenida de [14]  | 9  |
| <b>Figura 8</b> Ruta de fijación de CO/CO <sub>2</sub> para el cocultivo de <i>C. acetivum</i> y <i>C. beijerinckii</i> , obtenida del portal KEGG y JGI Genome Portal  | 12 |
| <b>Figura 9</b> Variables evaluadas en la selección de medio de microorganismo de <i>C. acetivum</i>  | 15 |
| <b>Figura 10</b> Concentración de ácido acético (g/L) variando pH y Temperatura en monocultivo de <i>C. acetivum</i> .  | 20 |
| <b>Figura 11</b> Densidad óptica variando pH y Temperatura en monocultivo de <i>C. acetivum</i> .   | 20 |
| <b>Figura 12</b> Concentración de CO (%) variando pH y Temperatura en monocultivo de <i>C. acetivum</i>   | 20 |
| <b>Figura 13</b> Concentración de CO <sub>2</sub> (%) variando pH y Temperatura en monocultivo de <i>C. acetivum</i>  | 20 |
| <b>Figura 14</b> Concentración de ácido acético (g/L) en experimentos de estrategias de alimentación fed batch para monocultivo de <i>C. acetivum</i>   | 21 |
| <b>Figura 15</b> Densidad óptica en experimentos de estrategias de alimentación fed-batch para monocultivo de <i>C. acetivum</i>  | 21 |
| <b>Figura 16</b> Concentración de CO en la fermentación fed-batch de monocultivo de <i>C. acetivum</i>  | 22 |
| <b>Figura 17</b> Concentración de CO <sub>2</sub> en la fermentación fed-batch de monocultivo de <i>C. acetivum</i>   | 22 |
| <b>Figura 18</b> Concentración Ácido acético (g/L) en fermentación de monocultivo de <i>C. acetivum</i> con gases y fructosa como sustratos, alimentación fed- batch  | 22 |
| <b>Figura 19</b> Densidad óptica en fermentación de monocultivo de <i>C. acetivum</i> con gases y fructosa como sustratos, alimentación fed-batch   | 22 |
| <b>Figura 20</b> Concentración de CO (%) en fermentación de monocultivo de <i>C. acetivum</i> con gases y fructosa como sustratos, alimentación fed-batch   | 23 |
| <b>Figura 21</b> Concentración de CO <sub>2</sub> (%) en fermentación de monocultivo de <i>C. acetivum</i> con gases y fructosa como sustratos, alimentación fed-batch  | 23 |
| <b>Figura 22</b> Concentración de etanol (g/L) en la fermentación de monocultivo de <i>C. acetivum</i> con gases y fructosa como sustratos, alimentación fed batch  | 23 |
| <b>Figura 23</b> Concentración de ácido acético (g/L). Evaluación de alimentación fed-batch y relación de volumen (%), en monocultivo de <i>C. acetivum</i>   | 24 |
| <b>Figura 24</b> Concentración de etanol (g/L). Evaluación de alimentación fed-batch y relación de volumen (%), en monocultivo de <i>C. acetivum</i>  | 24 |
| <b>Figura 25</b> Concentración de CO(%). Evaluación de alimentación fed-batch y relación de volumen (%), en monocultivo de <i>C. acetivum</i>   | 25 |
| <b>Figura 26</b> Concentración CO <sub>2</sub> (%). Evaluación de alimentación fed Batch y relación de volumen (%), en monocultivo de <i>C. acetivum</i>  | 25 |
| <b>Figura 27</b> Concentración CO(%). Evaluación de alimentación fed Batch y relación de volumen (%), en monocultivo de <i>C. acetivum</i>  | 25 |
| <b>Figura 28</b> Concentración CO <sub>2</sub> (%). Evaluación de alimentación fed-batch y relación de volumen (%), en monocultivo de <i>C. acetivum</i>  | 25 |
| <b>Figura 29</b> Concentración de ácido acético (g/L) en fermentación en monocultivo de <i>C. acetivum</i> con estrategia de alimentación fed-batch a partir de las 72 horas                                  | 26 |
| <b>Figura 30</b> Ruta WLP y de Glucólisis de <i>C. acetivum</i> [14].   | 26 |
| <b>Figura 31</b> Concentración de ácido acético (g/L) . Experimento de adición de hierro al medio de cultivo de fermentación de monocultivo de <i>C. acetivum</i>   | 27 |
| <b>Figura 32</b> Concentración de CO (%) Experimento de adición de hierro al medio de cultivo de fermentación de monocultivo de <i>C. acetivum</i>  | 28 |
| <b>Figura 33</b> Concentración de CO <sub>2</sub> (%) Experimento de adición de hierro al medio de cultivo de fermentación de monocultivo de <i>C. acetivum</i>   | 28 |
| <b>Figura 34</b> Concentración de ácido acético (g/L)..Experimento de adición de hierro al medio de cultivo, con estrategia de alimentación fed-batch en de fermentación de monocultivo de <i>C. acetivum</i> | 29 |





|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 35</b> Concentración de CO(%) .Experimento de adición de hierro al medio de cultivo, con estrategia de alimentación fed-batch en de fermentación de monocultivo de <i>C. acetium</i>               | 29 |
| <b>Figura 36</b> Concentración de CO <sub>2</sub> (%) .Experimento de adición de hierro al medio de cultivo, con estrategia de alimentación fed-batch en de fermentación de monocultivo de <i>C. acetium</i> | 29 |
| <b>Figura 37</b> Concentraciones de metabolitos (g/L) en la fermentación de <i>C. acetium</i> en medio conjunto  | 31 |
| <b>Figura 38</b> Concentración de CO (%) en la fermentación de <i>C. acetium</i> en medio conjunto   | 32 |
| <b>Figura 39</b> Concentración de CO <sub>2</sub> (%) en la fermentación de <i>C. acetium</i> en medio conjunto  | 32 |
| <b>Figura 40</b> Concentraciones de metabolitos (g/L) en la fermentación de <i>C. beijerinckii</i> en medio conjunto   | 33 |
| <b>Figura 41</b> Concentración de ácido acético (g/L) en fermentaciones secuenciales a pH 6 y 9, con inoculación de <i>C. beijerinckii</i> a tiempo 24 y 48 horas de inoculación de <i>C. acetium</i> .      | 33 |
| <b>Figura 42</b> Concentración de ácido butírico en fermentaciones secuenciales a pH 6 y 9.  | 34 |
| <b>Figura 43</b> Concentración de butanol en fermentaciones secuenciales a pH 6 y 9  | 34 |
| <b>Figura 44</b> Concentración de CO (%) en fermentaciones secuenciales a pH 6 y 9   | 35 |
| <b>Figura 45</b> Concentración de CO <sub>2</sub> (%) en fermentaciones secuenciales a pH 6 y 9  | 35 |
| <b>Figura 46</b> Concentraciones (g/L) de metabolitos en la fermentación secuencial pH6_ 24 horas inoc <i>C. beijerinckii</i>  | 36 |
| <b>Figura 47</b> Concentraciones (g/L) de metabolitos en la fermentación secuencial pH9_ 24 horas inoc <i>C. beijerinckii</i>  | 36 |
| <b>Figura 48</b> Concentraciones (g/L) de metabolitos en la fermentación secuencial pH6_ 48 horas inoc <i>C. beijerinckii</i>  | 36 |
| <b>Figura 49</b> Concentraciones (g/L) de metabolitos en la fermentación secuencial pH9_ 48 horas inoc <i>C. beijerinckii</i>  | 36 |
| <b>Figura 50</b> Ruta del Butanoato para <i>C. beijerinckii</i> desde KEGG   | 37 |
| <b>Figura 51</b> Concentración de butanol (g/L) en fermentación simultánea a pH 6 y pH 9   | 39 |
| <b>Figura 52</b> Concentración de CO y CO <sub>2</sub> (%) en fermentación simultánea a pH 6 y pH 9  | 39 |
| <b>Figura 53</b> Concentración de ácido acético en fermentación simultánea a pH 6 y pH 9   | 39 |
| <b>Figura 54</b> Conentración de ácido butírico en fermentación simultánea a pH 6 y pH 9   | 39 |
| <b>Figura 55</b> Gráfico comparativo de metabolitos de fermentaciones secuenciales y simultánea a pH inicial 6   | 40 |
| <b>Figura 56</b> Gráfico comparativo de metabolitos de fermentaciones secuenciales, simultánea y control monocultivo a pH inicial 9  | 40 |
| <b>Figura 57</b> Resumen de concentraciones máximas de butanol obtenidas para los experimentos de co-cultivo secuencial 24 h (a pH 9), simultáneo (a pH 6) y monocultivos de control                         | 41 |



## Índice de Tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1</b> <i>Microorganismos acetógenos. Tabla adaptada [15,16].</i> .....  | 5  |
| <b>Tabla 2</b> <i>Condiciones de experimentación y resultados para la producción de ácido acético</i> .....  | 6  |
| <b>Tabla 3</b> <i>Concentración de ácido acético y etanol en fermentación de C.aceticum, en condiciones autótrofas y heterótrofas, en diferentes condiciones de pH . Obtenida de [22].</i> ..... | 9  |
| <b>Tabla 4</b> <i>Co-cultivos con C. aceticum</i> .....  | 10 |
| <b>Tabla 5</b> <i>Crecimiento de C. aceticum en MCA y MCB.</i> .....   | 19 |
| <b>Tabla 6</b> <i>Resumen de resultados de evaluación de variables para el monocultivo de C. aceticum</i> .....  | 30 |
| <b>Tabla 7</b> <i>Resultados a los ocho días de fermentación secuencial a 24 y 48 horas de la inoculación de C. beijerinckii</i><br>.....  | 36 |

# 1. Introducción

## 1.1. Emisiones GEI: Situación actual y Políticas Ambientales Europeas

El efecto invernadero es un proceso natural esencial para que la Tierra sea habitable. Se produce por ciertos gases presentes en la atmósfera, conocidos como gases de efecto invernadero (GEI), que absorben parte de la radiación infrarroja que emite la tierra, lo cual contribuye a mantener su temperatura, y así permite el desarrollo de la vida. Sin embargo, las actividades antropogénicas han generado un aumento excesivo de estos gases en la atmósfera, derivado principalmente por la quema de combustibles fósiles, intensificando este efecto y provocando el fenómeno del cambio climático.

Dentro de los denominados GEI se encuentran el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), hidrofluorocarburos (HFC), perfluorocarburos, hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>) y el trifluoruro de nitrógeno (NF<sub>3</sub>)[1].

Estos GEI son cuantificados como CO<sub>2</sub> equivalentes, son generados principalmente por el uso de energía y procesos vinculados con la combustión, como se puede observar en la Figura 1 publicada por European Environment Agency en 2023 [2].

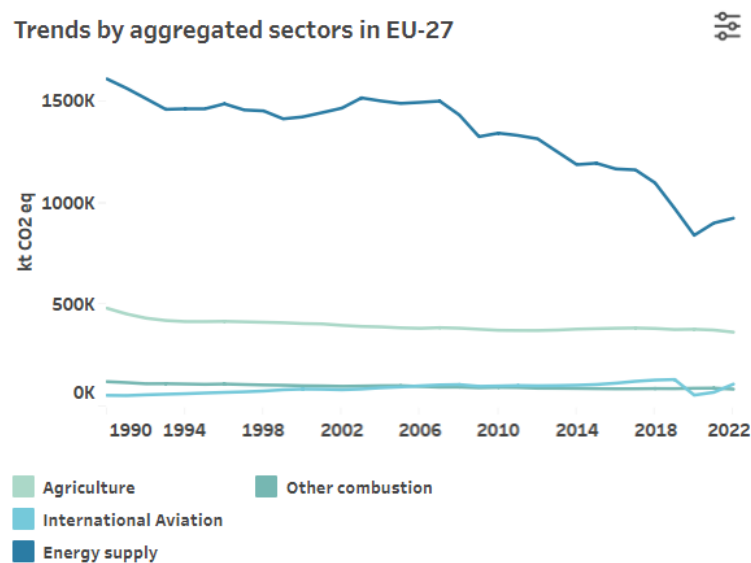


Figura 1 Emisiones de CO<sub>2</sub> eq por sector. Obtenido de European Environment Agency Datasets [2].

Como se puede observar en la Figura 2, el principal GEI emitido por actividades vinculadas con la energía es el CO<sub>2</sub>, en una proporción del 94%.

### Gas shares in EU-27 in 2022

Hover over the bars to see the share

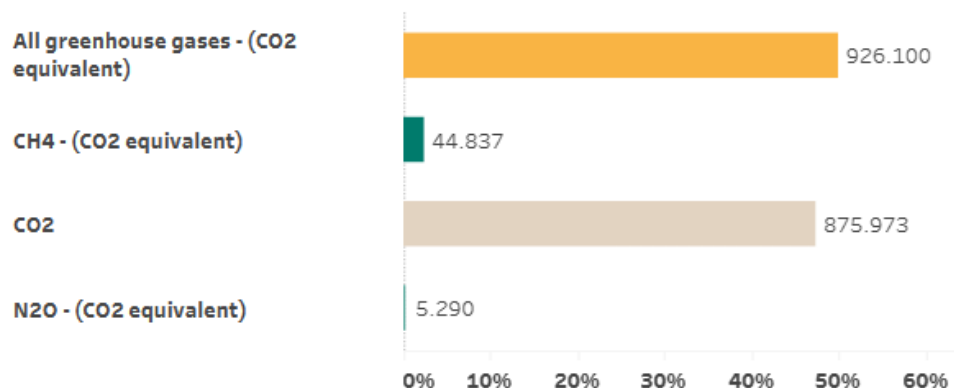


Figura 2 Gases de efecto invernadero emitidos en el sector de energía en 2022. Obtenido de European Environment Agency Datasets [2].

De acuerdo al informe “CO<sub>2</sub> Emissions in 2023”, publicado en febrero de 2024 por la Agencia Internacional de la Energía, en el año 2023 hubo un aumento del 1,1 % en la emisión de CO<sub>2</sub> vinculado con el consumo energético, alcanzando el máximo récord de emisión de CO<sub>2</sub> de 37,4 Gt [3], como se visualiza en la Figura 3.

Figure 1: Global energy-related CO<sub>2</sub> emissions and their annual change, 1900-2023

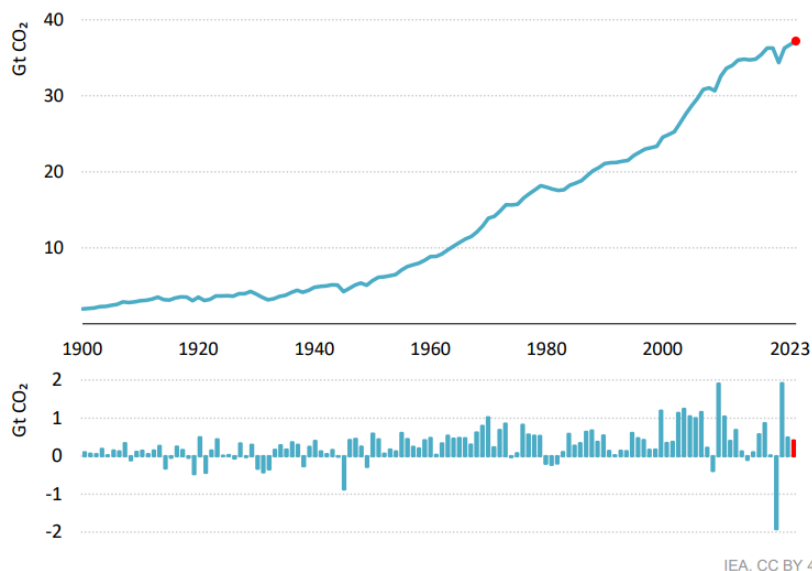
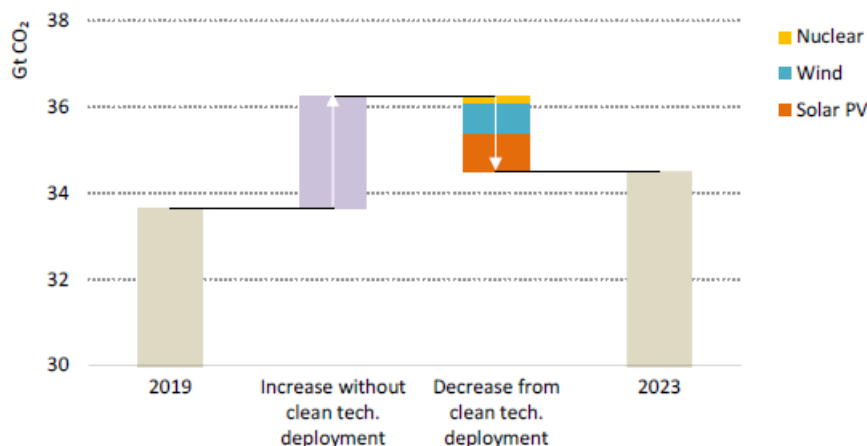


Figura 3 Evolución de las emisiones de CO<sub>2</sub>. Obtenido del Informe de la Agencia Internacional de la Energía “CO<sub>2</sub> Emissions in 2023”[3].

En los últimos años, el desarrollo de las energías verdes ha generado un impacto positivo en las emisiones generadas de CO<sub>2</sub>. Especialmente a partir del 2019 se ha producido un importante crecimiento de la energía solar, eólica, vehículos eléctricos, entre otros [3].

En la Figura 4 se puede observar dicha carga evitada proveniente de energías verdes.

Figure 3: Change in CO<sub>2</sub> emissions from energy combustion and avoided emissions from deployment of major clean technologies, 2019-2023



IEA. CC BY 4.0.

Figura 4 Cargas evitadas de emisiones de CO<sub>2</sub> por el uso de energías verdes. Obtenido del Informe de la Agencia Internacional de la Energía "CO<sub>2</sub> Emissions in 2023"[3].

En este contexto, se puede destacar lo fundamental que son el desarrollo de estas alternativas verdes para disminuir las emisiones de CO<sub>2</sub> y avanzar hacia un futuro sostenible.

Según la Agencia Internacional de la Energía, en 2022 el 80 % de la demanda mundial de energía correspondió al uso de los combustibles fósiles [4]. Dado el gran impacto ambiental vinculado a la utilización de combustibles fósiles y sumado a la condición de ser un recurso limitado, resulta necesaria la búsqueda de combustibles de mayor carácter renovable, sostenibles, y alternativos que aseguren la neutralidad climática. Abordar esta problemática de cambio climático es urgente, por la cual los países se han comprometido a realizar cambios drásticos e implementar acciones para combatirlo.

La Conferencia de las Partes (COP) es una reunión que se celebra cada año en diferentes lugares del mundo, desde marzo de 1995 en Berlín, la cual reúne a los 197 países que firmaron la participación en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), originada en la "Cumbre de la Tierra" de Río de Janeiro en 1992 [5]. El objetivo de la COP es definir estrategias cooperativas internacionales para lograr mitigar el cambio climático. Incluye entre ellas, disminuir las concentraciones de GEI, para que los ecosistemas se logren adaptar al cambio climático, y garantizar el desarrollo sostenible.

En la COP21 celebrada en París en 2015, se propuso reducir sustancialmente las emisiones de gases de efecto invernadero para limitar el aumento de la temperatura global en este siglo a 2 °C. Además, se firmó el Acuerdo de París, que propone la neutralidad de carbono para mitad de siglo XXI [6].

Es el caso de los miembros de la Unión Europea, en el marco de la CMNUCC en París, así como del Pacto Verde Europeo y la Ley Europea del Clima, se han comprometido al desafiante objetivo de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero al menos un 55 % al 2030, respecto al 1990, y generar la transición a carbono neutro en 2050 [6].

El Pacto Verde Europeo se presentó en diciembre del 2019 por la Comisión Europea, como una estrategia de crecimiento sostenible para la Unión Europea, determinando

una hoja de ruta de acciones para el uso eficiente de los recursos y una transformación a una economía circular, limpia, en búsqueda de recuperar la biodiversidad y reducción de la contaminación [7].

