

OPTIMIZACION DE UN MEDIO DE CULTIVO INDUSTRIAL PARA LA FERMENTACIÓN ACETOBUTILICA (ABE)

INDUSTRIAL CULTURE MEDIA OPTIMIZATION FOR ACETROBUTILIC FERMENTATION

Montoya D¹, Sierra J, Silva E², Buitrago G¹, Ramos J³.

RESUMEN

En el presente trabajo se optimizó un medio de cultivo industrial para la fermentación acetobutilica (ABE) mediante la aplicación de diseño de experimentos. Se empleó una mutante espontánea resistente al butanol aislada de la cepa de *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732 la cual tolera una concentración de butanol de 2.5% v/v. La mutante produce 15.5 g/l de solventes totales que representan 30% más que la cepa silvestre. Para diseñar el medio se empleó como fuente de carbono, melazas de caña. Los nutrientes se calcularon de acuerdo con la máxima cantidad de biomasa obtenida en medio vegetativo (3.8 g/l en peso seco). Con el propósito de determinar los componentes del medio de cultivo que afectan significativamente la producción de solventes, se diseñó una matriz del método estadístico Plackell-Burman. La composición final del medio de cultivo se determinó mediante la aplicación del método EVOP-Simplex. La composición del medio optimizado por litro fue la siguiente: melaza 130 g, biotina 4.0 mg, PAB A 3.0 mg, KH₂PO₄ 1,8 g, extracto de levadura 3.0 g, solución de minerales 4 ml; pH 6.1 antes de esterilizar. Con este medio se obtuvo una concentración de 24.6 g /l de solventes totales. Esta concentración représena un incremento del 58,7% comparado con la producción de la cepa mutante, antes de optimizar el medio de cultivo.

Palabras claves: Fermentación, medios de cultivo, *Clostridium acetobutylicum*.

SUMMARY

The industrial culture media for butanol-ethanol-acetone fermentation (ABE) was optimized by experimental design. A butanol resistant mutant isolated from *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732 was used. This mutant produced 15.5 g/l of total solvents, 30% more than the wild strain solvent production. Mutant strain resists a concentration of 2,5% v/v meanwhile the type strain resists 1 % v/v butanol concentration. Molasses of sugar cane as carbon source were used. The molasses concentration was determined based on the necessary

glucose concentration for producing 15 g/l of butanol as limit product in the ABE fermentation. The nutrients were calculated in according lo literature reports and lo highest biomasse production on vegetative medium 3.8g/l. For determining which variables have significant effect on the total solvent production, the PLAKET-BURMAN method was used. The final concentrations of the culture medium were determined by EVOP-Simplex method. A liter of optimized industrial medium is composed by: molasses 130 g, biotin 4.0 mg, PAB A 3.0 mg, KH₂PO₄1.8 g, yeast extract 3.0 g, minerals stock 4 ml and distilled water lo complete 1 liter; pH 6.1 before sterilization. Using this medium the total solvents production was 24,6 g/l. The production increment is equivalent lo 58,7%, compared lo the mutant strain before the medium was optimized.

Keywords: Fermentation, culture media, *Clostridium acetobutylicum*.

INTRODUCCIÓN

El *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732 produce butanol, acetona y etanol en proporciones 6:3:1. En recientes estudios moleculares sobre *Clostridium* solventogénicos empleando técnicas de reasociación de DNA, esta cepa ha sido clasificada en el grupo del *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Johnson *et al.*, 1997). Los *Clostridium* sacarolíticos pueden duplicar su biomasa en tiempos de 30 a 40 minutos. Por la vía de la glicólisis los microorganismos anaeróbicos producen de 3,4 moles ATP por mol de glucosa fermentada(Jungermann *et al.*, 1973), mientras que los organismos aeróbicos producen de 25-30 moles de ATP. Debido al bajo rendimiento de ATP los

¹ Instituto de Biotecnología. Autor para correspondencia. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490. Santafé de Bogotá D.C. Colombia. Correo electrónico: domonto@ibun.unal.edu.co

² Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional.

³ Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional

Clostridium utilizan diferentes rutas anaeróbicas para generar mas energía. La producción de acetato como uno de los productos de fermentación es ventajosa para el microorganismo, porque le permite obtener ATP por fosforilación a nivel de sustrato.

En los países de occidente el butanol no se produce a escala industrial por fermentación ABE. Después de la segunda guerra mundial, la cepa de Weizmann (*Clostridium acetobutylicum*) produjo rendimientos de solventes totales de 28-30%: cuando emplearon como fuente de carbono almidón de maíz, pero los resultados fueron pobres cuando se emplearon melazas como fuente de carbono (Jones y Keis, 1995). A pesar de los desarrollos en conocimientos básicos en genética y fisiología de las cepas productoras de estos solventes, las posibilidades de incrementar la producción de butanol no han sido aun aplicables a escala industrial (Blaschek y White, 1995). Se estima que el consumo mundial de butanol se incrementa en un 4% anual; países como Estados Unidos se han propuesto para el año 2005 obtener al menos el 60% del butanol por fermentación, a partir de maíz.

La rentabilidad de la fermentación ABE está ligada a dos variables fundamentales, la obtención de una cepa que sea hiperproductora de solventes y la reducción de los costos del medio de cultivo. En esta fermentación uno de los mayores costos es la fuente de carbono, que representa el 50% de la economía del proceso (Linden *et al.*, 1986). Para obtener un medio de cultivo industrial, se requiere que los componentes del mismo sean económicos y los rendimientos de productos se incrementen. En este trabajo desarrollamos la aplicación consecutiva de dos métodos estadísticos para optimizar el medio de cultivo industrial. Esta metodología podría ser implementada en otro tipo de fermentaciones por lotes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo, medio y condiciones de cultivo: Se empleó una mutante espontánea resistente a butanol, aislada del *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732 (Sierra *et al.*, 1996) previamente preservada en esporas a 4°C. La activación del microorganismo se realizó en frascos que contenían 15 ml de medio de cultivo vegetativo, previamente gaseado con CO₂, esterilizados a 121 °C, tapados con tapón de caucho y sellados con agrafe de aluminio. Los viales se sometieron a choque térmico a 80 °C, durante 90 segundos, se transfirieron a un baño de hielo y se incubaron a 37°C durante 36 horas. Un ml del preinoculo se inoculó en un vial de 50 ml. de medio de cultivo vegetativo, se incubaron durante 36 horas a 37 °C. Las fermentaciones se llevaron a cabo en viales con 50 ml de volumen real de trabajo. El volumen del inoculo fue de 10% v/v, con una densidad óptica (D.O.) de 1.3. La temperatura de incubación fue de 37°C y el tiempo para

cada ensayo fueron 150 horas, sin agitación. La composición del medio vegetativo por litro fue la siguiente: melaza 20 g, triptona 1.0 g, peptona 10 g, extracto de levadura industrial 5 g, Na₂SO₄ 0.2 g, KH₂PO₄ 3.5 g, PABA 0.01 g, cisteína clorhidrato 0.5 g, biotina, solución de minerales 1.0 ml y agua destilada en cantidad suficiente para (c.s.p.) 1 litro; pH antes de esterilizar 6.1.

Determinación de parámetros cinéticos:

La biomasa se determinó por el peso seco celular (Pirt, 1975). Los azúcares residuales se evaluaron por el método de la glucosa oxidasa (MERCK). Los solventes se determinaron empleando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 3b, acoplado a una estación de datos 3600, detector FID y una columna de acero inoxidable de 2 m de longitud con 2 mm de diámetro interno, empacada con 10% de Carbowax 30M en 80/100 de teflón. La temperatura del inyector fue de 150°C, la del detector de 180°C, la de la columna varió de 60 a 130°C con una tasa de incremento de 30°C/min y la del muestreador de volátiles de 50°C. En un vial se colocan 2 ml de muestra y 1 ml de patrón interno n-propanol (Sierra y Acosta, 1987).

