

## Producción Microbiológica de Butanol

Etienne Rajchenberg-Ceceña, José Alberto Rodríguez-Ruiz, Katy Juárez López, Alfredo Martínez Jiménez\*, Sandra Morales Arrieta\*

*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 510-3 Cuernavaca, Mor, 62250*  
alfredo@ibt.unam.mx; sandy@ibt.unam.mx

### RESUMEN

Durante los últimos 30 años la producción de bio-etanol como combustible renovable se ha incrementado de forma considerable. A pesar de que actualmente varios países generan y utilizan cantidades importantes de etanol en el sector transporte, éste alcohol dista de ser el reemplazo ideal para la gasolina pues posee un menor contenido energético que la gasolina y es higroscópico. Recientemente, ha aumentado el interés en el uso de butanol como un complemento o sustituto de gasolina, pues posee varias características que lo hacen superior al etanol como carburante. Tanto *Clostridium acetobutylicum* como *Escherichia coli* han demostrado ser bacterias útiles en la biosíntesis de butanol, y es por eso que con éstas se han realizado esfuerzos para mejorar su producción empleando diversas estrategias de cultivo y modificaciones genéticas. A pesar de que actualmente los rendimientos y productividades obtenidos mediante estas aproximaciones son relativamente bajos y quedan grandes retos por superar, la producción microbiana de butanol es un proceso prometedor. En este trabajo se revisa la viabilidad en la producción microbiológica de butanol como una fuente alterna a los combustibles líquidos fósiles.

**Palabras clave:** Biocombustibles, butanol, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*

### ABSTRACT

Bio-ethanol production as a renewable fuel has increased during the last 30 years. In spite that many countries generate and use important amounts of ethanol in the transportation sector, this alcohol is not an ideal replacement for gasoline because it is hygroscopic and has lower energy content than the gasoline. Recently, the interest of using butanol as a gasoline substitute had increased because it has several features that make it better than ethanol like a fuel. Either *Clostridium acetobutylicum* or *Escherichia coli* had proved to be useful in butanol biosynthesis, and many efforts to improve production, using fermentation and genetic engineering strategies, are being carried out. Despite that actual yields and productivities are relatively low and that there are many challenges to overcome, butanol production using microorganisms is a promising process. In this work a review related to the microbiological production of butanol, as an alternative of liquid fossil fuels is presented.

**Key words:** Biofuels, butanol, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el consumo de energía se ha incrementado en el último siglo, ocasionado principalmente por el crecimiento de la población y por la industrialización de muchas ciudades. Aunado a esto, la crisis ecológica inminente, de forma relevante y global ya observable en el calentamiento del planeta, debida sobre todo al alto consumo de petróleo como energético principal, obliga al replanteamiento urgente de estructuras alternativas tanto industriales como económicas viables para sustituir, o por lo menos disminuir, el uso de éste combustible fósil y sus derivados. Varios países han enfocado e intensificado sus esfuerzos en desarrollar programas de investigación en biocombustibles los cuales puedan proveer combustibles líquidos útiles para la transportación (Himmel *et al.*, 2007). Aunque el uso de microorganismos para la producción de combustibles ha existido desde hace un siglo, resurge en esta coyuntura con mucho mayor vigor y como una promesa factible para el futuro de dichos productos. En el presente trabajo, se discuten las ventajas que tiene el butanol sobre el etanol como carburante, y se revisa la producción microbiológica de butanol usando microorganismos silvestre y modificados genéticamente.

## GENERALIDADES DEL BUTANOL

El butanol (alcohol butílico o 1-butanol) es un alcohol primario constituido por 4 carbonos cuya fórmula es  $C_4H_{10}O$ ; es un líquido incoloro, flamable, con un olor

característico, su vapor irrita las membranas mucosas produciendo un efecto narcótico a altas concentraciones. El butanol es miscible en solventes orgánicos comunes y parcialmente miscible en agua (Lee *et al.*, 2008).

Hasta hoy, el butanol es considerado una mejor alternativa que el etanol como biocombustible ya que es menos corrosivo y menos soluble en agua que el etanol, siendo un combustible mas adecuado para las máquinas de combustión interna utilizadas actualmente en los automóviles (Keasling *et al.*, 2008).