Derivado de este, se han incorporado normativas, propuestas, y planes para alcanzar la neutralidad climática, como es la Ley Europea del Clima, aprobada en junio de 2021, la cual proporciona el marco legislativo para impulsar a los estados miembros hacia estrategias de impacto y planes de actuación para combatir el cambio climático. Además, propone un seguimiento y evaluación de progreso, de manera de garantizar un avance sustancial hacia la neutralidad climática. En julio de 2021, luego de revisiones de los anteriores acuerdos, se incorporó el llamado paquete “Objetivo 55”, como hoja de ruta para la implementación de la Ley del Clima [8].

Como estrategia para alcanzar este objetivo alineado con el Pacto Verde Europeo surge el interés de la búsqueda de nuevas tecnologías que mitiguen la presencia del CO<sub>2</sub> en la atmósfera. Dentro de estas tecnologías se encuentra la captura y utilización de carbono (Carbon Capture and utilization, CCU), la cual consiste en capturar el CO<sub>2</sub> y utilizarlo como productos sintéticos, químicos o combustibles [9].

## 1.2. Fermentación de CO/CO<sub>2</sub> para la obtención de bioproductos

El CO<sub>2</sub> puede provenir de diferentes fuentes, y puede sufrir o no transformación para su utilización, como se muestra en la Figura 5 [10].

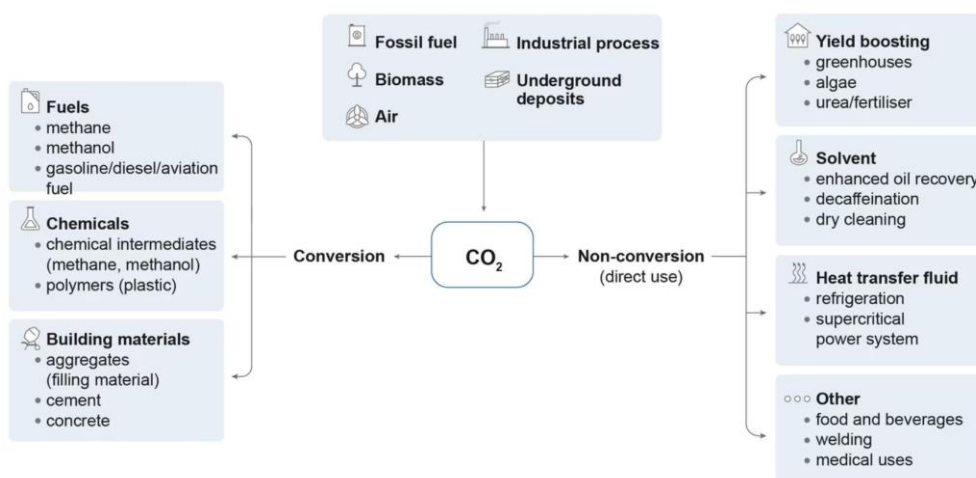


Figura 5 Diagrama de usos de CO<sub>2</sub> [10].

A efectos de este TFM, la aplicación de interés es la conversión del CO<sub>2</sub> para la producción sostenible de biocombustibles y productos químicos, mediante procesos biológicos.

Las bacterias acetogénicas procariotas son microorganismos que en condiciones anaerobias estrictas utilizan la ruta reductora de un solo carbono para la formación de acetil-CoA, precursor del acetato, siendo esta ruta conocida como la vía reductora acetil-CoA o Wood-Ljungdahl (WLP), en reconocimiento a los dos investigadores Harland G.Wood y Lars G.Ljungdahl, que descubrieron la mayoría de las reacciones enzimáticas del modelo acetógeno de *Morella thermoacetica* [11]. En esta ruta, los acetógenos sintetizan acetatos en su metabolismo, crecen de forma quimiolitotrofica con H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono y energía, acompañado de la síntesis de ATP en la reducción del CO<sub>2</sub> [13]. Es decir, este tipo de

microorganismos puede utilizar la ruta del acetil-CoA para diferentes funciones: como un mecanismo para la síntesis reductiva de acetil-CoA a partir de CO<sub>2</sub>, como un proceso de conservación de energía y aceptación de electrones, y como un mecanismo para la fijación de CO<sub>2</sub> en la síntesis de carbono celular [13].

Durante la fermentación autótrofa de los gases, estos son convertidos en primer lugar en ácidos, etapa que se llama acetogénesis y luego, en el caso que el microorganismo sea capaz, estos ácidos acumulados se transforman en alcoholes, durante la solventogénesis [14].

Históricamente se han aislado acetógenos en diferentes hábitats como suelos, sedimentos, lodos, tractos intestinales de animales, siendo los géneros más frecuentes *Acetobacterium* y *Clostridium*, con variadas características morfológicas, nutricionales y fisiológicas [11].

A continuación, en la Tabla 1 se detalla una lista actualizada de microorganismos acetógenos, incluyendo los posibles productos obtenidos en la fermentación de gases CO/CO<sub>2</sub> [15,16].

**Tabla 1** Microorganismos acetógenos. Tabla adaptada [15,16].

| Especie  | Sustrato                             | Producto(s)   | Referencia |
|--|--------------------------------------|---|------------|
| <i>Acetobacterium woodii</i><br>(Recombinante) | H <sub>2</sub> /CO, CO               | Acetato, isopropanol, acetona                                       | [17,18]    |
| <i>Alkalibaculum bacchi</i>                    | H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO | Acetato, etanol   | [19]       |
| <i>Butyribacterium methylotrophicum</i>        | H <sub>2</sub> /CO, CO               | Acetato, etanol, butirato, butanol, ácido butírico                  | [20,21]    |
| <i>Clostridium aceticum</i>                    | H <sub>2</sub> /CO, CO               | Ácido acético, Etanol   | [14,22,23] |
| <i>Clostridium autoethanogenum</i>             | H/CO <sub>2</sub> , CO               | Acetato, etanol, 2,3-butanodiol, lactato                            | [24]       |
| <i>Clostridium carboxidivorans</i>             | H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO | Acetato, ácido acético, etanol, butirato, butanol, lactato, hexanol | [25,26]    |
| <i>Clostridium ljungdahlii</i>                 | H <sub>2</sub> /CO, CO               | Acetato, etanol, 2,3-butanodiol, lactato, hexanol                   | [27–29]    |

Como se puede deducir, estas rutas son de gran interés biotecnológico, ya que permiten obtener biocombustibles y productos bioquímicos de alto valor.

En la Tabla 2 se detallan específicamente las condiciones de operación y resultados alcanzados, para la obtención de ácido acético, mediante la fermentación de gases CO/CO<sub>2</sub> con cepas acetógenas *Clostridium*, mediante la ruta WLP.



**Tabla 2** Condiciones de experimentación y resultados para la producción de ácido acético

| Especie                            | Condiciones   | Conc. (mg/L)                        | OD máx (600nm) | Observaciones   | Referencia |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|----------------|---|------------|
| <i>Clostridium acetium</i>         | Reactor 2L, 1,1 L de medio.   | 18 g/L ácido acético (475 horas)    | 3 (6d)         | pH 8 regulado   | [22]       |
|                                    | Alimentación continua de CO puro 10mL/min.<br>30°C, 250 rpm.  | 4,7 g/L ácido acético (690 horas)   | 2 (9d)         | pH inicial 8, sin regulación.<br>Producción de etanol 4,6 g/L.                                    |            |
| <i>Clostridium acetium</i>         | Reactor 2L, 1,2 L de medio.   | 9,4 g/L ácido acético               | 2,3 (6d)       | pH 8 regulado   | [14]       |
|                                    | Alimentación continua syngas 10mL/min.<br>30°C, 150 rpm.  |                                     |                |   |            |
| <i>Clostridium acetium</i>         | Reactor 1,5 L   | 5,2 g/L ácido acético (240 horas)   | 1,8 (10 d)     | pH 8 regulado   | [23]       |
|                                    | 33°C, 250 rpm.<br>Alimentación continua (CO, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> ), 10 mL/min |                                     |                |   |            |
| <i>Clostridium acetium</i>         | Reactor 2L, 1,5L volumen de medio   | 11,5 g/L ácido acético              | 1,65 (5d)      | pH 7,5 regulado   | [30]       |
|                                    | 30°C, 250 rpm.<br>Alimentación continua syngas 10 mL/min  |                                     |                |   |            |
| <i>Clostridium carboxidivorans</i> | Reactor 0,25L con 0,12L de volumen de medio.  | 0,64 g/L ácido acético (48 horas)   |                | pH 5,6 inicial, sin regulación  | [25]       |
|                                    | Alimentación continua (a partir de las 24 horas)<br>35°C, 250rpm.   | 0,72 g/L ácido acético (48 horas)   |                | Gas: CO puro<br>Etanol 0,88g/L.<br>pH 5,6 inicial, sin regulación<br>Gas: Syngas<br>Etanol 1 g/L. |            |
| <i>Clostridium carboxidivorans</i> | Botellas 160 mL con 50 mL de medio.   | 0,7 g/L de ácido acético (48 horas) |                | PH 5,75 sin regulación  | [26]       |
|                                    | 37°C, 150 rpm, alimenación syngas.  |                                     |                | Etanol 2g/L   |            |

### 1.3. Fermentación de CO/CO<sub>2</sub> con *Clostridium acetium*

El presente TFM se centra en el microorganismo acetógeno *Clostridium acetium* (de aquí en adelante *C. acetium*), en sus rutas de fijación de CO<sub>2</sub>/CO, y la producción de ácido acético.

En la Figura 6, se puede observar la ruta Wood-Ljungdahl, incluida dentro de las rutas de fijación de CO<sub>2</sub> en procariontas. Esta Figura corresponde específicamente a *C. acetium* y se señalizan en rectángulos las enzimas necesarias para realizar esta ruta





de fijación. En color lila, se identifican aquellas enzimas necesarias para el desarrollo de esta ruta de interés, para las cuales el microorganismo sí tiene los genes que las codifican. Además, se puede visualizar la posibilidad de fijación de CO en esta ruta lo que concuerda con los datos analizados en la Tabla 1.

En la primera etapa de fijación de CO<sub>2</sub>, se identifica la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) (número 1.2.7.4 en la Figura 6), que cataliza la transformación de CO<sub>2</sub> a CO. Esta reacción de fijación CO<sub>2</sub> requiere energía, la cual es proporcionada por la hidrogenasa ferredoxina, que oxida H<sub>2</sub> a 2H<sup>+</sup> y libera electrones. En el caso de que la fuente de carbono y electrones sea CO, no sería necesaria la utilización de hidrógeno [15]. Posteriormente, el CO, un grupo metilo y una coenzima CoASH, son catalizados por la enzima acetil-CoA sintasa (número 2.3.1.169), para la formación del intermedio acetil-CoA. [15]. Luego, el acetil-CoA sufre reacciones enzimáticas, en donde se transforma en acetato, que se da por las reacciones sucesivas de dos enzimas, Pta (fosfotransacetilasa) y Ack (acetato quinasa) [15].

## KEGG Map

Current Genome: [Clostridium acetivum, DSM 1496](#)

Genes in Clostridium acetivum, DSM 1496

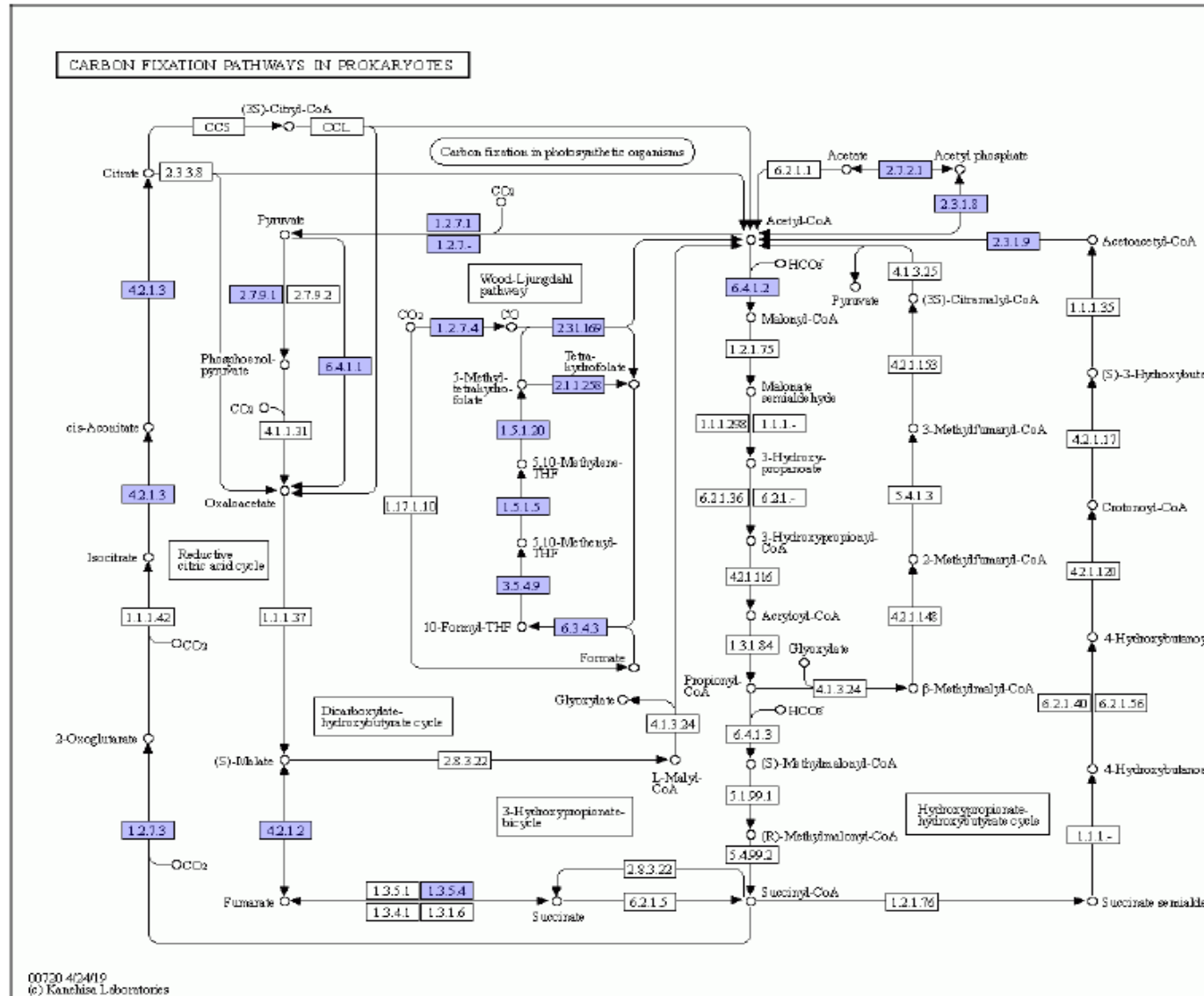


Figura 6 Mapa de rutas de fijación de CO<sub>2</sub> para procariontas. Obtenido a partir de KEGG y JGI Genome Portal

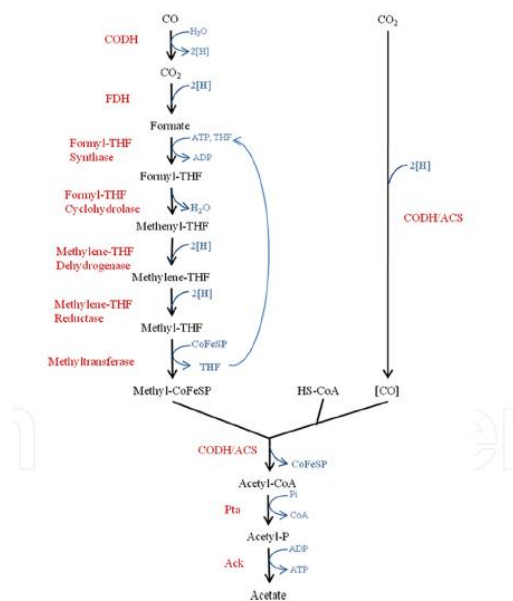


Figura 7 Ruta metabólica Wood Lunhldahl Obtenida de [14]

Las cepas de *C. aceticum* han sido estudiadas previamente, evaluando las diferentes variables experimentales, como la alimentación de sustratos, pH, aditivos, entre otros. De acuerdo a los estudios comparativos entre la fermentación heterótrofa y autótrofa, con alimentación de fructosa o CO [22], se alcanzaron mayores concentraciones de ácido acético para alimentación de CO, y con regulación de pH a 8, favoreciendo la acetogénesis, y en caso contrario, en condiciones más ácidas, sin regulación de pH se favorece la solventogénesis y producción de etanol [14]. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos, y como afecta la regulación del pH y el sustrato en el metabolismo de *C. aceticum*.

Tabla 3 Concentración de ácido acético y etanol en fermentación de *C.aceticum*, en condiciones autótrofas y heterótrofas, en diferentes condiciones de pH . Obtenida de [22].

|                                      | Fermentación de CO a pH 8 | Fermentación de CO sin control de pH | Fermentación de fructosa a pH 8. | Fermentación de fructosa sin control de pH. |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|---|
| Concentración final de ácido acético | 18 g/L                    | 4,7 g/L                              | 8,8 g/L                          | 6 g/L                                       |
| Concentración final de etanol        | 0,5 g/L                   | 4,6 g/L                              | –                                | 0,325 g/L                                   |

Se ha estudiado la influencia del hierro valencia cero, que actúa como donante de electrones para la reducción de CO<sub>2</sub>, favoreciendo la producción de ácido acético en la fermentación con *C. aceticum* [31]. Además, resultan interesantes los estudios del impacto de ciertos metales (Selenio y Tungsteno) en la fermentación de *Clostridium carboxidivorans*, frente a la actividad de metaloenzimas que catalizan tanto la formación de ácidos grasos como alcoholes [32].

## 1.4. Fermentación en co-cultivos con *C. aceticum*

A su vez, este ácido acético generado puede ser utilizado por otros microorganismos como fuente de carbono, para producir otros compuestos de interés. Este tipo de proceso se puede alcanzar en conjunto en la utilización de co-cultivos, estrategia que permite la interacción sinérgica entre varios microorganismos para lograr un objetivo en común, como puede ser biocombustibles o productos químicos.

Se han realizado estudios de fermentaciones con syngas y elongación de cadenas, de co-cultivos de *C. aceticum* con *Clostridium kluyveri* con la intención de producción de alcoholes, como butanol, y ácidos grasos de cadena media [33].

Con el objetivo de obtener lípidos de interés, se han realizado estudios de fermentación de gases (CO, CO<sub>2</sub> y syngas), en etapas, combinando dos microorganismos. En primer lugar, se obtiene el ácido acético a partir de la fermentación de gases con *C. aceticum*, y en una segunda etapa este ácido es utilizado por la levadura *Rhodospiridium toruloides*, para la producción de lípidos de interés, como ácido oleico y ácido palmítico [30].

También se han estudiado co-cultivos para la producción de lípidos y β-carotenos, obteniendo en primer lugar el ácido acético con la fermentación de syngas con *C. aceticum*, y luego *Yarrowia lipolytica* para la transformación de dicho acético en los productos de interés [34].

En la Tabla 4 se resume las condiciones de los experimentos previos de los co-cultivos realizados con *C. aceticum*.

Tabla 4 Co-cultivos con *C. aceticum*

| Cepa del cocultivo                               | Condiciones de experimentación para <i>C. aceticum</i>                   | Producto de interés                     | Referencia |
|--|--|---|------------|
| <i>Clostridium Kluyveri</i>                      | Reactor de 2L.<br>pH 7,5<br>Syngas continuo<br>10 mL/min<br>250rpm, 30°C | Butirato, butanol y n-caproato          | [33]       |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i><br>(secuencial) | Reactor de 2L.<br>pH 7,5<br>Syngas continuo<br>10 mL/min<br>250rpm, 30°C | Lípidos, ácido oleico y ácido palmítico | [30]       |
| <i>Yarrowia lipolytica</i><br>(secuencial)       | Reactor de 2L.<br>pH 7,5<br>Syngas continuo 10mL/min<br>250 rpm, 30°C    | β-caroteno y lípidos                    | [34]       |

## 1.5. Fermentación con *C. beijerinckii*

Las bacterias solventogénicas del género *Clostridium* se caracterizan por su metabolismo fermentativo anaerobio y por su producción una variedad de compuestos

útiles, siendo el principal el 1-butanol. Dependiendo de la especie y las condiciones del cultivo, la producción puede diversificarse para incluir acetona, isopropanol, etanol, ácidos butírico, láctico y acético, e incluso hidrógeno [35].