Criterios para diseñar la matriz Plackett Burman (Placketty Burman, 1946).

La mutante se creció en medio vegetativo para determinar la máxima concentración de biomasa en peso seco. La fuente de carbono empleada fue melaza de caña cuya concentración se mantuvo constante para todos los experimentos, calculada con base en la concentración de glucosa necesaria para obtener 3.8 g/l de biomasa y 15 g/l de butanol. Este dato fue definido suponiendo una producción total de solventes de 25 g/l y como se conoce la relación de los productos de la fermentación (6 de butanol, 3 de acetona y 1 de etanol) se esperaría una concentración de butanol de 15 g/l.

La cantidad total de glucosa se estimó en 77 g/l. La melaza empleada contenía 59.1 g/l de glucosa según análisis realizado por glucosa oxidasa, por lo tanto, la cantidad de melaza requerida fue de 130 g/l. Los intervalos de las concentraciones (en cuales se emplearon las fuentes de nitrógeno orgánica e inorgánica, los aminoácidos esenciales y los factores de crecimiento) se calcularon de acuerdo con la concentración de biomasa esperada y los datos de la literatura. Los niveles de concentración de los componentes del medio de cultivo empleados para la matriz fueron los siguientes: melaza 130 g/l; como fuente de nitrógeno orgánico se usó extracto de levadura 3.0 -10 g/l; como fuente de nitrógeno inorgánico (NH₄)₂SO₄ 2.0 - 8.0 g/l; los aminoácidos esenciales, cisteína clorhidrato 1 - 10 mg/l, tirosina 0.5 -1.0 mg/l y valina 0.1 -1,0 mg/l. Los niveles de concentración de los factores de crecimiento fueron: biotina 0.05 -1.0 mg/l y de PABA (ácido para amino benzoico) 1.0 - 4.0 mg/l. La concentración de fuente de minerales fue: KH₂PO₄ 0.5 -2.0 g/l; solución de minerales

Tabla 1. Matriz de trabajo Plaket - Burman.

ENSAYO	PA y B	Tir-Cis	Val	FNI	FM	EL	pH
1	aBPA	aTCI	aTR1	bFN1	aFM1	bEL1	4.5
2	aB	aT	bTR1	aFN1	bFM1	bEL2	5.8
3	aPA	bTCI	aTR2	bFN2	bFM2	aEL2	6.0
4	bPA	aCI	bTR2	bFN3	aFM2	aEL2	6.4
5	aBPA	bT	bTR3	aFN2	aFM3	aEL3	4.8
6	bB	bCI	aTR3	aFN3	aFM3	bEL3	6.8
7	bPA	aTCI	aTR4	aFN4	bFM3	aEL4	5.1
8	bBPA	bTCI	bTR4	bFN4	bFM4	bEL4	5.5

a niveles altos, b niveles bajos, las variables están definidas como:
 • Factores de crecimiento: Biotina (B) y Acido Para Amino Benzoico (PA).
 • Aminoácidos de control o variables asignables: Tirosina (Tir) y Cisteína (Cis).

- Aminoácido esencial: Valina (Val).
- Fuente de Nitrógeno Inorgánico: (NH₄)₂SO₄ (FNI).
- Fuente de Nitrógeno Orgánico: Extracto de levadura (EL).
- Fuente de Minerales: KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, FeCl₃, CoCl₂·6H₂O (FM).
- pH.

(Fe SO₄.1 .0 - 1 .8g/l; CoCl₂.0.2 - 1,0 mg/l, CaCl₂ 1.0 - 2.5g/l, MgSO₄.1.0 -1 .8 mg/l), 0,1 - 0,5 ml y agua destilada c.s.p. un litro, el pH antes de esterilizar 6.5.