Aunque el primer reporte que existe en la literatura sobre la producción biológica del 1-butanol fue escrito por Louis Pasteur en 1862, es hasta 1915 con la patente de Chaim Weizmann donde se describe una idea clara del proceso de fermentación butílica. Apenas 35 años después, en 1950, el 66% del butanol utilizado en el mundo provenía de procesos fermentativos. En años posteriores la industria petroquímica tomaría casi la totalidad del mercado del butanol produciéndolo industrialmente mediante la reacción oxo del propileno, con el intermediario butiraldehído.

La producción biológica del butanol ocurre naturalmente en algunas especies de microorganismos, como las bacterias *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium butyricum* o la arquea *Hyperthermus butylicus*. Sin embargo, el género más estudiado es el de *Clostridium* ya que son capaces de convertir diversas fuentes de carbono, como la glucosa,

galactosa, celobiosa, manosa, xilosa y arabinosa, en combustibles y químicos como el butanol, acetona y etanol (Ezeji *et al.*, 2007). Sin embargo, la presencia de butanol, así como la acetona y etanol en los microorganismos resulta ser tóxica, lo cual limita su concentración en el medio de cultivo, originando bajos rendimientos y un alto costo durante su recuperación en las soluciones diluidas. En el caso de *Clostridium* su metabolismo se detiene cuando la presencia de solventes alcanza una concentración de 20 g/L, lo cual limita la concentración de fuentes de carbono que pueden ser utilizados en la fermentación, ocasionando una baja productividad y baja concentración de productos. Concentraciones de alrededor de 0.1 M de butanol generan un 50% de inhibición del crecimiento celular y consumo de azúcares. El butanol es más tóxico que otros solventes, ya que éste desestabiliza la membrana e interrumpe funciones asociadas a la membrana, tales como procesos de transporte, incluyendo el transporte de azúcares, entre otras (Lee *et al.*, 2008).

Antes de la primera mitad del siglo 20, la fermentación ABE (acetona-butanol-etanol) fue uno de los primeros procesos biológicos que produjo solventes, usando *Clostridium* como microorganismo solventogénico. Inicialmente, el interés estaba centrado en la producción de acetona, ya que era utilizada en la producción de un tipo de pólvora sin humo. Posteriormente, el interés se movió hacia el butanol, ya que éste era empleado como disolvente de laca de secado rápido para el recubrimiento de los automóviles.

Entre los años 1950-1960, el proceso de fermentación ABE cesó en plantas industriales de Europa y Norteamérica debido a la competencia y menores costos de producción de acetona y butanol mediante procesos petroquímicos. En años recientes y en ciertos países como China, ha resurgido el interés en la producción fermentativa ABE como una alternativa al uso de combustibles fósiles (Ni & Sun, 2009).

Desde hace una década, varios investigadores han tratado de desarrollar cepas hiperproductoras de butanol, apoyándose con las herramientas de biología molecular, ingeniería de vías metabólicas, así como en la optimización del proceso de fermentación mediante la producción y extracción simultánea de butanol.

## *Propiedades importantes del butanol como carburante*

El interés en el biobutanol se ha incrementado a pesar del uso actual del etanol como combustible en el sector transporte. La razón para buscar alternativas al etanol se deben principalmente a que éste tiene un contenido energético bajo, tiene una alta presión de vapor lo cual ocasiona que se evapore fácilmente, es higroscópico y por tanto no puede ser transportado en las tuberías ni en los contenedores existentes en la industria petroquímica ya que tiende a atrapar agua, además su destilación es costosa. Si el etanol atrapa agua del ambiente se provocan problemas en las mezclas de gasolina-etanol ocasionando una separación de fases y en el proceso de

combustión en el motor (Steen *et al.*, 2008). Por su parte el biobutanol, su contenido energético es muy similar al de la gasolina (Tabla 1) y su presión de vapor es 11 veces menor que la del etanol (Atsumi *et al.*, 2008).

La capacidad higroscópica de un combustible es de particular importancia, la tendencia del etanol a mezclarse con el agua ambiental hace imposible que éste sea agregado al combustible con mucha

anterioridad a su uso. Por esto, el etanol debe ser transportado de forma independiente, implicando un costo adicional. En el caso del butanol al ser menos higroscópico y presentar una mayor compatibilidad con la gasolina, hace posible que el butanol sea adicionado a las gasolinas desde la refinera.