*C. beijerinckii* es una bacteria anaerobia, la cual tiene como característica la capacidad de realizar una fermentación de tipo ABE (acetona-butanol-etanol), consumiendo sustratos como la glucosa y xilosa [36].

En general, los *Clostridium* solventogénicos tienen dos etapas dentro de su metabolismo fermentativo. En la primera etapa, asociada al crecimiento celular, se producen ácido acético, ácido butírico, hidrógeno y dióxido de carbono como productos principales. Mientras que, en la segunda fase, pueden generar a partir de los sustratos y productos principales butanol, acetona e isopropanol [35].

Específicamente, el metabolismo de *C. beijerinckii* comprende dos fases metabólicas. La primera fase de acidogénesis, donde convierte los azúcares en piruvato y acetyl-CoA, y este último, mediante varias reacciones enzimáticas se convertirá en ácido acético y ácido butírico. Dicha acumulación de ácidos favorece la producción de butanol en la segunda fase metabólica llamada solventogénesis [36].

Resulta de interés el estudio de la fijación y valorización de los gases CO/CO<sub>2</sub>, para la producción de un combustible de interés (butanol), mediante un co-cultivo de los microorganismos mencionados anteriormente, *C. aceticum*, para la producción de ácido acético utilizando los gases CO/CO<sub>2</sub>, en conjunto con *C. beijerinckii* para el consumo de este ácido generado, para transformarlo en el bioproducto de interés butanol.

En la Figura 8 se puede observar la capacidad, de acuerdo a la disponibilidad genética, de realizar la fijación de CO/CO<sub>2</sub> de ambos microorganismos en co-cultivo.

En este TFM se buscará maximizar la producción del ácido acético de esta ruta WLP. Simultáneamente, se buscará maximizar la producción del combustible butanol, producido en la fase solventogénica del *C. beijerinckii*, utilizando como sustrato el ácido acético generado anteriormente.

CARBON FIXATION PATHWAYS IN PROKARYOTES

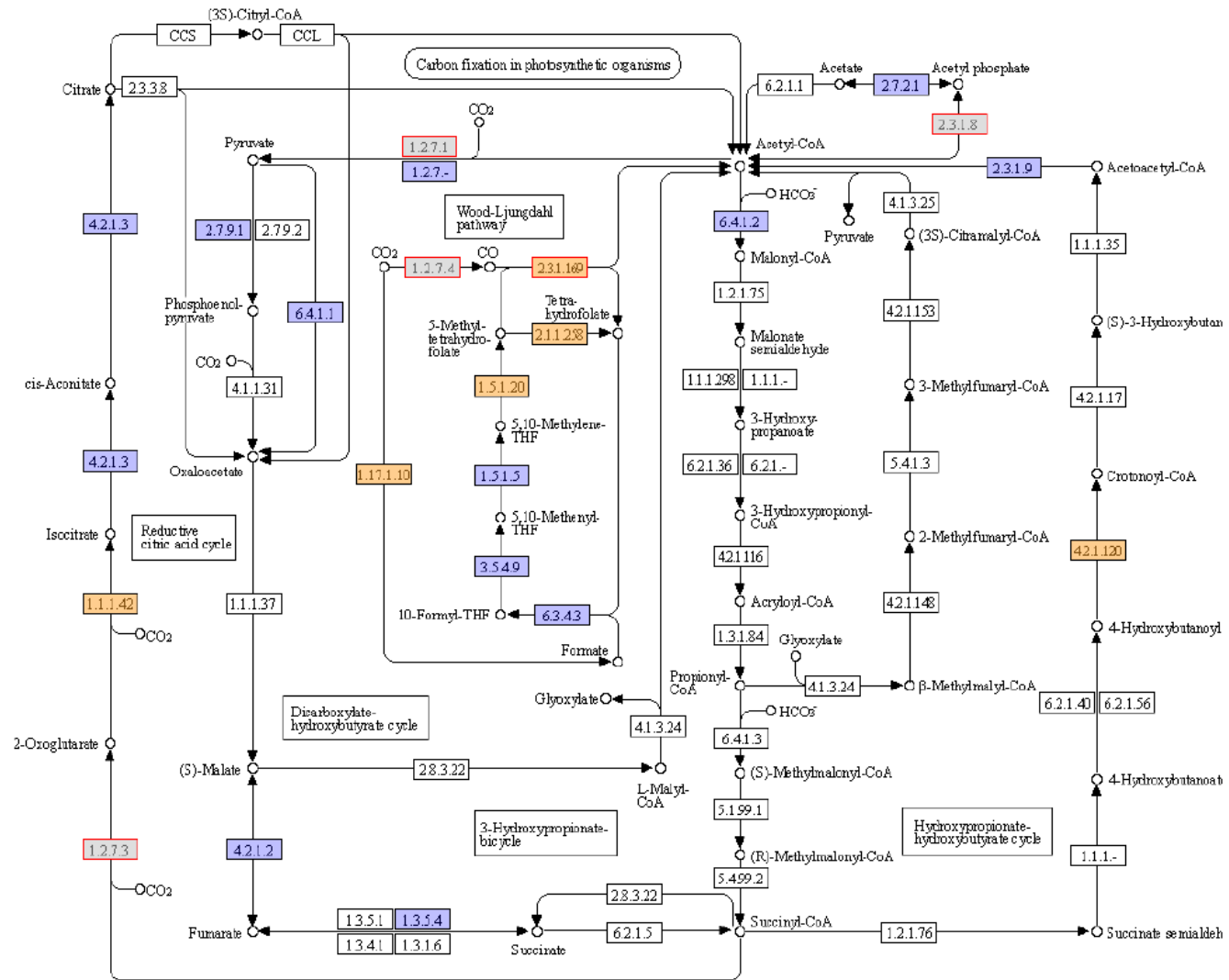


Figura 8 Ruta de fijación de CO/CO<sub>2</sub> para el cultivo de *C. aceticum* y *C. beijerinckii*, obtenida del portal KEGG y JGI Genome Portal

## 2. Objetivos

El objetivo general del TFM es desarrollar alternativas para la valorización de gases residuales C1 (CO<sub>2</sub>/CO) mediante la producción de bioproductos de valor añadido usando procesos de fermentación.

Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1- Realizar un relevamiento de la bibliografía científica para determinar el medio y condiciones de cultivo idóneos para el desarrollo de los microorganismos en estudio *C. aceticum* y *C. beijerinckii*.
- 2- Determinar las condiciones óptimas de fermentación de los gases C1 con *C. aceticum*, evaluando condiciones de alimentación, pH, sustratos y nutrientes, para maximizar la producción de ácido acético.
- 3- Obtener como producto biobutanol mediante el uso de co-cultivos de microorganismos tipo *Clostridium*, como estrategia para aumentar la concentración de butanol en el caldo de cultivo, manteniendo elevadas tasas de fijación de gases residuales C1.
- 4- Investigar posibles metabolitos que puedan ser de interés en el co-cultivo en estudio.

Este estudio es de gran interés, dado que es una novedad la aplicación de co-cultivos *Clostridium*, principalmente para la cepa de *C. beijerinckii* para la producción de biocombustibles.

El TFM se enmarca en el proyecto de investigación: “Recuperación de carbono mediante fermentación de gases de efecto invernadero para producir biocombustibles y bioproductos” (Referencia: TED2021-129826A-I00/AEI/10.13039/501100011033), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Se ha llevado a cabo en el Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Microorganismos y medio de cultivo

#### 3.1.1. Activación y mantenimiento de las cepas

En el presente TFM se han utilizado dos microorganismos, la cepa *C. aceticum* DSM 1496 y *C. beijerinckii* DSM 6422.

Ambos microorganismos pertenecen a la colección alemana de microorganismos (DSMZ, Leibniz, Alemania). Las cepas fueron reactivadas inoculando las células liofilizadas en el medio líquido DSMZ, y se realizó el crecimiento durante 24 horas a 30°C para *C. aceticum* y 35°C para *C. beijerinckii*, en un agitador orbital (Optic Ivymen Systems, Comecta, España) según el procedimiento recomendado por DSMZ.

Las cepas de *C. aceticum* se almacenaron en un stock de glicerol (40 % v/v) a -80°C hasta su próximo uso. En el caso de *C. beijerinckii*, la cepa se mantiene en el medio RCM (Reinforced Clostridial Medium) en botellas de 100 mL, en formas de esporas y refrigeradas a 4°C, en condiciones anaerobias.

#### 3.1.2. Preparación del inóculo de *C. aceticum*

El crecimiento del inóculo de *C. aceticum* se realizó en botellas de 100 mL, selladas con septums de goma, en condiciones anaerobias, con un volumen de trabajo de 50 mL y mezcla de gases CO: CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub> (20:20:60 v/v) como sustrato.

La composición de medio líquido de cultivo de *C. aceticum* (MCA de aquí en adelante), basado en el medio recomendado por DSMZ, fue la siguiente (para 1 L de agua destilada): 0,5 g de extracto de levadura, 0,408 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,534 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1 mL resazurina (desde una disolución stock de 0,5 g/L), 12,5 mL de solución 3A, 1 mL de solución TES I, 1 mL de solución TES II, 0,5 mL de solución calcio/vitaminas y 2,5 mL de solución reductora.

La solución 3A se preparó con la siguiente composición (por litro de agua destilada): 24 g de NH<sub>4</sub>Cl, 24 g de NaCl y 8 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O.

La solución TES I tenía la siguiente composición (por litro de agua destilada): 1,8 g HCl 37%, 61,8 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 61,25 mg MnCl<sub>2</sub>, 943,5 mg FeCl<sub>2</sub>, 64,5 mg CoCl<sub>2</sub>, 12,86 mg NiCl<sub>2</sub>, 67,7 mg ZnCl<sub>2</sub> y 13,35 mg CuCl<sub>2</sub>.

La solución TES II constaba de los siguientes compuestos (por litro de agua destilada): 400 mg de NaOH, 17,3 mg de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 29,4 mg de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> y 20,5 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

La solución de calcio/vitaminas constaba de (por litro de agua destilada): 11 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 20 mL de solución vitamínica, cuya composición fue (por litro de agua destilada): 20 mg D-biotina, 200 mg nicotinamida, 100 mg ácido para-aminobenzoico, 200 mg tiamina (vitamina B1), 100 mg de ácido pantoténico, 500 mg de piridoxamina, 100 mg de cianocobalamina (vitamina B12) y 100 mg de riboflavina.

La solución reductora constaba de 0,5 g de cisteína, 50 mL de NaHCO<sub>3</sub> (desde una solución stock de 80 g/L) y 1 mL de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (de una solución stock de 240,2 g/L).



Con excepción de la solución de calcio/vitaminas y de la solución reductora, las cuales se esterilizaron mediante filtración usando filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  de nitrato de celulosa (Sartorius 254 stedim Biotech, Gottingen, Alemania), al resto de los componentes del medio se les agregó nitrógeno y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos en botellas con tapones septum.

El inóculo se creció en un agitador orbital (Optic Ivymen Systems, Comecta, España) a 30°C y 200 rpm durante 48 horas.

### 3.1.3. Preparación del inóculo de *C. beijerinckii*

El crecimiento del inóculo de *C. beijerinckii* se realizó en botellas de 100 mL, selladas con septums de goma, en condiciones anaerobias, usando el medio RCM (Reinforced Clostridial Medium) y gaseando con nitrógeno para desplazar el oxígeno. Previamente, el medio RCM se esterilizó a 121°C durante 15 min. El inóculo se creció en un agitador orbital (Optic Ivymen Systems, Comecta, España) a 35°C y 135 rpm durante 24 horas.

## 3.2. Fermentación con *C. aceticum*

Se llevaron a cabo diferentes ensayos de fermentación con *C. aceticum* para maximizar la concentración de ácido acético generado, que pueda ser utilizado en el posterior co-cultivo junto con *C. beijerinckii*. En esta sección se detallará las condiciones de experimentación aplicadas para evaluar el comportamiento del microorganismo en diferentes condiciones del crecimiento.

### 3.2.1. Selección del medio de crecimiento de *C. aceticum*

Para seleccionar el medio de crecimiento de *C. aceticum*, con el objetivo final del co-cultivo, se llevaron a cabo fermentaciones de *C. aceticum* en su propio medio (MCA) y en el medio de cultivo óptimo de *C. beijerinckii* (MCB de aquí en adelante), evaluando simultáneamente el efecto de la temperatura (30, 35°C) y pH (6, 9). En la Figura 9 se muestran las condiciones evaluadas para cada medio.

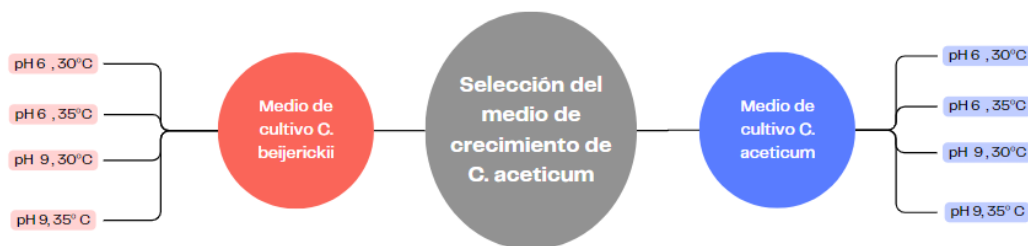


Figura 9 Variables evaluadas en la selección de medio de microorganismo de *C. aceticum*

Las fermentaciones se llevaron a cabo en botellas de 100 mL con 50 mL de medio y pH ajustado mediante la adición de NaOH y HCl.

Una vez esterilizado el medio durante 15 minutos a 121°C, se adicionaron las vitaminas y solución reductora (descritas en la Sección 3.1) correspondientes al medio

de *C. aceticum*, y en el caso del medio de *C. beijerickii* (MCB) las correspondientes solución de vitaminas (0,001 g/L PABA, 0,001 g/L tiamina y 0,00001 g/L biotina), una solución salina (0,60 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0,01 g/L MnSO<sub>4</sub>, 0,05 g/L FeSO<sub>4</sub>, y 0,01 g/L NaCl, 0,06 g/L KCl) y solución tampón de acetato (0,50 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,50 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2,20 g/L acetato de amonio), bajo condiciones anaerobias.

Una vez preparado el medio, se realizó la inoculación del microorganismo (10% v/v) y se alimentó con la mezcla de gases CO: CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub> (20:20:60 v/v) con una sobrepresión de 0,2 bares, siendo llevada a cabo la fermentación en un agitador orbital a 200 rpm. No hubo control de pH durante la fermentación.

Se tomaron muestras líquidas cada 24 horas, de las cuales se midió la densidad óptica a 600 nm, mientras que el líquido restante se centrifugó a 13500 rpm durante 5 minutos y se analizó su contenido en productos de fermentación (ácido acético, etanol y otros metabolitos).

Por otro lado, con objeto de analizar el comportamiento de los gases C1, se toma diariamente una muestra gaseosa del espacio de cabeza de 1 mL y se determina su composición (en términos de concentración de CO, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>).

### 3.2.2. Evaluación de diferentes estrategias de alimentación en fed-batch para la fermentación de *C. aceticum*

Se prepararon los medios para los experimentos en las mejores condiciones de medio de crecimiento, pH y temperatura ensayadas en la Sección 3.2.1 (MCA, pH 9 y 35°C), pero modificando en este caso el tipo de sustrato:

- gas (CO: CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>): fermentación autotrófica.
- co-sustrato (gas (CO: CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>) + fructosa): fermentación mixotrófica.

y la frecuencia de alimentación de gases:

- Al inicio de la fermentación, una única vez.
- Al inicio de la fermentación y diariamente durante la fermentación.
- Al inicio de la fermentación y diariamente a partir de las 72 horas.

En el caso de las fermentaciones con co-sustrato (mixotróficas), además del gas, se adicionó fructosa al inicio de la fermentación, en una concentración de 10 g/L, partiendo de una solución stock de fructosa de 500 g/L (previamente esterilizada por filtración).

Las fermentaciones se llevaron a cabo a 35°C y 200 rpm durante siete días, usando botellas de 100 mL con 50 mL de volumen de trabajo, en un agitador orbital (Optic Ivymen Systems, Comecta, España). De igual modo que en los ensayos de la Sección 3.2.1., se tomaron muestras líquidas y gaseosas diariamente para determinar la densidad óptica, productos de fermentación y comportamiento de los gases C1.

### 3.2.3. Evaluación de la relación de volumen del medio en la fermentación de *C. aceticum*

En estos ensayos, se llevó a cabo la fermentación autotrófica de *C. aceticum* en botellas de 1 L, selladas con septums de goma, en condiciones anaerobias estrictas,

en las mejores condiciones del MCA, pH y temperatura ensayadas en la Sección 3.2.1 (pH 9, 35°C y 200 rpm). El volumen de trabajo utilizado fue de 100, 200 y 300 mL de medio de crecimiento.

Los ensayos se realizaron con una única alimentación inicial de gas o en modo fed-batch (alimentando gas al inicio de la fermentación y diariamente durante la fermentación; al inicio de la fermentación y diariamente a partir de las 72 horas). Se tomaron muestras líquidas y gaseosas diariamente para determinar la densidad óptica, productos de fermentación y comportamiento de los gases C1.

### 3.2.4 Evaluación de la adición de hierro al medio de cultivo en la fermentación de *C. aceticum*

Se evaluó el impacto de la adición de hierro (50 y 75 g/L) al medio de cultivo, bajo las mismas condiciones previamente descritas (pH 9, 35°C y 200 rpm).

Todos los experimentos se llevaron a cabo en botellas de 100 mL, con 50 mL de MCA, 10% v/v de inóculo y alimentación de gases (CO:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>), con una única alimentación inicial de gas o en modo fed-batch (alimentando gas al inicio de la fermentación y diariamente a partir de las 72 horas). Se tomaron muestras diariamente, tanto de la fase gaseosa como líquida.

### 3.3. Fermentación con co-cultivos de *C. aceticum* y *C. beijerinckii*

Los ensayos se llevaron a cabo usando el MCA (descrito en la Sección 3.1.2), pero adicionando los nutrientes y soluciones necesarias para el crecimiento de *C. beijerinckii* del MCB (ver Sección 3.2.). A este medio conjunto se lo llamará MCAB de aquí en adelante. Se usó una concentración de inóculo del 10% (v/v) tanto para *C. aceticum* como *C. beijerinckii*.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en botellas de 100 mL, con 50 mL de MCAB, a 35°C, 200 rpm, y pH inicial de 6 y 9. Se utilizó una concentración inicial de fructosa de 30 g/L (co-sustrato), de acuerdo a resultados previos obtenidos por el grupo de investigación, y una concentración de hierro de 50 g/L.

Se analizaron tres configuraciones de co-cultivo (en todos los casos, *C. aceticum* fue inoculado al comienzo de la fermentación (t=0)):

- Co-cultivos secuenciales
  - Inoculación de *C. beijerinckii* a las 24 horas de la inoculación con *C. aceticum*.
  - Inoculación de *C. beijerinckii* a las 48 horas de la inoculación con *C. aceticum*.
- Co-cultivo simultáneo
  - Ambos microorganismos se inoculan al mismo tiempo al inicio de la fermentación.

Se alimentó con gases (CO:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>) una única vez al inicio de la fermentación y otra vez a las 72 horas, con objeto de liberar la presión almacenada en las botellas.

Al igual que en los experimentos anteriores, se tomaron muestras, tanto líquidas como gaseosas, diariamente para determinar los productos de fermentación y comportamiento de los gases C1.

Adicionalmente, se realizó en el MCAB un experimento de control para ambos microorganismos por separado.