Para la aplicación del método Plackett-Burman se conformó una matriz que combinó cuatro niveles altos y cuatro bajos dentro de los niveles de concentración, tomando como variables asignables o de control las concentraciones totales de tirosina y cisteína (tabla 1) en valores que no tienen efecto sobre la producción de solventes. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado. Con esta información se determinó el efecto de cada variable (E_v) sobre la producción de solventes para determinar cuales de estas influyen significativamente en el proceso. Se determinó la significancia del efecto comparando el valor absoluto del t-student t_o con el t_i Entonces, S It_o³ t_i indica la aceptación de la hipótesis nula. Los resultados se presentan en la tabla 3 a partir de los siguientes cálculos.

$$E_v = \left(\sum \frac{aR}{n} \right) - \left(\sum \frac{bR}{n} \right)$$

$\sum \frac{aR}{n}$: Respuesta promedio en los niveles altos de cada variable

$\sum \frac{bR}{n}$: Respuesta promedio en los niveles bajos de cada variable

n: Número de corridas

La hipótesis nula será: «No hay efecto de la variable independiente (factor) sobre la respuesta (producción de solventes)». Como criterio de prueba fue estimado el estadístico t-student (t_i).

$$t_o = \frac{E_v}{(S.E.eff_v)} \quad V_{eff_v} = \sum \frac{(Ed)^2}{n}$$

$$S.E.eff_v = (V_{eff_v})^{\frac{1}{2}} = 0.13$$

t_o: valor calculado del estadístico de prueba.

S.E. eff_v: error standard del efecto de cada una de las variables,

V eff_v: varianza de un efecto,

Ed: efecto de las variables asignadas (tirosina y cisteína).

Criterios para el diseño de los experimentos por el método EVOP-Simplex (Box, 1957).

Con los resultados obtenidos en la matriz, se diseñaron los experimentos EVOP-Simplex para determinar las concentraciones óptimas de cada uno de los componentes que tienen mayor influencia sobre la producción de

Tabla 2. Producción de solventes totales (g/100 ml) del arreglo propuesto en la Tabla 1.

Factor	Biotina PABA	Tirosina Cisteína	Valina	(NH ₄) ₂ SO ₄	Solución de minerales	Extracto de levadura	pH
	1	2	3	4	5	6	7
1	0.71	0.27	0.01	0.06	0.26	1.62	0.01
2	0.34	0.77	0.01	0.47	0.12	0.50	0.45
3	1.13	0.98	0.29	0.07	0.01	0.03	0.34
4	0.25	1.27	0.34	0.11	0.13	0.10	0.09
5	1.28	0.53	0.01	0.63	1.84	1.67	0.06
6	2.39	0.17	0.02	0.23	0.07	1.87	0.01
7	0.15	0.10	0.62	0.52	0.14	0.12	0.06
8	1.90	0.16	0.00	0.05	0.04	1.57	0.05

Cada valor corresponde al promedio de cuatro repeticiones por cada experimento.

Tabla 3. Efectos de las variables sobre la fermentación ABE.

VARIABLE	EFFECTO E.	t-Test t	$\alpha \leq 0.05$
Biotina	-0.73	-5.64	*
PABA	-0.42	-3.20	*
Tirosina	-0.19	-1.44	NS
Cisteína	-0.02	-0.18	NS
Valina	0.09	0.67	NS
$(NH_4)_2SO_4$	0.28	2.16	NS
KH_2PO_4	0.499	3.76	*
Solución de Minerales	0.50	3.82	*
Ext. De Levadura	-0.89	-6.84	*
pH	-0.43	-3.30	*

* Si afecta la variable correspondiente.
NS no afecta la variable correspondiente.

solventes. Se evaluaron siete variables con dos niveles: alto y bajo, dentro de los niveles preestablecidos y asociados a las variables de optimización, las cuales se seleccionaron en el diseño anterior (tabla 1). La primera matriz del primer simplex (o primer ciclo), se presenta en la tabla 4. El primer ensayo del primer ciclo tuvo los niveles altos; en el segundo ensayo se trabajó con el nivel mas bajo del primer factor y se replicaron los niveles altos en los otros niveles; en el tercer ensayo se trabajó con el nivel medio en el primer factor, el nivel bajo en el segundo y se replicaron los niveles altos en los otros factores; en el cuarto ensayo se trabajó con los niveles intermedios del primer y del segundo factor, el nivel mas bajo del tercero y la replicaron los demás. Se continuo de la misma forma hasta completar los siete ensayos.