Todos los ensayos y determinaciones analíticas se realizaron por duplicado y los resultados mostrados se corresponden con el promedio.

### 3.4. Métodos analíticos

Las concentraciones de fructosa y de los productos obtenidos en las fermentaciones en la fase líquida se analizaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), utilizando un detector de índice de refracción (Waters 2414) y una columna Aminex HPX-87H, a 60°C (fructosa, ácidos orgánicos) y a 30°C (solventes), con fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M y un flujo de 0,6 mL/min.

La composición del gas en muestras gaseosas se determinó utilizando un cromatógrafo de gases 8860 GC (GC, Agilent Technologies, España) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). El GC se encuentra equipado con una columna de tamiz molecular 15 HP-PLOT 5A (ID, 0,53 mm; espesor de película, 50 µm), la temperatura del horno se mantuvo constante a 45°C, y en el puerto de inyección, la temperatura se mantuvo constante a 250°C en el detector.

La densidad óptica (OD) a 600 nm se midió usando un espectrofotómetro (Uvmini 1240, Shimazu Suzhou Wfg., Kyoto, Japón) con objeto de determinar la concentración de microorganismos en las muestras líquidas.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Selección de medio de crecimiento de *C. aceticum*

#### 4.1.1. Selección del medio para el co-cultivo: crecimiento de *C. aceticum* en su medio y en el medio de *C. beijerinckii*

Siendo el objetivo final de este trabajo realizar un co-cultivo exitoso de los microorganismos *C. aceticum* y *C. beijerinckii*, resulta fundamental evaluar la viabilidad de crecimiento de *C. aceticum* en el medio de crecimiento de *C. beijerinckii*. Este estudio aporta información valiosa sobre la compatibilidad y adaptabilidad futura de estos dos microorganismos, y permite incrementar las posibilidades de alcanzar los resultados deseados en este trabajo de investigación.

Para ello, se realizó el crecimiento el inóculo del *C. aceticum* en el MCA, medio adecuado para esta cepa y en el medio de crecimiento del *C. beijerinckii* MCB. Se midió la densidad óptica, con el objetivo de evaluar el crecimiento del microorganismo en ambos medios, y verificar el tiempo de crecimiento del inóculo previo a la inoculación en la fermentación.

*Tabla 5* Crecimiento de *C. aceticum* en MCA y MCB

| Medio de cultivo | Densidad óptica (600nm) |       |
|------------------|-------------------------|-------|
|                  | 48 h                    | 72 h  |
| MCA              | 0,256                   | 0,224 |
| MCB              | 0,140                   | 0,164 |

A partir de los resultados obtenidos, que se muestran en la Tabla 5, se confirmó como óptimo 48 horas de crecimiento del inóculo, debido a la poca variación en los resultados obtenidos. Además, se nota menor crecimiento en el medio de *C. beijerinckii*, como se esperaba.

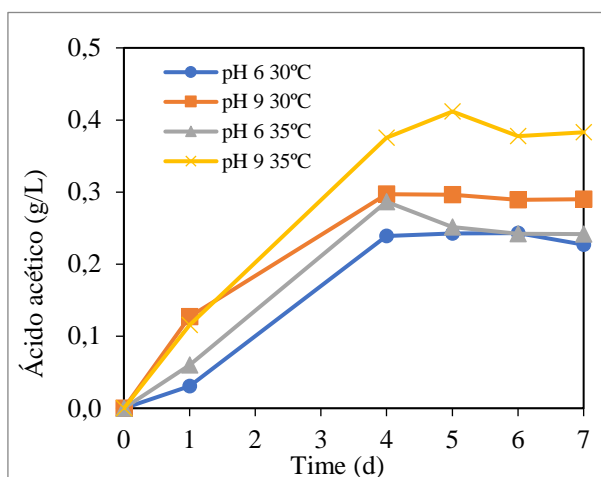
#### *Cultivos con C. aceticum: Optimización del pH y la temperatura en la producción de ácido acético*

Con el objetivo de establecer las condiciones óptimas para el crecimiento del *C. aceticum* y maximizar las concentraciones de ácido acético obtenido, se evaluó la influencia del pH y la temperatura en los medios de cultivo mencionados anteriormente.

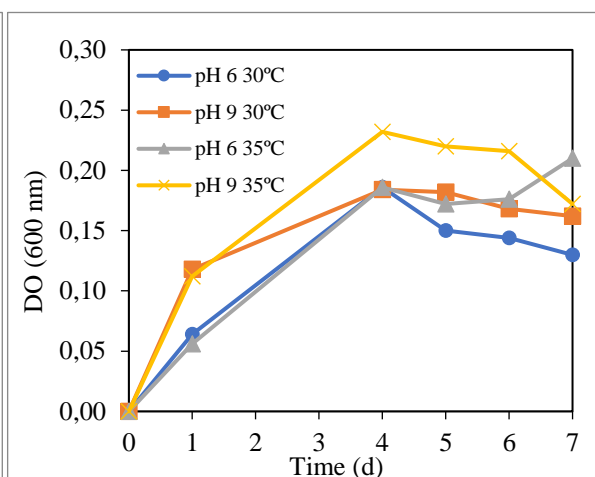
Al igual que en el experimento anterior, se inoculó *C. aceticum* en ambos medios, pero en este experimento se evaluó la influencia de la temperatura (30 °C y 35 °C) y del pH (pH 6 y pH 9).

En primer lugar, se debe mencionar que en el medio de *C. beijerinckii* (MCB) no se obtuvo ácido acético en ningunas de las condiciones definidas de pH y temperatura, por lo que los resultados no se muestran en este informe.

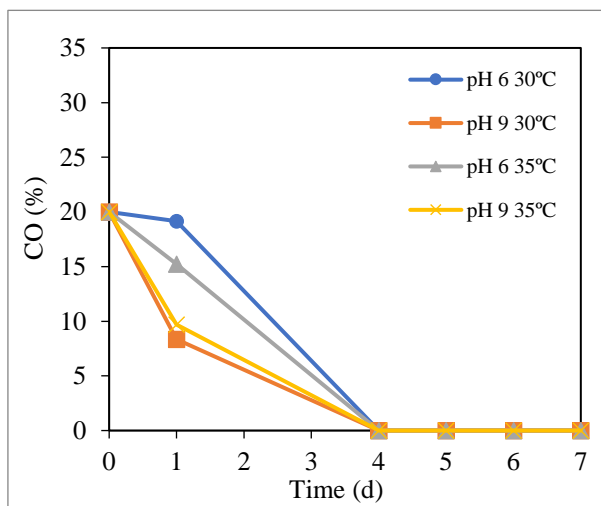
Por otro lado, se muestran en las Figuras 10, 11, 12 y 13 los resultados obtenidos para la fermentación de *C. aceticum* en MCA.



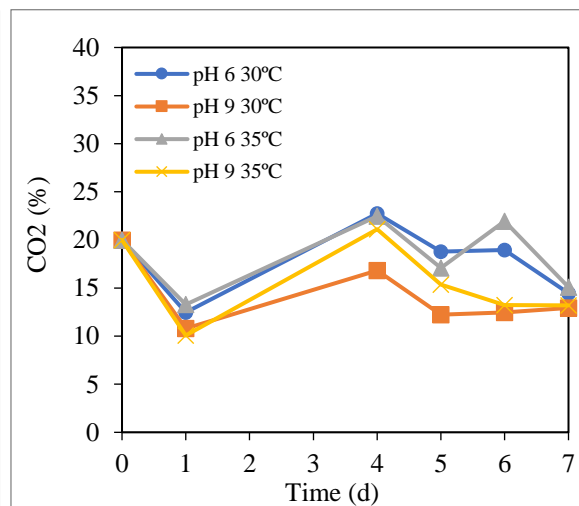
**Figura 10** Concentración de ácido acético (g/L) variando pH y Temperatura en monocultivo de *C.aceticum*.



**Figura 11** Densidad óptica variando pH y Temperatura en monocultivo de *C.aceticum*.



**Figura 12** Concentración de CO (%) variando pH y Temperatura en monocultivo de *C.aceticum*



**Figura 13** Concentración de CO<sub>2</sub> (%) variando pH y Temperatura en monocultivo de *C.aceticum*

En la Figura 10 se puede observar que las mayores concentraciones obtenidas de ácido acético son para las condiciones de pH 9, siendo la máxima de  $0,38 \pm 0,001$  g/L a 35 °C, al cuarto día de la fermentación. Además, se observa en estas condiciones una densidad óptica de 0,24 este mismo día de fermentación. Los resultados alcanzados en estas condiciones son menores a los recopilados de investigaciones previas que se visualizan en la Tabla 2.

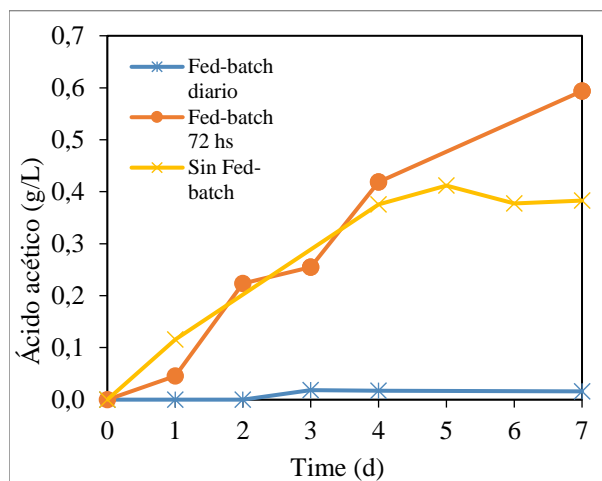
En las Figuras 12 y 13 se muestran las concentraciones de los gases de alimentación de la fermentación. Se puede observar que al cuarto día de fermentación se había consumido la totalidad el CO en todos los casos, mientras que no se observan consumos de CO<sub>2</sub>. En base a los resultados obtenidos en este experimento, se decidió continuar con la investigación en las condiciones de pH 9 y temperatura 35°C.

*Evaluación de estrategias de alimentación en fed-batch para la fermentación de C. aceticum*

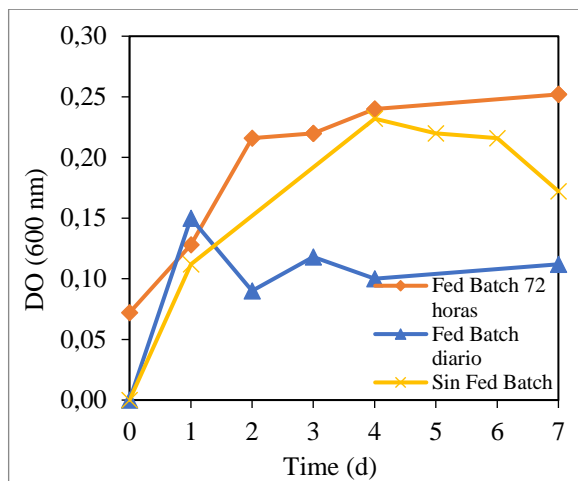
En base al perfil de concentración de CO, se evaluó adoptar un enfoque de alimentación fed-batch, buscando favorecer la producción de ácido acético y mitigar cualquier limitación vinculada con falta de sustrato a lo largo del proceso de fermentación.

En esta línea, se consideró la alimentación fed-batch con frecuencia diaria desde el primer día, o a partir de las 72 horas, que es el momento cuando se agota el CO, según lo observado en los experimentos previos.

En las Figuras 14 y 15 se muestran los resultados obtenidos de ácido acético y la densidad óptica medida para la alimentación fed-batch, frente a los resultados alcanzados previamente con alimentación de gases al inicio de la fermentación (sin fed-batch).



**Figura 14** Concentración de ácido acético (g/L) en experimentos de estrategias de alimentación fed batch para monocultivo de *C.aceticum*



**Figura 15** Densidad óptica en experimentos de estrategias de alimentación fed-batch para monocultivo de *C.aceticum*

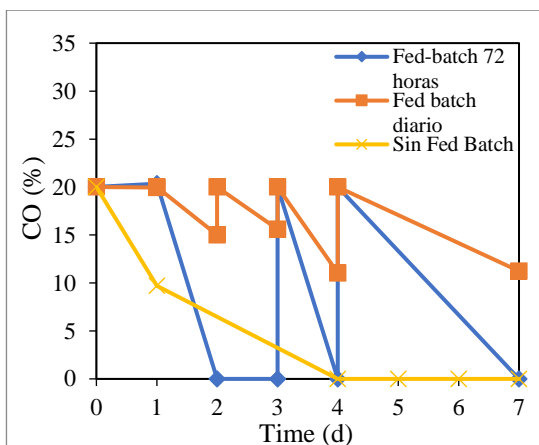
Comparativamente, hasta el cuarto día de la fermentación se nota un comportamiento similar entre el sistema de fed-batch a partir de las 72 horas y sin fed-batch. A partir de este momento, la alimentación de gases C1, mejoró la producción de ácido acético alcanzando los 0,59 g/L (mientras que en el sistema sin alimentación fed-batch se alcanzó un máximo de 0,38 g/L). Ambos experimentos tienen su máximo de crecimiento (densidad óptica entre 0,23-0,25) al cuarto día, como se puede observar en la Figura 15.

Por lo contrario, la fermentación con fed-batch diario de gases obtiene las menores concentraciones de ácido acético, menor a 0,1 g/L.

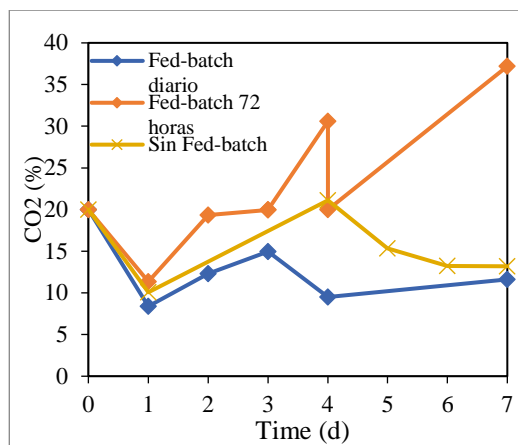
En las Figuras 16 y 17 se muestran las concentraciones de CO y CO<sub>2</sub> en la fermentación fed-batch. Se puede observar que entre el segundo y cuarto día es cuando se consume principalmente el CO, tanto en el caso de fed-batch a las 72 horas y sin fed-batch.

En resumen, se selecciona como sistema alimentación para el ensayo de fermentación autótrofa las condiciones fed-batch a partir de las 72 horas.





**Figura 16** Concentración de CO en la fermentación fed-batch de monocultivo de *C. acetivum*

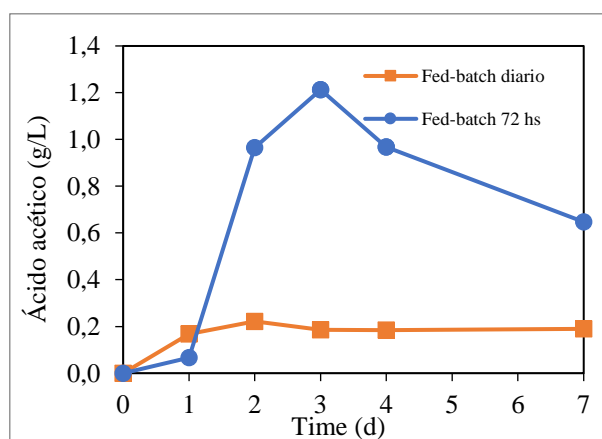


**Figura 17** Concentración de CO<sub>2</sub> en la fermentación fed-batch de monocultivo de *C. acetivum*

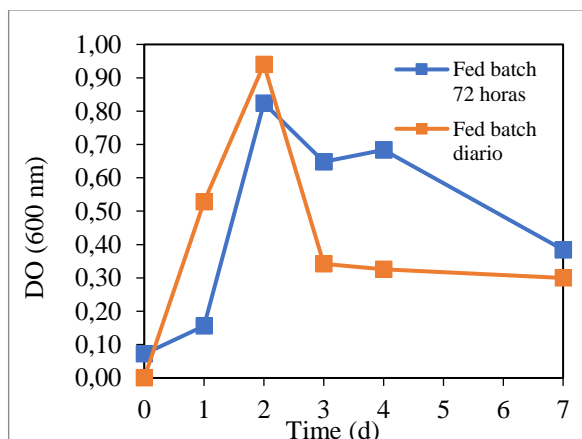
#### 4.1.2. Fermentación con *C. acetivum* utilizando fructosa como co-sustrato

El anterior experimento se repitió en condiciones de fermentación mixotrófica, realizando la adición de fructosa de 10 g/L como co-sustrato. Dado que el microorganismo se comporta como un mixótrofo (usando tanto CO como fructosa, como fuente de carbono y energía), resulta de interés evaluar las mismas condiciones fed-batch de alimentación de gas, pero en presencia de dicho co-sustrato. Esta condición es de suma relevancia debido a que, según experimentos previos realizados por el grupo de investigación, la cepa que se utiliza en el co-cultivo *C. beijerinckii* tiene como requerimiento fructosa en su medio de cultivo.

Se puede observar en la Figura 18 que al igual que en condiciones autótrofas, las mayores concentraciones de ácido acético se alcanzan cuando la alimentación fed-batch de gases es realizada a partir de las 72 horas, obteniéndose 1,21 g/L. En la Figura 19 se observa la densidad óptica medida, la cual tiene su máximo al segundo día de fermentación.



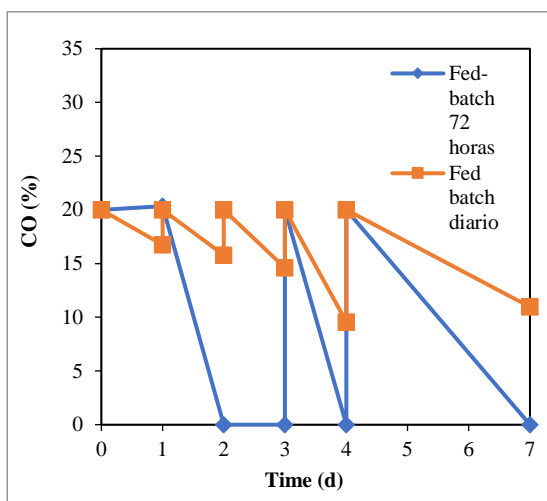
**Figura 18** Concentración Ácido acético (g/L) en fermentación de monocultivo de *C. acetivum* con gases y fructosa como sustratos, alimentación fed-batch



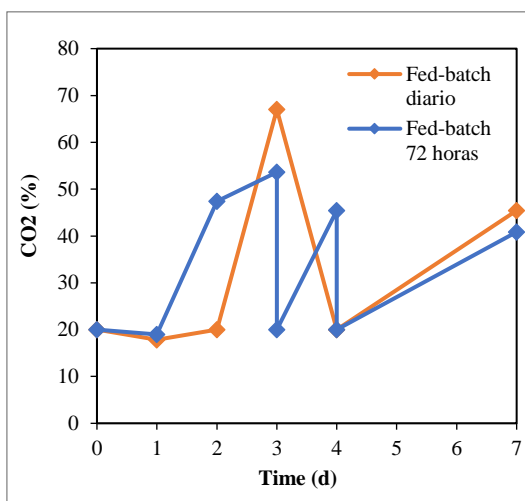
**Figura 19** Densidad óptica en fermentación de monocultivo de *C. acetivum* con gases y fructosa como sustratos, alimentación fed-batch



En las Figuras 20 y 21 se muestran las concentraciones de los gases durante la fermentación. Se observa la producción de CO<sub>2</sub> desde el segundo día al cuarto día, propio del metabolismo de la fermentación de la fructosa, y el consumo del CO durante la fermentación.

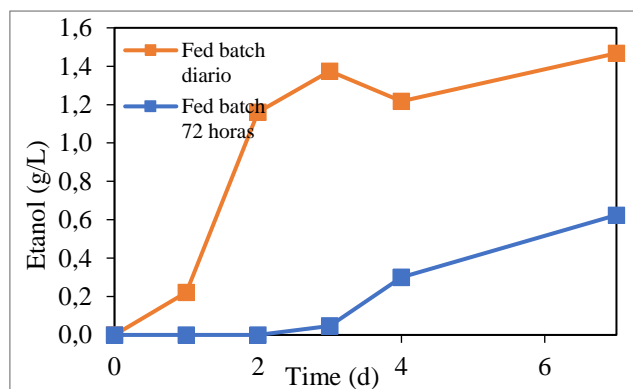


**Figura 20** Concentración de CO (%) en fermentación de monocultivo de *C. aceticum* con gases y fructosa como sustratos, alimentación fed-batch



**Figura 21** Concentración de CO<sub>2</sub> (%) en fermentación de monocultivo de *C. aceticum* con gases y fructosa como sustratos, alimentación fed-batch

Adicionalmente, se muestra en la Figura 22 la producción de etanol para la fermentación de *C. aceticum* en presencia de gases y fructosa. En este caso, se alcanzó mayor producción para el sistema de alimentación en fed-batch diario, de 1,47 ± 0,001 g/L, respecto al fed-batch a partir de las 72 horas (0,62 g/L).



**Figura 22** Concentración de etanol (g/L) en la fermentación de monocultivo de *C. aceticum* con gases y fructosa como sustratos, alimentación fed batch

#### 4.1.3. Fermentación de *C. aceticum* en botellas de 1L

En este experimento se buscó aumentar la relación de volumen de medio<sup>1</sup>(%) en la fermentación de *C.aceticum*, para evaluar el impacto de la transferencia de gases en la concentración disponible de CO<sub>2</sub> y CO, los cuales son cruciales para el rendimiento

<sup>1</sup> Se considera como relación de volumen de medio al porcentaje del volumen del medio en el volumen total.

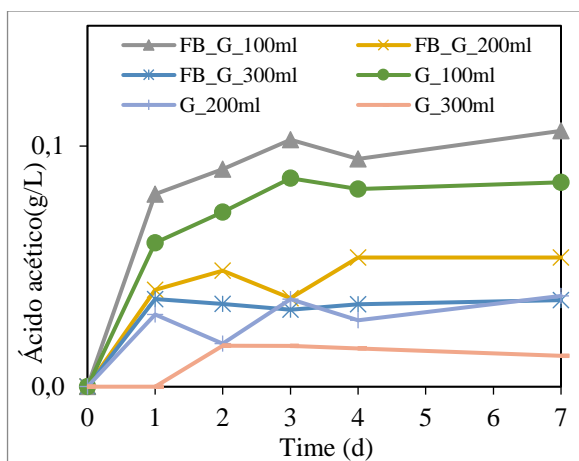
de la fermentación autótrofa. Estos ensayos tenían como objetivo identificar la relación de volumen de medio adecuada para maximizar la producción de ácido acético y la eficiencia del proceso.

Se realizaron ensayos en los que se varió la relación de volumen de medio en un 10%, 20% y 30% en botellas de 1 L. En este caso, al igual que los anteriores, la concentración de inóculo fue del 10% v/v, a pH 9 y 35°C, con alimentación fed-batch de gases diario y sin alimentación fed-batch.

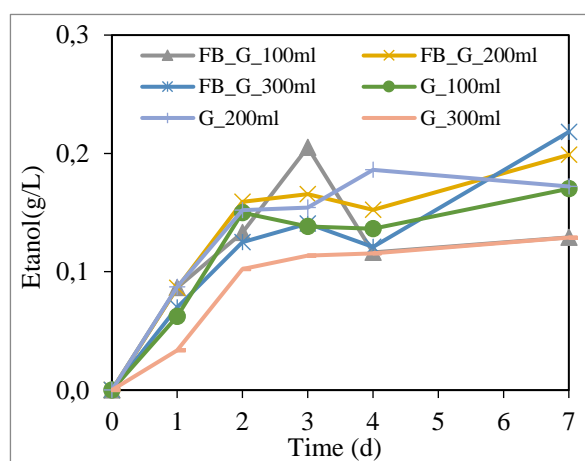
En las Figuras 23, 24, 25, 26, 27 y 28 se muestran los resultados obtenidos en este experimento. Se identifica a las fermentaciones que se alimentan únicamente al inicio de la fermentación con gases como “G\_volumen de medio”, mientras que a los que se realiza estrategia de alimentación de gases fed-batch “FB\_G\_volumen de medio”.

En la Figura 23 se puede observar que las mayores concentraciones de ácido acético se alcanzaron con la menor relación de volumen del medio ensayada, de 10 %. Además, comparativamente, la alimentación en fed-batch diaria de gases obtuvo mejores resultados que sin alimentación fed-batch, para cada una de las relaciones ensayadas.

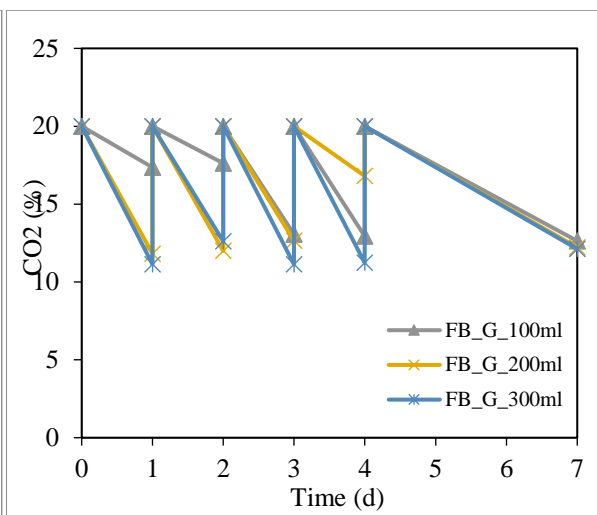
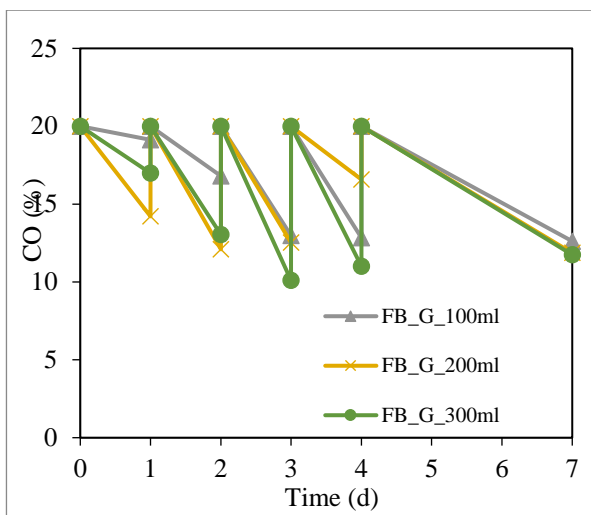
Las concentraciones de ácido acético alcanzadas en todos los experimentos fueron bajas, entre 0,01 y 0,11 g/L, y se obtuvo como coproducto etanol como se puede ver en la Figura 24, alcanzando concentraciones entre 0,13 y 0,22 g/L. Según búsquedas bibliográficas, es posible que esta producción de etanol y las bajas concentraciones de ácido acético tengan sentido por el cambio de botellas a mayor volumen, acentuando la inhibición por alta concentración de CO. La producción de etanol significa un desequilibrio del metabolismo del carbono, en donde se necesitan cuatro equivalentes de NADH para la síntesis de etanol a partir del acetyl-CoA, mientras que la síntesis de acetato requiere dos [37].



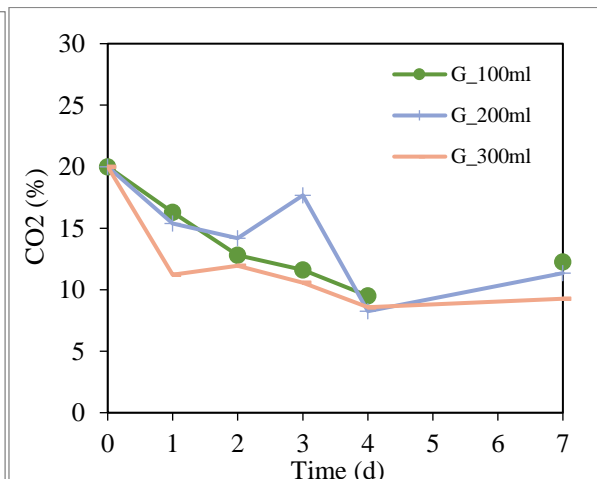
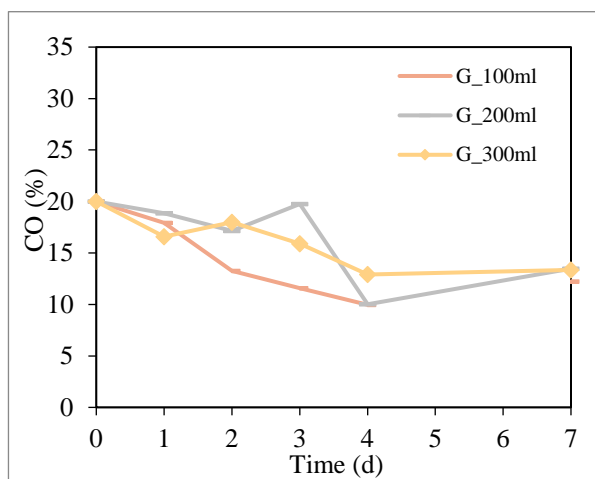
**Figura 23** Concentración de ácido acético (g/L). Evaluación de alimentación fed-batch y relación de volumen (%), en monocultivo de *C. acetivum*



**Figura 24** Concentración de etanol (g/L). Evaluación de alimentación fed-batch y relación de volumen (%), en monocultivo de *C. acetivum*



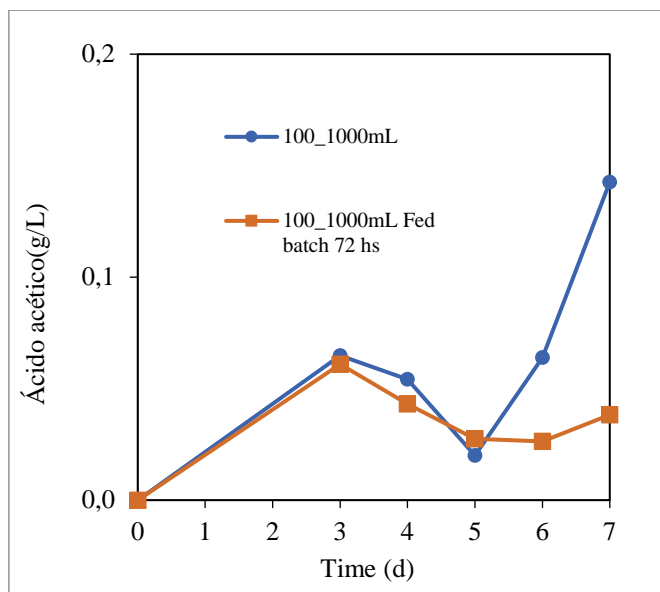
**Figura 25** Concentración de CO(%). Evaluación de **Figura 26** Concentración CO<sub>2</sub>(%). Evaluación de alimentación fed-batch y relación de volumen (%), en monocultivo de *C. aceticum*



**Figura 27** Concentración CO(%). Evaluación de **Figura 28** Concentración CO<sub>2</sub> (%). Evaluación de alimentación fed Batch y relación de volumen (%), en monocultivo de *C. aceticum*

Se puede observar en las Figuras 25, 26, 27 y 28 las concentraciones de los gases C1 durante las fermentaciones. En ninguno de los casos se logra consumir totalmente el CO, como sí se había observado en los experimentos previos.

Este experimento se repitió en las mejores condiciones, en 10 % de relación de volumen de medio, con alimentación fed-batch a partir de las 72 horas (el sistema que obtuvo mejores resultados previamente) y sin alimentación fed-batch. Para ambos casos los valores de ácido acético son menores a 0,2 g/L.

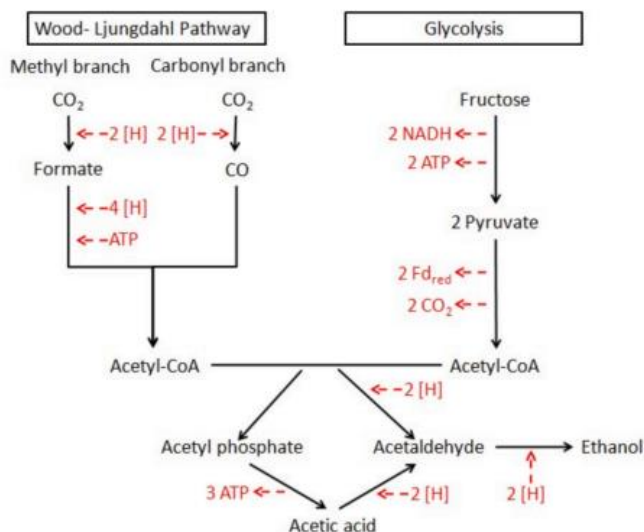


**Figura 29** Concentración de ácido acético (g/L) en fermentación en monocultivo de *C. acetivum* con estrategia de alimentación fed-batch a partir de las 72 horas

Luego de estos experimentos, se confirma que independientemente del tipo de alimentación fed-batch, la fermentación en botellas de 1L no logra buenos resultados en cuanto a producción de ácido acético.

Es posible que este comportamiento se deba a la inhibición por CO, como también por cambios de acidez en el medio por la disolución del CO<sub>2</sub>.

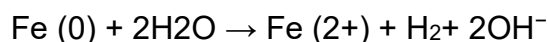
De igual manera que se mencionó anteriormente, este efecto de inhibición por CO fue observado en un estudio comparativo realizado por Kübra\_Arslan et al., en donde se vincula la obtención de etanol con la acidificación de medio [14,22]. Como se puede observar en las rutas de la Figura 30, en este caso la ruta correspondería a la transformación del Acetyl-CoA en parte a etanol como producto final.



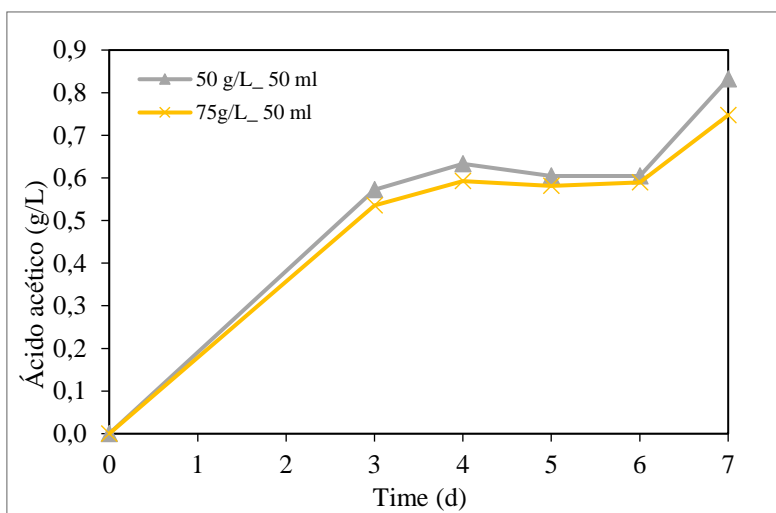
**Figura 30** Ruta WLP y de Glucólisis de *C. acetivum* [14].

## 4.2. Evaluación de la influencia de la adición de hierro en la fermentación de *C. aceticum*.

En base a los estudios previos, y de acuerdo a lo recopilado en el estudio bibliográfico, se decidió analizar impacto de la adición de hierro cero valente en el medio de fermentación de *C. aceticum* [31], buscando maximizar la concentración de ácido acético, mediante la generación de hidrógeno, lo que favorece la reducción del CO<sub>2</sub>.



Este experimento se realizó con concentraciones de 50 g/L y 75 g/L, en botellas de 100 mL con 50 mL de medio, en las condiciones pH 9 y a 35°C.

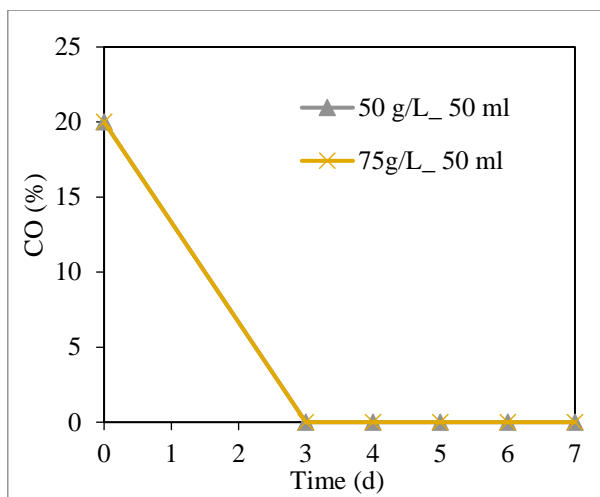


**Figura 31** Concentración de ácido acético (g/L) . Experimento de adición de hierro al medio de cultivo de fermentación de monocultivo de *C. aceticum*

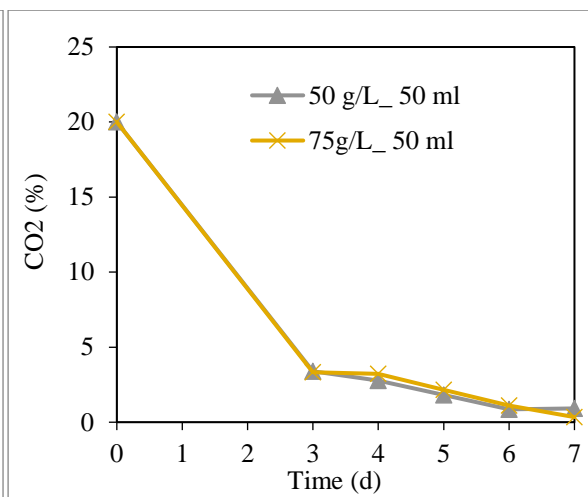
En la Figura 31, se puede observar que la concentración alcanzada es mayor que en los experimentos anteriores, siendo a los siete días de  $0,83 \pm 0,013$  g/L de ácido acético. En comparación, este resultado es mayor al doble que se obtiene en las mismas condiciones de experimentación, pero sin hierro (0,38 g/L, Sección 4.1.1).

Adicionalmente, en las Figuras 32 y 33 se puede observar el consumo total del CO al tercer día y el consumo total del CO<sub>2</sub> al séptimo día.

Estos datos confirman el beneficio del aporte del hierro al medio de cultivo, transformándolo a un medio reductor, con mayor capacidad a fijar gases C1 y maximizando la producción de ácido acético.



**Figura 32** Concentración de CO (%) Experimento de adición de hierro al medio de cultivo de fermentación de monocultivo de *C. aceticum*



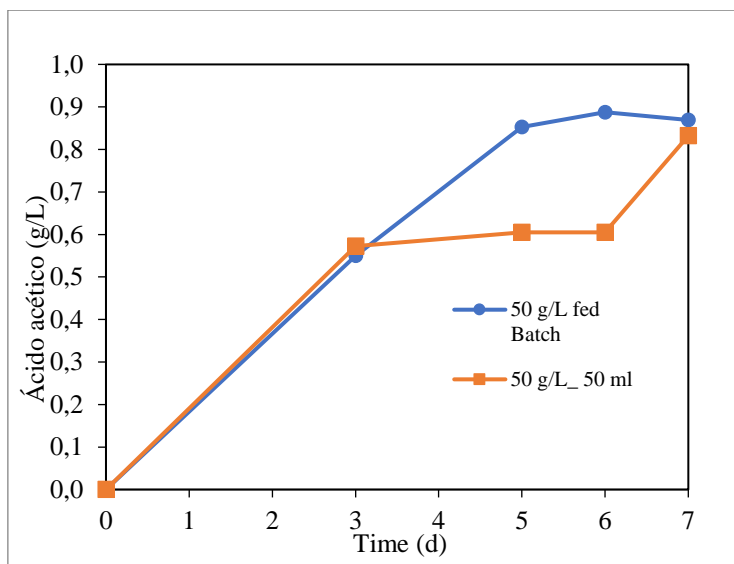
**Figura 33** Concentración de CO<sub>2</sub> (%) Experimento de adición de hierro al medio de cultivo de fermentación de monocultivo de *C. aceticum*

Siendo los resultados alcanzados muy similares para ambas concentraciones de hierro, se seleccionó para los siguientes ensayos 50 g/L de hierro cero valente.