Se corrieron las fermentaciones por triplicado determinando la producción de solventes, se descartó el ensayo con la respuesta más baja. En el caso del Simplex

1 en el ensayo 4 se obtuvo la respuesta más baja (17.43 g/l de solventes totales), como se observa en la Tabla 5. Para diseñar el segundo ciclo o Simplex se calculó el ensayo que va a reemplazar al que ha sido descartado como se muestra a continuación.

Para calcular el nuevo ciclo del Evop-Simplex:

$$\text{Nuevo ensayo} = 2X - \text{DES}_n \quad X = \text{SRET}/n$$

RET: el nivel retenido,

n: el número de niveles retenidos,

X: promedio de los niveles retenidos,

DES_n: nivel descartado o nivel control para el que se obtuvo la más baja respuesta.

Se repite el mismo procedimiento para diseñar los 7 ciclos o Simplex. Como resultado de este último ciclo se obtiene la composición final del medio de cultivo industrial.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Tabla 4. Diseño del primer Simplex(Primer ciclo). Cada ciclo consta de siete ensayos realizados por triplicado

Ensayo	Biotina	PABA	KH_2PO_4	Fuente minerales	Ext. de levadura	pH	Respuesta solv. totales g/l
1	0.5	0.4	200	0.5	500	6.4	24.59
2	0.3	0.4	200	0.5	500	6.4	20.44
3	0.4	0.2	200	0.5	500	6.4	19.09
4	0.4	0.3	160	0.5	500	6.4	17.43
5	0.4	0.3	180	0.1	500	6.4	22.74
6	0.4	0.3	180	0.3	300	6.4	21.27
7	0.4	0.3	180	0.3	400	5.8	23.90
Σ RET	2.4	1.9	1140	2.2	2700	37.8	
2 X	0.8	0.633	380	0.73	900	12.6	
DES	0.4	0.3	160	0.5	500	6.4	
2X - DES	0.4	0.33	220	0.23	400	6.2	

Las concentraciones están dadas en mg/100 ml y la solución de minerales en ml

Optimización del medio de cultivo: La optimización del medio y el mejoramiento de la cepa son dos factores fundamentales para incrementar tanto el rendimiento como la productividad en un proceso de fermentación. Mediante el método Plackett Burman se evaluaron siete variables en ocho experimentos. La estructura de un diseño factorial fraccionado permitió identificar las variables independientes que afectan significativamente la producción de solventes totales y además el rango en el cual se deben emplear estas variables. En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos por la aplicación de la matriz del método Plackett Burman, identificando las variables que afectan significativamente la producción de solventes totales de la fermentación ABE (tabla 3) y los niveles de concentración de cada uno de los componentes sobre la producción de solventes totales (tabla 5).

Tabla 5. Variables que afectan la fermentación ABE y niveles altos y bajos de los nutrientes.

VARIABLE	Niveles de contenido para 100ml de medio
Biotina	0.3 – 0.5 mg
PABA	0.2 – 0.4 mg
KH_2PO_4	160.0 – 200.0 mg
Extracto de Levadura	300.0 – 500.0 mg
Fuente de minerales	0.1 – 0.4 ml
pH	5.8 – 6.4

Valores obtenidos para las variables aplicando el método estadístico Plackett Burman.