Debido a que el hierro genera interferencias por el aporte de turbidez al medio, no se pudieron realizar las medidas de absorbancia.

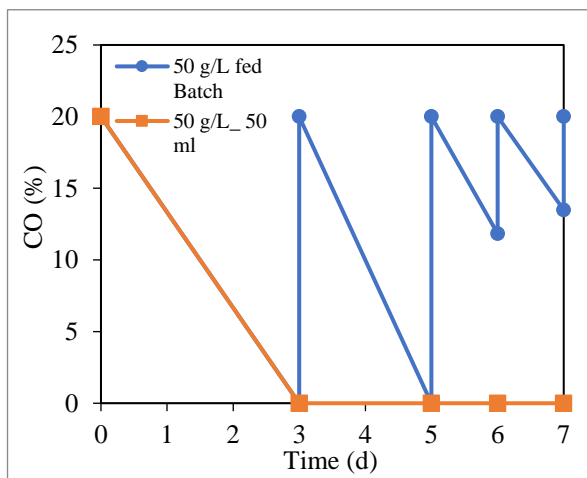
#### 4.2.1. Evaluación de alimentación fed-batch de gases con adición de hierro al medio de cultivo

En las condiciones seleccionadas anteriormente de concentración de hierro en el medio de cultivo, se realizó la prueba de alimentación fed-batch a partir de las 72 horas. Con esta estrategia de alimentación se observaron resultados similares, pero se redujeron los días en los cuales alcanza la concentración máxima de acético entre 0,8-0,9 g/L, siendo para el caso de fed-batch en cinco días, y en el caso sin fed-batch siete días, como se puede observar en la Figura 34.

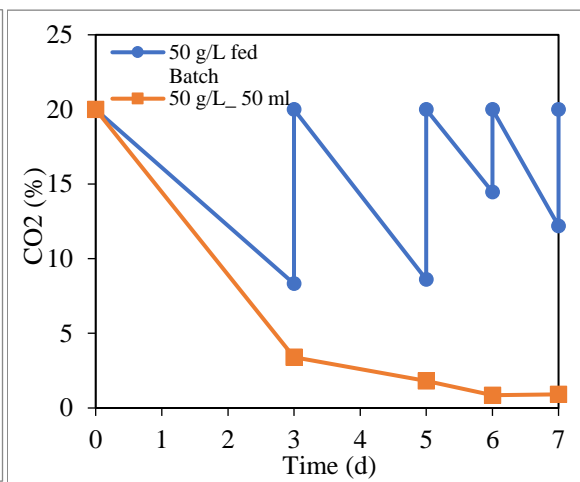


**Figura 34** Concentración de ácido acético (g/L)..Experimento de adición de hierro al medio de cultivo, con estrategia de alimentación fed-batch en de fermentación de monocultivo de *C. acetikum*

Adicionalmente, al igual que los experimentos previos, se observa en las Figuras 35 y 36 un consumo total del CO al tercer día (momento en el cual se vuelve a alimentar de gases), al igual que al quinto día, y por el otro lado, el consumo total del CO<sub>2</sub> al séptimo día.



**Figura 35** Concentración de CO(%) .Experimento de adición de hierro al medio de cultivo, con estrategia de alimentación fed-batch en de fermentación de monocultivo de *C. acetikum*



**Figura 36** Concentración de CO<sub>2</sub>(%) .Experimento de adición de hierro al medio de cultivo, con estrategia de alimentación fed-batch en de fermentación de monocultivo de *C. acetikum*

### 4.3. Resumen de resultados con monocultivos de *C. acetikum*

En la Tabla 6 se resumen los mejores resultados obtenidos para las condiciones evaluadas en las fermentaciones de *C. acetikum*.

Se puede observar, como se mencionó en las secciones anteriores, que las mejores condiciones en donde se logran eliminar los gases CO/CO<sub>2</sub> y maximizar la producción

de ácido acético fueron en botellas de 100 mL con 50 mL de medio *C. aceticum*, con la adición de hierro en 50 g/L, a 35°C y pH 9.

Además, los mejores resultados se alcanzaron tanto para la fermentación autótrofa como la mixotrófica (con 30 g/L de fructosa) en condiciones de alimentación fed-batch de mezcla de gases C1 a partir de las 72 horas.

Estos resultados obtenidos se tomaron como base para la fermentación en co-cultivos con *C. beijerinckii* que se detallan en la próxima sección.

**Tabla 6** Resumen de resultados de evaluación de variables para el monocultivo de *C. aceticum*

| Identificación del experimento   | Sustrato                 | Tipo de alimentación           | Condiciones de experimentación           | pH | Temperatura | Concentración ácido acético g/L | Concentración etanol g/L |
|--|--------------------------|--------------------------------|--|----|-------------|---------------------------------|--------------------------|
| 4.1. Selección de medio de crecimiento de <i>C. aceticum</i>   | Mezcla gas C1            | Batch a t=0                    | 50 mL en botellas 100 mL                 | 9  | 35°C        | 0,41                            | 0                        |
| 4.1. Evaluación de estrategias de alimentación en fed-batch para la fermentación de <i>C. aceticum</i> | Mezcla gas C1            | Fed-batch a partir de las 72 h | 50 mL en botellas 100 mL                 | 9  | 35°C        | 0,59                            | 0                        |
|  | Mezcla gas C1 + fructosa | Fed-batch a partir de las 72 h | 50 mL en botellas 100 mL                 | 9  | 35°C        | 1,21                            | 0,62                     |
| 4.2.1. Evaluación de la influencia de la adición de hierro al medio de cultivo de <i>C. aceticum</i> . | Mezcla gas C1            | Fed-batch a partir de las 72 h | 50 mL en botellas 100 mL (hierro 50 g/L) | 9  | 35°C        | 0,87                            | 0                        |

#### 4.4. Fermentación en co-cultivo con *C. aceticum* y *C. beijerinckii*

Una vez seleccionadas las condiciones de fermentación de *C. aceticum*, se continuó la investigación con el co-cultivo de ambos microorganismos.

Se analizaron tres configuraciones de co-cultivos (en todos los casos, *C. aceticum* fue inoculado al comienzo de la fermentación (t=0)):

- Co-cultivos secuenciales
  - Inoculación de *C. beijerinckii* a las 24 horas de la inoculación de *C. aceticum*.
  - Inoculación de *C. beijerinckii* a las 48 horas de la inoculación de *C. aceticum*.



- Co-cultivo simultáneo
  - Ambos microorganismos se inoculan al mismo tiempo al inicio de la fermentación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer experimento en la sección de 4.1, el crecimiento de *C. acetikum* en el medio de cultivo de *C. beijerinckii* (MCB) es muy bajo y, no se logró obtener ácido acético en estas condiciones. Por este motivo, para el desarrollo del co-cultivo de interés, se utilizó el medio MCAB, detallado en la sección 3.3 de materiales y métodos, preparado a partir de la composición de ambos medios MCA y MCB para garantizar los nutrientes necesarios para el crecimiento de los dos microorganismos.

#### 4.4.1. Estudio de crecimiento de *C. acetikum* y *C. beijerinckii* como monocultivo en MCAB

En primer lugar, se realizó un estudio de los microorganismos por separado, en el medio MCAB. Este estudio de monocultivo permitió determinar el efecto que podría tener en el co-cultivo la presencia del otro microorganismo, y proporciona información significativa para evaluar el efecto sinérgico, la competencia de nutrientes e identificar si la interacción de los microorganismos tiene el efecto beneficioso buscado.

En este estudio de control se inoculó cada microorganismo al 10 % v/v en MCAB, a pH 9 y 35°C, 30 g/L de fructosa y 50 g/L de hierro.

##### *Fermentación de C. acetikum en MCAB*

Se puede observar en la Figura 37 que la fermentación del microorganismo *C. acetikum* alcanza al séptimo día de fermentación el máximo de ácido acético de 2,32 g/L, mientras que la concentración de etanol crece a lo largo de la fermentación, alcanzando 1,35 g/L. Esta tendencia de resultados es similar a los obtenidos en la bibliografía consultada, vinculado a la producción de etanol en la etapa solventogénica, propiciada por la disminución de pH [14,22].

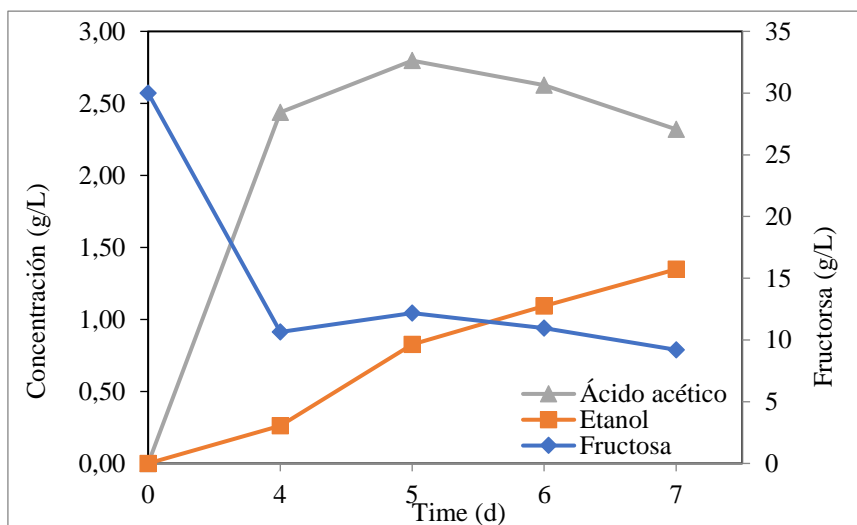
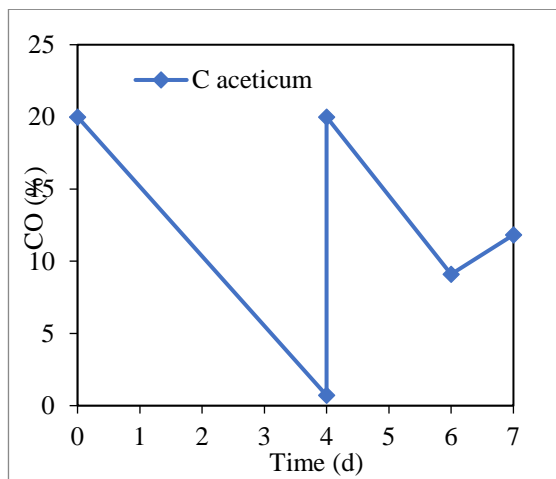
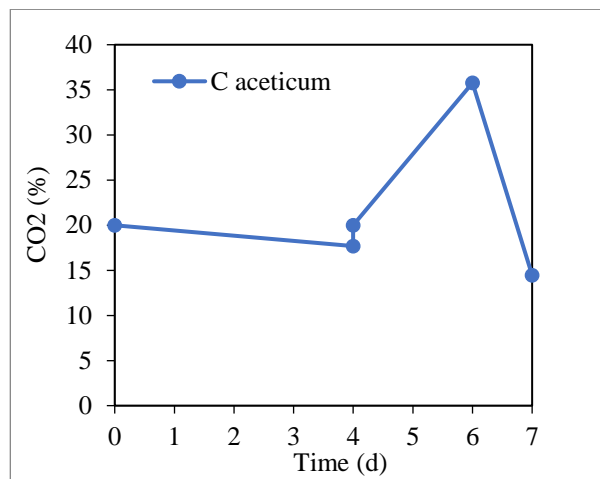


Figura 37 Concentraciones de metabolitos (g/L) en la fermentación de *C. acetikum* en medio conjunto

Se puede observar en las Figuras 38 y 39 el consumo total del CO al cuarto día, (momento en el cual se vuelve a alimentar de gases). Por el otro lado, en este caso se observa un pico de CO<sub>2</sub>, debido a la fermentación de la fructosa, resultado esperable por el metabolismo del microorganismo, como también se observó en experimentos previos.



**Figura 38** Concentración de CO (%) en la fermentación de *C. acetivum* en medio conjunto



**Figura 39** Concentración de CO<sub>2</sub> (%) en la fermentación de *C. acetivum* en medio conjunto

En este caso, se puede deducir que las condiciones nutricionales del medio de cultivo conjunto son beneficiosas para la fermentación del *C. acetivum*, ya que obtiene resultados satisfactorios en concentraciones de ácido acético, consiguiendo consumir la fructosa, y ambos gases C1.

### Fermentación de *C. beijerinckii* en MCAB

En la investigación de la fermentación de *C. beijerinckii* como monocultivo, se analizó la producción de ácido butírico y butanol, en las mismas condiciones de medio evaluadas para el *C. acetivum*.

Se alcanzó un máximo de producción de ácido butírico, de 0,46 g/L, y 3,4 g/L de butanol a partir del cuarto día de fermentación, como se puede observar en la Figura 40.

Además, se observó que se consume en su totalidad la fructosa al cuarto día de fermentación. Los resultados obtenidos a pH 9 son mejores a los obtenidos en bibliografía consultada, en donde a pH básico controlado no lograron obtener crecimiento celular [38].

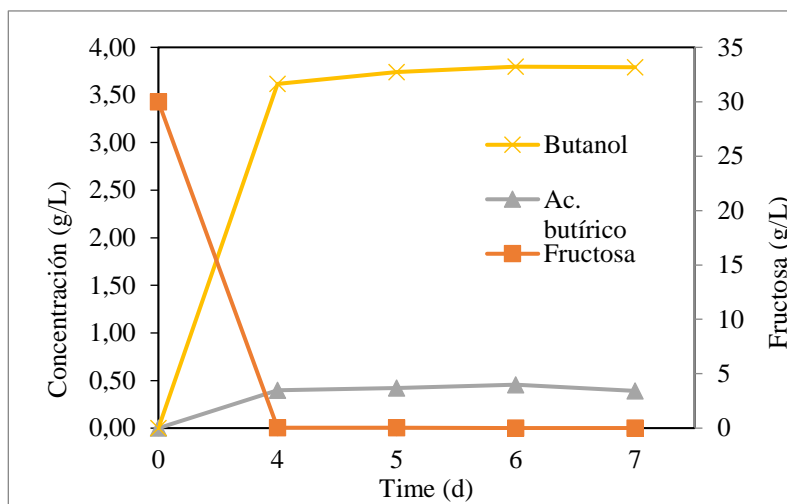


Figura 40 Concentraciones de metabolitos (g/L) en la fermentación de *C. beijerinckii* en medio conjunto

#### 4.4.2. Fermentación en sistema de co-cultivos secuenciales

Con el objetivo de evaluar el tiempo de inoculación del *C. beijerinckii*, se realizaron dos experimentos, después de 24 horas y 48 horas de la inoculación de *C. acetium*. Tiene el propósito de investigar el impacto de la producción y acumulación del ácido acético generado por *C. acetium*, y evaluar si tiene un efecto beneficioso en la producción de butanol de *C. beijerinckii*.

Simultáneamente, en estas dos condiciones se evaluó la influencia del pH del medio, ya que según la bibliografía consultada [38,12] y los experimentos previos realizados, es una variable crucial para la producción de bioproductos.

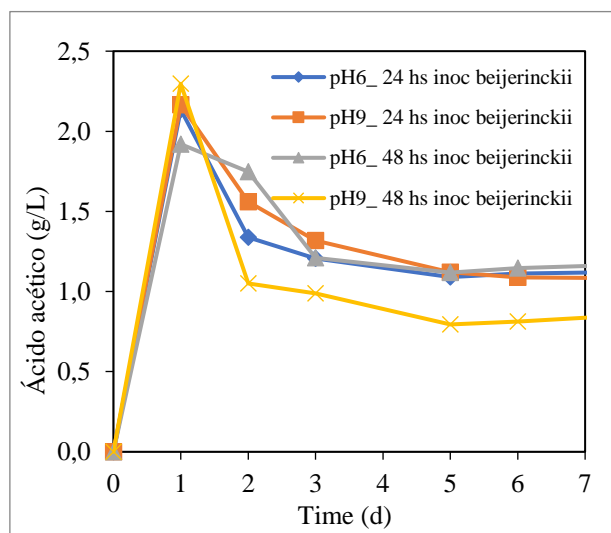
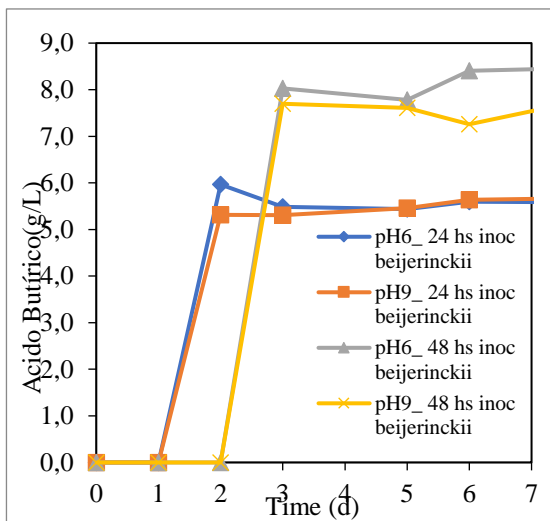
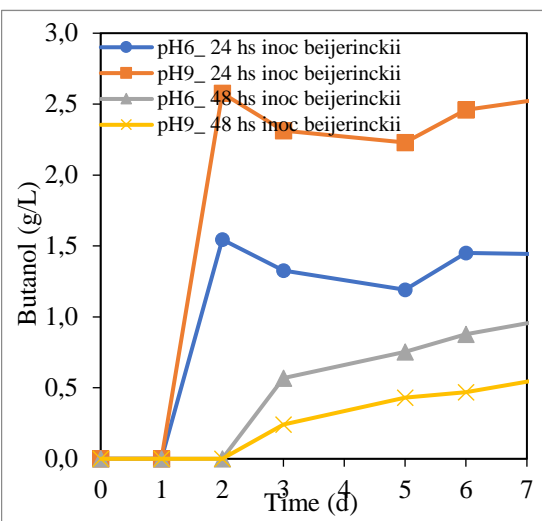


Figura 41 Concentración de ácido acético (g/L) en fermentaciones secuenciales a pH 6 y 9, con inoculación de *C. beijerinckii* a tiempo 24 y 48 horas de inoculación de *C. acetium*.

Se puede observar en la Figura 41 que a las 24 horas de fermentación se encuentra un pico de ácido acético, de 2,3 g/L, el cual se consume durante la fermentación, principalmente en el segundo y tercer día. En todos los casos, alcanzan valores similares, siendo el valor máximo para pH 9.



**Figura 42** Concentración de ácido butírico en fermentaciones secuenciales a pH 6 y 9.



**Figura 43** Concentración de butanol en fermentaciones secuenciales a pH 6 y 9

Respecto a la obtención de productos y metabolitos de interés, se observa en las Figuras 42 y 43 una clara influencia del tiempo de inoculación en la producción de ácido butírico y butanol.

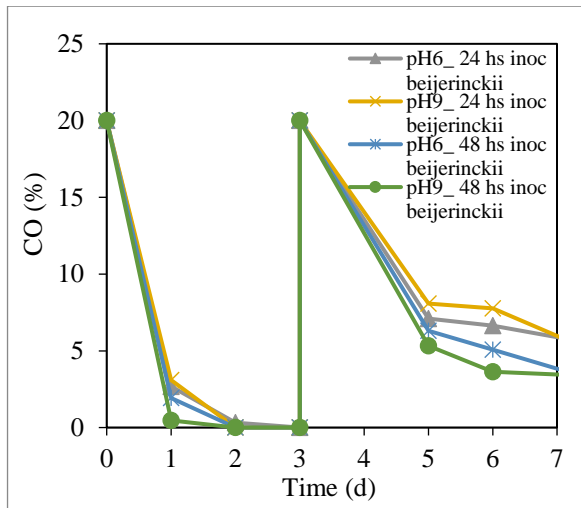
En las condiciones de inoculación a las 48 horas de fermentación, en donde se encuentra acumulado el ácido acético producido por *C. aceticum*, se favorece principalmente la producción de ácido butírico (entre 7,5 y 8,5 g/L) y no la de butanol (entre 0,6 y 1 g/L), independientemente del pH inicial del medio.

En las condiciones de inoculación a las 24 horas de fermentación, en donde se acumula también ácido acético, pero en menor medida, se alcanzan mayores concentraciones de butanol (entre 1,4 y 2,6 g/L) y menores de ácido butírico (5,7 g/L).

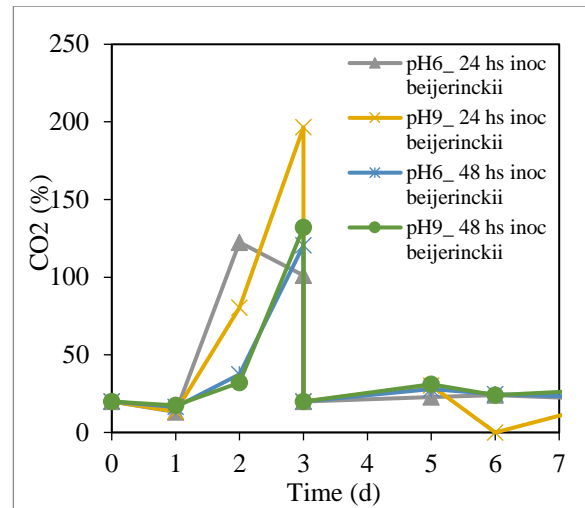
Si se compara con los resultados obtenidos con *C.beijerinckii* en MCAB en monocultivo, se alcanzan menores concentraciones de butanol (3,40 g/L) y mayores concentraciones de ácido butírico (0,46 g/L), al mismo pH inicial 9.

Según la bibliografía consultada [38,12], los valores de pH próximos a la neutralidad tienen tendencia a mayores producciones de ácido butírico, mientras que los pH ácidos favorecen la producción de butanol.

Es importante resaltar que, en la bibliografía consultada, el pH es controlado durante la fermentación, mientras que, en este TFM, el pH se ajusta inicialmente y no se realiza regulación posterior, generando condiciones variables de acidez provocada por los propios metabolismos y ácidos producidos.



**Figura 44** Concentración de CO (%) en fermentaciones secuenciales a pH 6 y 9



**Figura 45** Concentración de CO<sub>2</sub> (%) en fermentaciones secuenciales a pH 6 y 9

En la Figura 44 se puede observar la concentración de CO, con alimentación fed-batch a las 72 horas, el cual se consume completamente al segundo día de fermentación, y luego del fed-batch se vuelve a consumir hasta una concentración final aproximada de 5%.

Por otro lado, al observar la Figura 45 se detecta un pico producción de CO<sub>2</sub> al siguiente día de ser inoculados *C. beijerinckii*, lo cual tiene sentido, ya que es producido por la fermentación de la fructosa.

En las Figuras 46, 47, 48 y 49 se muestran los perfiles de ácido acético, etanol, ácido butírico, butanol y fructosa, obtenidos en los ensayos, con el objetivo de comparar las diferentes fermentaciones.

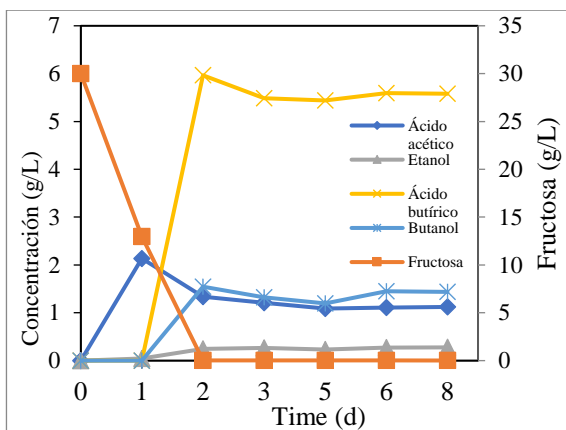


Figura 46 Concentraciones (g/L) de metabolitos en la fermentación secuencial pH6\_24 horas inoc *C. beijerinckii*

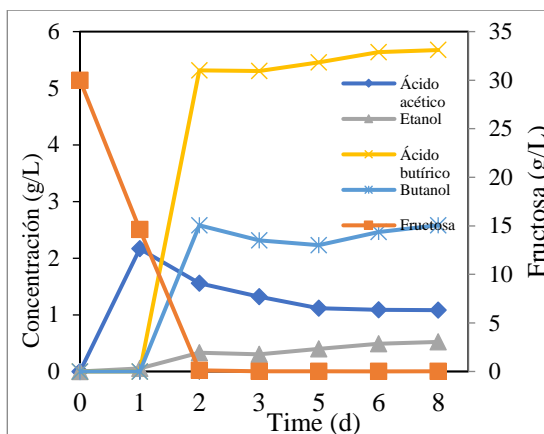


Figura 47 Concentraciones (g/L) de metabolitos en la fermentación secuencial pH9\_24 horas inoc *C. beijerinckii*

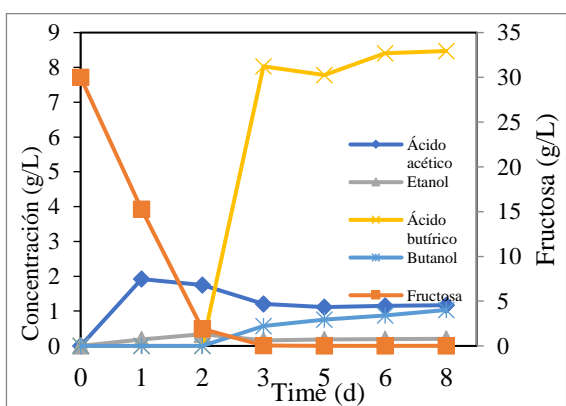


Figura 48 Concentraciones (g/L) de metabolitos en la fermentación secuencial pH6\_48 horas inoc *C. beijerinckii*

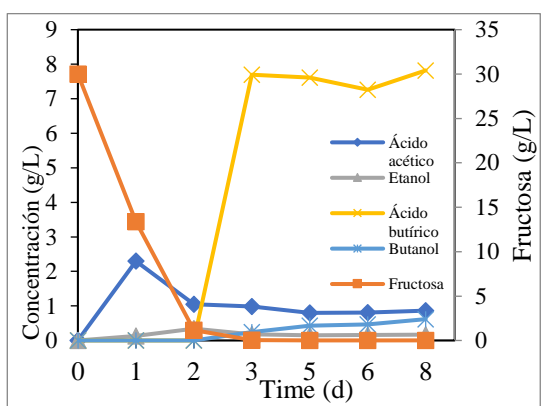


Figura 49 Concentraciones (g/L) de metabolitos en la fermentación secuencial pH9\_48 horas inoc *C. beijerinckii*

Se identifica que el consumo de la fructosa fue completo en el segundo día trascurrido desde la inoculación de *C. beijerinckii*. Esto tiene sentido, ya que lo utiliza como sustrato en su ruta metabólica de glucólisis. Además, se nota que a partir del quinto día los perfiles de los metabolitos, productos y sustratos no varía sustancialmente.

En la Tabla 7 se detallan los resultados obtenidos para la fermentación secuencial para un tiempo de fermentación de ocho días desde de la inoculación de *C. beijerinckii*.

Tabla 7 Resultados a los ocho días de fermentación secuencial a 24 y 48 horas de la inoculación de *C. beijerinckii*

| Exp.     | Fructosa (g/L) | Ácido acético (g/L) | Etanol (g/L) | Ácido Butírico (g/L) | Butanol (g/L) |
|----------|----------------|---------------------|--------------|----------------------|---------------|
| pH6_24 h | 0,01           | 1,12                | 0,28         | 5,58                 | 1,44          |
| pH9_24 h | 0,01           | 1,08                | 0,52         | 5,67                 | 2,58          |
| pH6_48 h | 0,01           | 1,17                | 0,20         | 8,47                 | 1,03          |
| pH9_48 h | 0,01           | 0,86                | 0,16         | 7,82                 | 0,62          |

Según lo explicado previamente acerca de la ruta metabólica de *C. beijerinckii*, en este caso, se puede deducir que el microorganismo prioriza la ruta acidogénica y no la solventogénica, ya que se acumula el ácido butírico, en vez de butanol, principalmente, para las condiciones de máxima acidez y acumulación de ácido acético (pH6 e inoculación después de 48 horas).

Se realizó el estudio de las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo en su metabolismo, buscando deducir las rutas metabólicas que prioriza *C. beijerinckii* para las condiciones de fermentación ensayadas.

En la Figura 50, se muestra la ruta de butanoato, fermentación ABE, para este microorganismo. Se puede observar que, según su estudio del genoma, *C. beijerinckii* tiene los genes que codifican las enzimas para producir butanoato (ácido butírico código C00246 en KEGG), las cuales se identifican con color lila en la Figura 50.

### KEGG Map

Current Genome: [Clostridium beijerinckii DJ159 \(Re-Annotation 1 version 2\)](#)

Genes in Clostridium beijerinckii DJ159 (Re-Annotation 1 version 2)

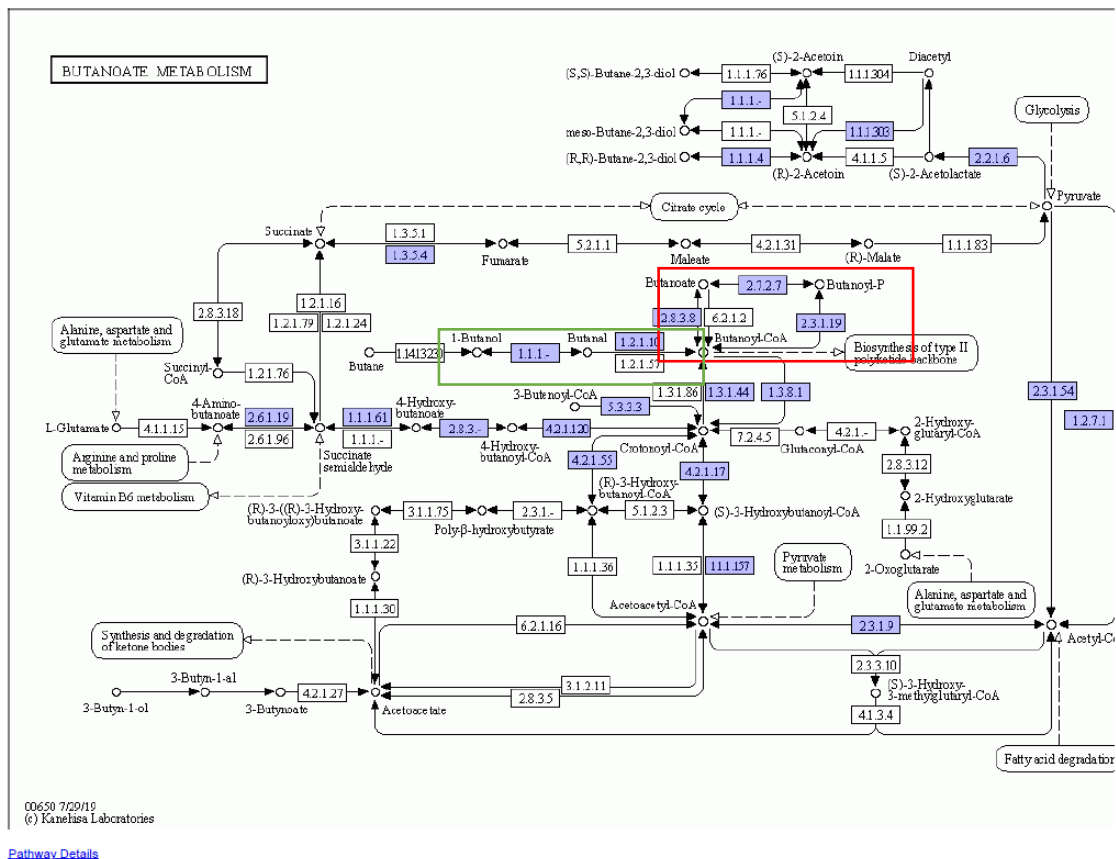


Figura 50 Ruta del Butanoato para *C. beijerinckii* desde KEGG

Una vez presente el compuesto intermedio Butanocyl-CoA, generado a partir del Acetyl-CoA, como se observa en la Figura, toma una vía metabólica hacia dos posibles productos:

#### 1- Butanol (En verde en la Figura 50)

- Butanocyl-CoA → Butanal, con la actuación de la enzima identificada en KEGG con el número 1.2.1.10 (butanal:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase (CoA-acylating))
  - $\text{Butanal} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Butanocyl} - \text{COA} + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (1)$
- Butanal → Butanol, con la actuación de la enzima identificada en KEGG con el número 1.1.1., (butanol dehidrogenas)
  - $\text{Butanal} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Butanol} + \text{NAD}^+ \quad (2)$



## 2- Ácido butírico (En rojo en la Figura 50)

- a.
  - Butanocyl-CoA → Butanoyl-P, con la actuación de las enzimas identificadas en KEGG con el número 2.3.1.19 (butanoyl-CoA:phosphate butanoyltransferase)
    - $\text{Butanoyl} - \text{CoA} + \text{phosphate} \Leftrightarrow \text{CoA} + \text{butanoyl phosphate} \quad (3)$
  - Butanoyl-P → Ácido butírico, con la actuación de las enzimas identificadas en KEGG con el número 2.7.2.7 (ATP:butanoate 1-phosphotransferase)
    - $\text{ATP} + \text{Ácido butírico} \Leftrightarrow \text{ADP} + \text{butanoyl phosphate} \quad (4)$
- b. Butanocyl-CoA → Ácido butírico, con la actuación de las enzimas identificadas en KEGG con el número 2.8.3.8 (butanoyl-CoA:acetate CoA-transferase)
  - $\text{Butanoyl} - \text{CoA} + \text{Acetate} \Leftrightarrow \text{Ácido butírico} + \text{Acetyl} - \text{CoA} \quad (5)$

La ruta 1 orientada hacia el butanol se identificó claramente en el primer ensayo de control en el medio en conjunto, en donde no había presencia de ácido acético. Además, se puede deducir que la presencia de protones libres (H<sup>+</sup>) generados tanto por la generación de ácidos, como la propia acidificación del medio, son necesarios para la producción de butanol, según las reacciones (1) y (2).

En los experimentos secuenciales, cuando la concentración de ácido acético es elevada (principalmente en el experimento de 48 horas de inoculación), hay mayor tendencia a la producción de ácido butírico, desplazándose en la reacción (5) hacia la derecha.

Además, al haber consumido el Butanocyl-CoA y el pH ser muy ácido, impide la etapa solventogénica. En este caso, la reacción (1) no se desplaza hacia la izquierda, reduciendo la producción de butanal y, por ende, tampoco se favorece la reacción (2) hacia la derecha, la cual tiene como producto final de interés el butanol.

Por otro lado, se puede observar que partiendo de un medio básico de pH 9, e inoculando a las 24 horas el *C. beijerinckii*, se logran mejores resultados, ya que la ecuación (5) no se prioriza como en los casos anteriores por la acumulación de ácido acético, y la acidez que se genera en el medio es suficiente para la producción de butanol.

### 4.4.3. Fermentación de co-cultivos con inoculación simultánea

En las siguientes Figuras 51, 52, 53 y 54 se muestran los resultados obtenidos en la fermentación simultánea de ambos microorganismos. En este caso, se propuso evaluar el co-cultivo restringiendo la variable de acumulación de ácido acético presente del experimento previo. Fue realizado en las mismas condiciones, pero la inoculación fue simultánea, a tiempo inicial.

Se observa que, durante los primeros días de fermentación son mayores las concentraciones de ácido acético remanente en el caso de pH 6 que en las condiciones de pH 9, alcanzando mayores concentraciones de butanol (1,82 g/L frente a 0,93 g/L). Es decir que, en este experimento, las condiciones de pH inicial ácido favorecen la producción de butanol, a diferencia del experimento secuencial, favoreciendo la ruta 1 detallada en la sección anterior.



Respecto a la producción de ácido butírico, a partir del quinto día de fermentación ambos experimentos presentan resultados similares, siendo al séptimo día entre 5,5 y 6 g/L.

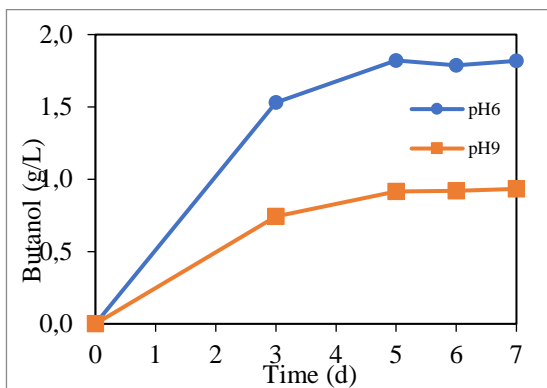


Figura 51 Concentración de butanol (g/L) en fermentación simultánea a pH 6 y pH 9

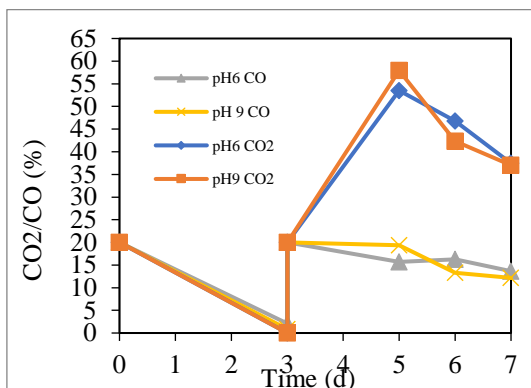


Figura 52 Concentración de CO y CO<sub>2</sub> (%) en fermentación simultánea a pH 6 y pH 9

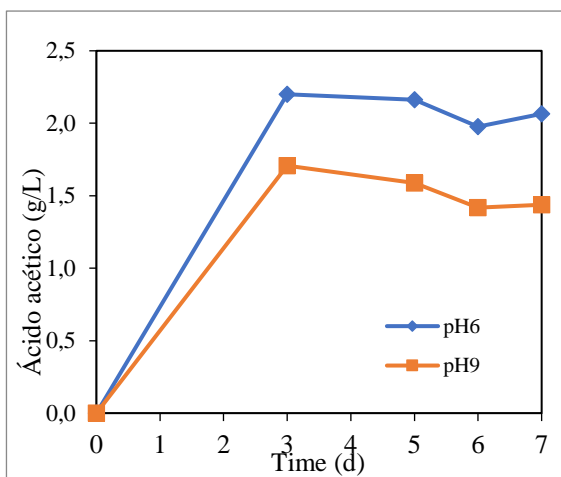


Figura 53 Concentración de ácido acético en fermentación simultánea a pH 6 y pH 9

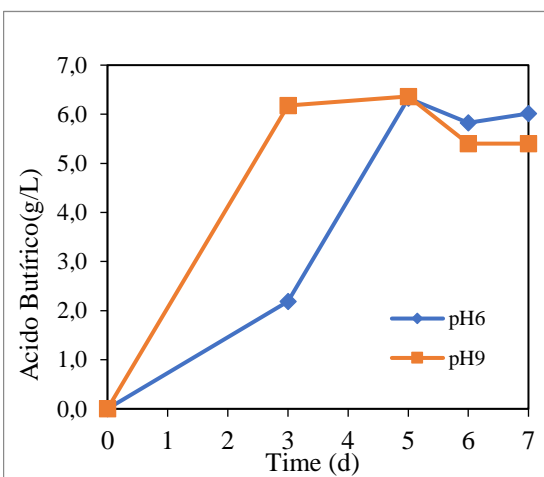


Figura 54 Concentración de ácido butírico en fermentación simultánea a pH 6 y pH 9

Se puede observar en la Figura 52 que a las 72 horas de fermentación se consumieron totalmente el CO y el CO<sub>2</sub>, momento en el cual se alimentaron nuevamente. Además, se identifica el pico de CO<sub>2</sub> al quinto día de fermentación, debido al propio metabolismo de los microorganismos por el consumo de la fructosa.