El EVOP Simplex permitió explorar una superficie de respuesta de una manera secuencial con el propósito de localizar un punto máximo en la misma. Esta es una aplicación de conceptos de la metodología de superficies de respuesta al problema de mejorar el rendimiento de

procesos industriales. En la Tabla No.4 se presentan los resultados finales de la aplicación del séptimo y último Simplex, el cual nos indica la composición final del medio de cultivo, cuyos valores por litro resultaron ser: melaza 130 g, biotina 4.0 mg, PABA 3.0 mg, KH_2PO_4 1.8 g, extracto de Levadura 3.0 g, solución de minerales 4 ml y agua destilada c.s.p. 1 litro; pH 6.1 antes de esterilizar el medio. En el medio de cultivo optimizado se obtuvo una producción de 24,6 g/l de solventes totales, que presenta un incremento equivalente al 58,7% con respecto a la producción de solventes totales de la misma mutante en el medio de cultivo no optimizado.

En otro trabajo se recomienda suplementar de la melaza con fosfatos (KH_2PO_4) entre 0.05 y 0.2% (Walton y Martín, 1979), en nuestro caso el porcentaje de fosfatos es de 0.18% (1.8 g/l). Recientes estudios en cultivo continuo sugieren que bajos niveles de ATP y altos niveles de la relación NADH/ NAD in vivo, mejoran la producción de butano! (Girbal y Soucaille, 1995). Las fuentes orgánicas de nitrógeno, peptona y extracto de levadura inducen mayor producción de solventes, los niveles recomendados para estas fuentes se encuentran entre 3 y 4 g/l (Abou-Zeid *et al.*, 1976; Monot *et al.*, 1982). Estos resultados coinciden con lo propuesto en este trabajo (3g/l de extracto de levadura).

Durante la optimización del medio se encontró que el sulfato de amonio no afectaba significativamente la producción de solventes, resultado que no coincide con otros estudios en los cuales se afirma que, para obtener una alta producción de solventes se requiere el suministro de sulfato de amonio en concentraciones de 4 a 6% (Walton y Martín, 1979; Monot *et al.*, 1982). En los experimentos ya citados, se empleó glucosa como fuente de carbono. Fermentaciones realizadas en nuestro laboratorio indican que la acidificación del medio ocurre a una mayor velocidad cuando se emplea glucosa como fuente de carbono, comparando con el empleo de melazas (resultados no publicados). Es probable que los resultados estén influenciados por la fuente de carbono, por esta razón,

Tabla 6. Siete ensayos del séptimo y último ciclo del EVOP- Simplex (SIMPLEX 7).

Ensayo	Biotina	PABA	KH_2PO_4	Fuente minerales	Ext. de levadura	pH	Respuesta solventes. totales g/l
1	0.5	0.4	20	0.5	500	6.4	24.59
2	0.4	0.3	18	0.1	500	6.4	22.74
3	0.4	0.3	18	0.3	400	5.8	23.87
4	0.4	0.33	22	0.23	400	6.2	23.54
5	0.4	0.20	200	0.50	500	6.4	23.14
6	0.4	0.30	180	0.28	300	6.4	21.74
7	0.4	0.31	207	0.25	566	6.4	21.61
ΣRET	2.4	1.83	1160	1.92	2600	37.6	
2 X	0.8	0.61	387	0.64	867	12.5	
DES	0.4	0.31	207	0.25	566	6.4	
2X - DES	0.4	0.30	180	0.39	301	6.1	24.62

Las concentraciones están dadas en mg/100 ml y la solución de minerales en ml. Las fermentaciones se realizaron en las condiciones descritas en materiales y métodos.

el sulfato de amonio no sería empleado como nutriente, sino que contribuiría a neutralizar el exceso de ácido para mantener un pH adecuado. Como se puede observar en el proceso de optimización, el pH es un factor que influye significativamente en la producción de solventes totales. Para las condiciones de este trabajo el pH óptimo antes de esterilizar es de 6.1.