Tanto en este experimento simultáneo como en el secuencial, se observa que se alcanzan menores concentraciones de butanol y mayores concentraciones de ácido butírico, con respecto al microorganismo en monocultivo.

#### 4.5. Resumen de resultados de co-cultivos

En esta sección se muestra el resumen de los resultados obtenidos para las condiciones de co-cultivos ensayados.

Se dispusieron en las Figuras 55 y 56 gráficos comparativos para un mismo pH inicial (6 y 9).

Se puede observar que, en condiciones de pH inicial 6 la estrategia de inoculación simultánea obtiene las concentraciones más altas butanol, respecto al resto de las configuraciones, mientras que las menores concentraciones se obtienen en la inoculación secuencial (48 horas).

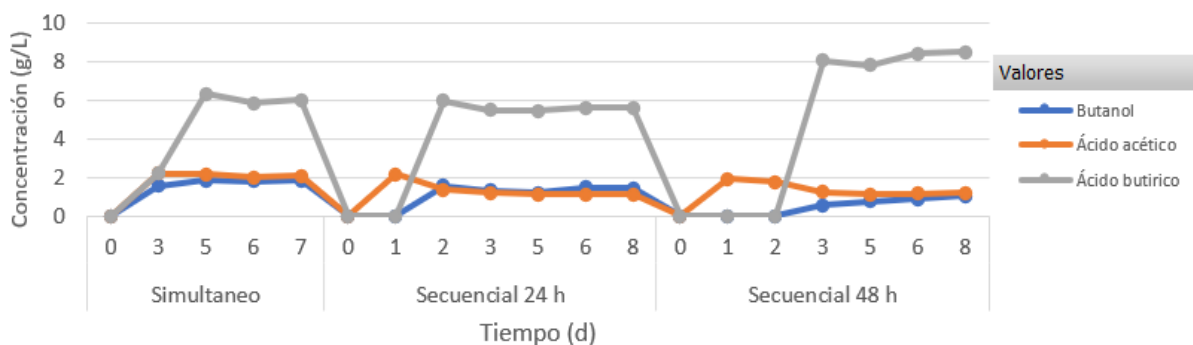


Figura 55 Gráfico comparativo de metabolitos de fermentaciones secuenciales y simultánea a pH inicial 6

En el caso de condiciones iniciales de pH 9, en la Figura 56 se muestra el gráfico comparativo con el control realizado, en donde la concentración de ácido acético mostrada es la obtenida del monocultivo de *C. aceticum* en el medio conjunto, y el ácido butírico y el butanol del monocultivo de *C. beijerinckii*.

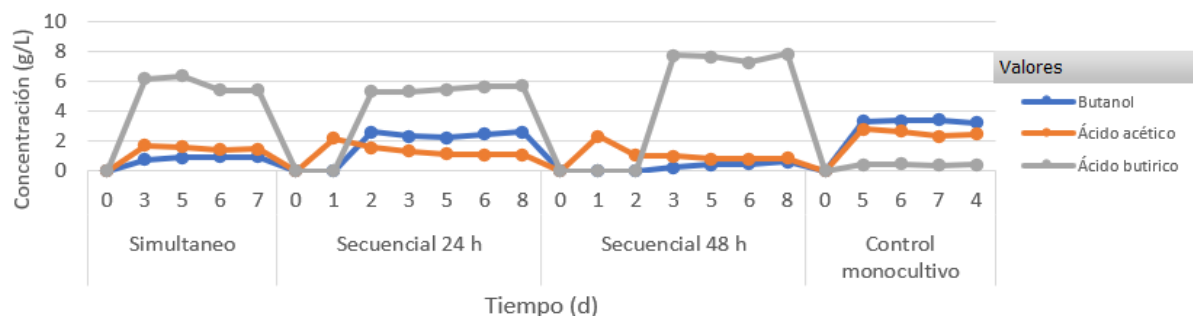


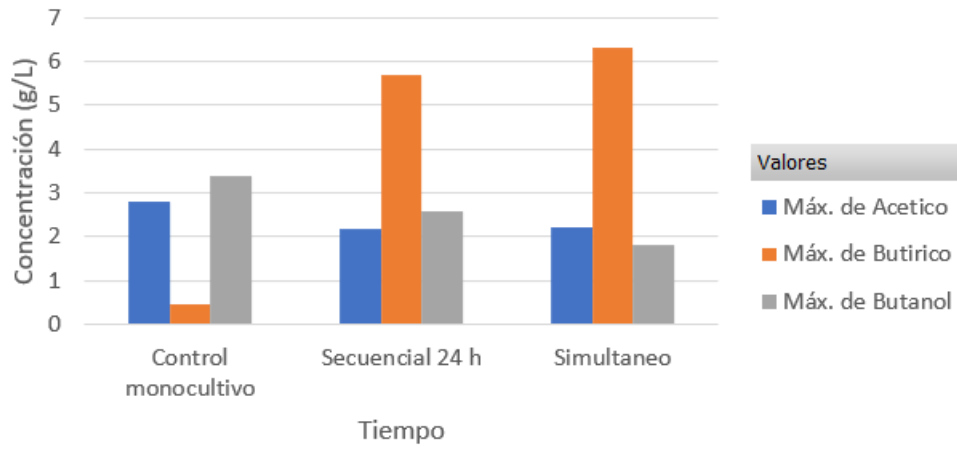
Figura 56 Gráfico comparativo de metabolitos de fermentaciones secuenciales, simultánea y control monocultivo a pH inicial 9

Se observa que, en estas condiciones la estrategia que favorece la producción de butanol es la inoculación secuencial a las 24 horas, mientras que al igual que a pH 9, la estrategia de inoculación a las 48 horas es la que obtiene menores concentraciones de butanol.

Además, se observa que, en ambas condiciones de pH, los casos en donde se consume más rápidamente el ácido acético tienen mayor formación de ácido butírico.

Finalmente, en la Figura 57 se resumen en las mejores condiciones los máximos de concentración de butanol obtenidos, en comparación con el control del monocultivo. Ninguno de los sistemas de co-cultivo mejoraron la concentración de butanol alcanzada en el monocultivo.

Sin embargo, para los sistemas de inoculación secuencial a las 48 horas, se obtuvieron altas concentraciones de ácido butírico, bioproducto de alto valor, alcanzando 8,5 g/L a pH 6, y 7,8 g/L a pH 9.



**Figura 57** Resumen de concentraciones máximas de butanol obtenidas para los experimentos de co-cultivo secuencial 24 h (a pH 9), simultáneo (a pH 6) y monocultivos de control

## 5. Conclusiones

En el marco de estudio de este TFM, se investigaron alternativas para la valorización de gases residuales C1 (CO<sub>2</sub>/CO) mediante la producción de bioproductos de valor añadido utilizando procesos de fermentación.

Para ello, se realizaron fermentaciones en sistemas de monocultivo de *C. aceticum* y *C. beijerinckii*, y ambos microorganismos en co-cultivo, en base a los resultados del relevamiento bibliográfico realizado.

Los mejores resultados obtenidos en la fermentación de *C. aceticum* (monocultivo), se alcanzaron con una relación de medio MCA del 50%, en botellas de 100 mL, pH 9, 35°C, estrategia de alimentación fed-batch de los gases C1 a partir de las 72 horas de inoculación, utilizando fructosa como co-sustrato. En estas condiciones se obtuvo un máximo de ácido acético de 1,21 g/L, logrando fijar el CO alimentado durante la fermentación.

Además, en el estudio específico de modificación del MCA con el agregado de hierro monovalente se mejoraron las condiciones reductoras del medio de cultivo. En las fermentaciones autótrofas realizadas, se mejoraron los resultados previos de 0,59 a 0,87 g/L de ácido acético, utilizando 50 g/L de hierro, logrando realizar la fijación de CO<sub>2</sub>.

Los resultados principales mostraron que, tanto en condiciones de monocultivo de *C. aceticum*, como en condiciones de co-cultivo con *C. beijerinckii* se lograron fijar los gases C1, mediante la ruta de fijación estudiada WLP, logrando cumplir parte de los objetivos propuestos en este trabajo.

Dentro de los hallazgos más importantes de este estudio de co-cultivos fueron que, para todas las condiciones evaluadas se favorece la producción de ácido butírico frente al butanol, siendo este también un metabolito de alto valor. Bajo condiciones ácidas del medio y acumulación de ácido acético, se logró obtener 8,5 g/L de ácido butírico en el cultivo secuencial con inoculación de *C. beijerinckii* 48 horas después de la inoculación de *C. aceticum* a pH 6, y 7,8 g/L a pH 9. Por otro lado, las mayores concentraciones de butanol se alcanzaron con la estrategia de inoculación 24 horas para pH 9 (2,6 g/L), y de inoculación simultánea a pH 6 (1,8 g/L).

Se considera importante para estudios futuros realizar un control de pH para maximizar la producción de butanol, y generar las condiciones para que sea ésta la ruta seleccionada por el microorganismo, convirtiendo dicho ácido butírico en butanol.

En resumen, este estudio proporciona evidencia de que el co-cultivo de los microorganismos es beneficioso para la producción de productos de interés como butanol y ácido butírico, fijando los GEI alimentados (CO<sub>2</sub>/CO). Además, resulta crucial la variable de acidez y su control en el medio de cultivo, para dirigir las rutas metabólicas de los microorganismos de interés, y por ende el producto obtenido.

## 6. Bibliografía

- [1] Parlamento Europeo (2023). *Cambio climático: gases de efecto invernadero que causan el calentamiento global*. <https://www.Europarl.Europa.Eu/Topics/Es/Article/20230316STO77629/Cambio-Climatico-Gases-de-Efecto-Invernadero-Que-Causan-El-Calentamiento-Global> [Consulta: 22 de abril de 2024].
- [2] European Environment Agency (2024). *EEA greenhouse gases — data viewer*. <https://www.Eea.Europa.Eu/Data-and-Maps/Data/Data-Viewers/Greenhouse-Gases-Viewer> [Consulta: 22 de abril de 2024].
- [3] I. International Energy Agency (2023). *CO<sub>2</sub> Emissions in 2023*. [www.iea.org](http://www.iea.org) [Consulta: 22 de abril de 2024].
- [4] International Energy Agency (2023). *Share of fossil fuels in the total energy supply of Latin America, the Caribbean and the world, 2022*. <https://www.iea.org/reports/latin-america-energy-outlook-2023/executive-summary> [Consulta: 22 de abril de 2024].
- [5] United Nations Climate Change. *Qué es la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático*. <https://unfccc.int/es/process-and-meetings/que-es-la-convencion-marco-de-las-naciones-unidas-sobre-el-cambio-climatico#:~:text=La%20Convenci%C3%B3n%20reconoce%20la%20vulnerabilidad,para%20hacerlo%20por%20s%C3%AD%20mismos> [Consulta: 22 de abril de 2024].
- [6] Parlamento Europeo (2024). *La UE y el acuerdo de París: hacia la neutralidad climática*. <https://www.Europarl.Europa.Eu/Topics/Es/Article/20191115STO66603/La-Ue-y-El-Acuerdo-de-Paris-Hacia-La-Neutralidad-Climatica> [Consulta: 22 de abril de 2024].
- [7] Comisión Europea. *El Pacto Verde Europeo*. [https://Commission.Europa.Eu/Strategy-and-Policy/Priorities-2019-2024/European-Green-Deal\\_es](https://Commission.Europa.Eu/Strategy-and-Policy/Priorities-2019-2024/European-Green-Deal_es) [Consulta: 22 de abril de 2024].
- [8] Ministerio para la transición ecológica (MITECO), *La Unión Europea en la lucha contra el cambio climático*. <https://www.Miteco.Gob.Es/Es/Cambio-Climatico/Temas/El-Proceso-Internacional-de-Lucha-Contra-El-Cambio-Climatico/La-Union-Europea.Html> [Consulta: 22 de abril de 2024].
- [9] Comisión Europea. *Industrial carbon management*, [https://Energy.Ec.Europa.Eu/Topics/Carbon-Management-and-Fossil-Fuels/Industrial-Carbon-Management\\_en](https://Energy.Ec.Europa.Eu/Topics/Carbon-Management-and-Fossil-Fuels/Industrial-Carbon-Management_en) [Consulta: 22 de abril de 2024].
- [10] International Energy Agency, About CCUS (2021). *Playing an important and diverse role in meeting global energy and climate goals*, <https://www.iea.org/Reports/about-Ccus> [Consulta: 22 de abril de 2024].
- [11] H.L. Drake, K. Küsel, C. Matthies, Acetogenic Prokaryotes, in: *The Prokaryotes*, Springer New York, New York, NY, 2006: pp. 354–420. [https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7\\_13](https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_13).
- [12] M. Drahokoupil, P. Patáková, Production of butyric acid at constant pH by a solventogenic strain of *Clostridium beijerinckii*, *Czech Journal of Food Sciences* 38 (2020) 185–191. <https://doi.org/10.17221/95/2020-CJFS>.

- [13] G. Diekert, G. Wohlfarth, Metabolism of homoacetogens, *Antonie Van Leeuwenhoek* 66 (1994) 209–221. <https://doi.org/10.1007/BF00871640>.
- [14] K. Arslan, B. Bayar, H. Nalakath Abubackar, M.C. Veiga, C. Kennes, Solventogenesis in *Clostridium aceticum* producing high concentrations of ethanol from syngas, *Bioresour Technol* 292 (2019) 121941. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121941>.
- [15] F. Min, M. Kopke, S. Dennis, Gas Fermentation for Commercial Biofuels Production, in: *Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques*, InTech, 2013. <https://doi.org/10.5772/52164>.
- [16] Q. Xia, J. Yang, L. Hu, H. Zhao, Y. Lu, Biotransforming CO<sub>2</sub> into valuable chemicals, *J Clean Prod* 434 (2024) 140185. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.140185>.
- [17] M. Straub, M. Demler, D. Weuster-Botz, P. Dürre, Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii*, *J Biotechnol* 178 (2014) 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.005>.
- [18] K. Arslan, T. Schoch, F. Höfele, S. Herrschaft, C. Oberlies, F. Bengelsdorf, M.C. Veiga, P. Dürre, C. Kennes, Engineering *Acetobacterium woodii* for the production of isopropanol and acetone from carbon dioxide and hydrogen, *Biotechnol J* 17 (2022). <https://doi.org/10.1002/biot.202100515>.
- [19] T.D. Allen, M.E. Caldwell, P.A. Lawson, R.L. Huhnke, R.S. Tanner, *Alkalibaculum bacchi* gen. nov., sp. nov., a CO-oxidizing, ethanol-producing acetogen isolated from livestock-impacted soil, *Int J Syst Evol Microbiol* 60 (2010) 2483–2489. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018507-0>.
- [20] A.J. Grethlein, R.M. Worden, M.K. Jain, R. Datta, Evidence for production of n-butanol from carbon monoxide by *Butyribacterium methylotrophicum*, *J Ferment Bioeng* 72 (1991) 58–60. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90147-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90147-9).
- [21] J. Wang, Y. Liao, J. Qin, C. Ma, Y. Jin, X. Wang, K. Chen, P. Ouyang, Increasing lysine level improved methanol assimilation toward butyric acid production in *Butyribacterium methylotrophicum*, *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 16 (2023) 10. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02263-w>.
- [22] K. Arslan, M.C. Veiga, C. Kennes, Autotrophic (C<sub>1</sub>-gas) versus heterotrophic (fructose) accumulation of acetic acid and ethanol in *Clostridium aceticum*, *Bioresour Technol* 337 (2021) 125485. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125485>.
- [23] R. Robles-Iglesias, C. Fernández-Blanco, J.-M. Nicaud, M.C. Veiga, C. Kennes, Unlocking the potential of one-carbon gases (CO<sub>2</sub>, CO) for concomitant bioproduction of  $\beta$ -carotene and lipids, *Ecotoxicol Environ Saf* 271 (2024) 115950. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.115950>.
- [24] F. Liew, A.M. Henstra, K. Winzer, M. Köpke, S.D. Simpson, N.P. Minton, Insights into CO<sub>2</sub> Fixation Pathway of *Clostridium autoethanogenum* by Targeted Mutagenesis, *MBio* 7 (2016). <https://doi.org/10.1128/mBio.00427-16>.
- [25] F. Lanzillo, S. Pisacane, M. Capilla, F. Raganati, M.E. Russo, P. Salatino, A. Marzocchella, Continuous H-B-E fermentation by *Clostridium carboxidivorans*: CO vs syngas, *N Biotechnol* 81 (2024) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2024.02.004>.
- [26] C. Cheng, W. Li, M. Lin, S.-T. Yang, Metabolic engineering of *Clostridium carboxidivorans* for enhanced ethanol and butanol production from syngas and glucose, *Bioresour Technol* 284 (2019) 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.145>.



- [27] Y. Liu, Z. Zhang, W. Jiang, Y. Gu, Protein acetylation-mediated cross regulation of acetic acid and ethanol synthesis in the gas-fermenting *Clostridium ljungdahlii*, *Journal of Biological Chemistry* 298 (2022) 101538. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101538>.
- [28] I. Lauer, G. Philipps, S. Jennewein, Metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* for the production of hexanol and butanol from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>, *Microb Cell Fact* 21 (2022) 85. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01802-8>.
- [29] S. Schulz, B. Molitor, L.T. Angenent, Acetate augmentation boosts the ethanol production rate and specificity by *Clostridium ljungdahlii* during gas fermentation with pure carbon monoxide, *Bioresour Technol* 369 (2023) 128387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128387>.
- [30] R. Robles-Iglesias, M.C. Veiga, C. Kennes, Sequential bioconversion of C1-gases (CO, CO<sub>2</sub>, syngas) into lipids, through the carboxylic acid platform, with *Clostridium aceticum* and *Rhodospiridium toruloides*, *J Environ Manage* 347 (2023) 119097. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119097>.
- [31] B. Bayar, M.C. Veiga, C. Kennes, Bioproduction of acetic acid from carbon dioxide as single substrate and zero valent iron (ZVI) by clostridia, *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization* 58 (2022) 101915. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2022.101915>.
- [32] Á. Fernández-Naveira, M.C. Veiga, C. Kennes, Selective anaerobic fermentation of syngas into either C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> organic acids or ethanol and higher alcohols, *Bioresour Technol* 280 (2019) 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.018>.
- [33] C. Fernández-Blanco, M.C. Veiga, C. Kennes, Efficient production of n-caproate from syngas by a co-culture of *Clostridium aceticum* and *Clostridium kluyveri*, *J Environ Manage* 302 (2022) 113992. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113992>.
- [34] R. Robles-Iglesias, J.-M. Nicaud, M.C. Veiga, C. Kennes, Integrated fermentative process for lipid and  $\beta$ -carotene production from acetogenic syngas fermentation using an engineered oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast, *Bioresour Technol* 389 (2023) 129815. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129815>.
- [35] P. Patakova, B. Branska, M. Vasylykivska, K. Jureckova, J. Musilova, I. Provaznik, K. Sedlar, Transcriptomic studies of solventogenic clostridia, *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, *Biotechnol Adv* 58 (2022) 107889. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107889>.
- [36] J. Bortolucci, A.C.B. Zani, P.F. de Gouvêa, T.M. Dinamarco, V. Reginatto, A non-solventogenic *Clostridium beijerinckii* strain lacking acetoacetate decarboxylase assimilates acetate and accumulates butyrate, *Biomass Bioenergy* 172 (2023) 106780. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106780>.
- [37] A. Mayer, T. Schädler, S. Trunz, T. Stelzer, D. Weuster-Botz, Carbon monoxide conversion with *Clostridium aceticum*, *Biotechnol Bioeng* 115 (2018) 2740–2750. <https://doi.org/10.1002/bit.26808>.
- [38] H. Kou, J. Zheng, G. Ye, Z. Qiao, K. Zhang, H. Luo, W. Zou, Optimization of *Clostridium beijerinckii* semi-solid fermentation of rape straw to produce butyric acid by genome analysis, *Bioresour Bioprocess* 11 (2024) 24. <https://doi.org/10.1186/s40643-024-00742-y>.