Para los factores de crecimiento y vitaminas, los niveles que se encontraron en el medio industrial (4 mg/l de PABA y 3 mg/l de biotina) son mayores a los reportados por literatura; así mismo, el consumo del sustrato disponible fue del 100% y el rendimiento de sustrato en solventes fue de 0.41, valores superiores a los reportados para este proceso en los que los máximos niveles de solventes están entre 18 y 20 g/l y los rendimientos entre 0.25 y 0.36 con un porcentaje de sustrato residual cercano al 20%, utilizando melazas como sustrato (Abou-Zeid *et al.*, 1976; Girbal y Soucaille, 1995).

CONCLUSIONES

Se demostró que el diseño experimental propuesto para diseñar medios de cultivo para la fermentación ABE, incrementó la producción de solventes totales en un 58.7%. Los criterios definidos para calcular las concentraciones de la fuente de carbono y de los demás nutrientes del medio, fueron apropiados. Estos se establecieron y calcularon con base en el conocimiento de la ruta metabólica y la determinación experimental de la máxima producción de biomasa en medio vegetativo. Definida la concentración de la fuente de carbono se establecieron las concentraciones de los macro y micro elementos. Es importante destacar que esta metodología es apropiada para definir las variables determinantes y sus valores, tanto nutricionales como medioambientales, para estudiar otros modelos de fermentación por lotes.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a COLCIENCIAS el soporte financiero brindado al proyecto, sin el cual no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Jones, D.T., S. Keis, 1995. Origins and relationships of industrial solvent-producing clostridia strains. *FEMS Microbiology Reviews*. 17: 223-232.
- Blaschek, H.P., White, B.A., 1995. Genetic systems development in clostridia. *FEMS Microbiology Reviews*. 17: 349-356.
- Johnson, J.L., Toth, J., Santiwatanakul, S. y Chen, J.S. 1997. Cultures of "*Clostridium acetobutylicum*", *Clostridium beijerinckii*, and two other distinct types based on DNA-DNA reassociation. *International journal of Systematic Bacteriology*. 47:420-424.
- Jungermann, K., Thauer, R.K., Leimenstoll, G., y Decker, K. 1973. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic Clostridia. *Biochim. Biophys. Acta* 303:268-280
- Linden, A. R. Moreira y G. Lenz. 1986. *Comprehensive Biotechnology. The Principles of Biotechnology: Engineering Consideration*. C. L. Conney and A. E. Humprey Edits. Pp. 915-931.
- Sierra, J., Acosta, R., Montoya, D., Buitrago, G., y Silva E. 1996. Obtención de mutantes espontáneas de *Clostridium acetobutylicum* resistentes a butanol. *Revista Colombiana de Ciencia Farmacéuticas*. 25 :26-35.
- Pirt, S.J. 1975. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Eds. John Wiley and Sons, Inc. New York. Pags 4-15.
- Sierra, J. y Acosta R. 1987 "Optimización de un medio de cultivo industrial para la fermentación acetobutílica". Tesis de grado. departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional.
- Plackett, R.L., y Burman, J.P. 1946. The design of optimum multifactor experiments. *Biometrika*, 33: 305-25.
- Box, G.E.P. 1957. Evolutionary operation: A methods for increasing industrial productivity. *Appl Stat.* 6(2): 323.
- Walton y J. L. Martin. 1979. Production of acetone butanol by fermentation. *Technology*. J. Peppler and D. Perlman. Edits. 2nd. Edit.. Volumen 1. Pp. 187-209.
- Girbal, L., y Soucaille, P. 1995. Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism revealed by mixed-substrate steady-state continuous culture: role of NADH/NAD ratio and ATP pool, *Journal Bacteriology* 1994, 176:6433-6438.
- Abou-Zeid, M., Fouad y M. Yassein. 1976. Fermentative production of acetone-butanol by *Clostridium acetobutylicum* *Indian Journal of Experimental Biology*. 14:740-741.
- Monot, J. R., Martin, H., Petitdemange y Gay R. 1982. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in synthetic médium. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(6): 1318-1324.