**Tabla 1.** Comparación de propiedades relevantes del butanol y etanol como carburantes, (Lee *et al.*, 2008).

	Butanol	Gasolina	Etanol
Densidad de energía (MJ/L)	29.2	32	19.6
Proporción aire-combustible	11.2	14.6	9
Calor de vaporización (MJ/Kg)	0.43	0.36	0.92
Número de octanos en investigación	96	91-96	129
Número de octanos en motor	78	81-89	102

La Tabla 1 muestra un resumen comparativo de las propiedades del butanol, etanol y la gasolina. Esto indica que los motores de gasolina pueden funcionar indistintamente con butanol sin requerirse una modificación previa, como sucede en el caso del etanol. En este punto radica una de las mayores ventajas técnicas y económicas del butanol como biocombustible. Aunque el butanol tiene un número de octano de investigación y en motor considerablemente menor que el del etanol, sus valores son similares a los de la gasolina, por tanto esta característica no representa una desventaja para ser usado en mezclas con gasolina, aún a elevadas concentraciones de butanol.

## PRODUCCIÓN DE BUTANOL CON *Clostridium*

Las cepas más usadas para la fermentación industrial ABE son principalmente del género *Clostridium*: *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum* y *Clostridium saccharobutylacetonicum*. Las especies de *acetobutylicum* y *beijerinckii* son adecuadas para la fermentación acetona-butanol a partir de maíz mientras que las *saccharobutylicum* y *saccharobutylacetonicum* utilizan melaza como sustrato (Ni & Sun, 2009).

Como se mencionó anteriormente, *C. acetobutylicum* es la especie más estudiada la secuencia completa de su genoma fue liberada en el 2001. Es una especie

anaeróbica obligada, con forma de bastón, que posee un cromosoma de 3.94 Mbp y un plásmido de 192 Kbp. En cepas silvestres éste plásmido resulta indispensable para la solventogénesis (Lee *et al.*, 2008). *C. acetobutylicum* tiene la ventaja de ser muy diverso en los sustratos que metaboliza; utilizando glucosa, galactosa, celobiosa, manosa, xilosa y arabinosa. Además, es también diversa la batería de enzimas que libera al medio, incluyendo:  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas,  $\alpha$  y  $\beta$ -glucosidasas, pululanasa, amilopululanasa, entre otras.

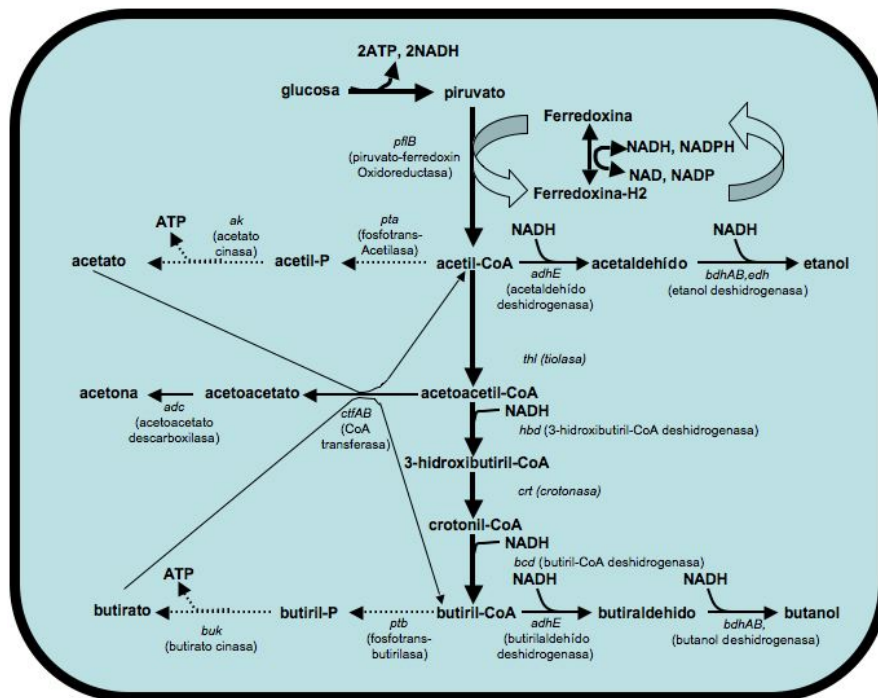
Para llevar a cabo la ingeniería metabólica exitosa de *Clostridium* es necesario contar con herramientas de ingeniería genética eficientes para la manipulación de genes y recientemente se están desarrollando metodologías para este propósito. Aunque se conoce la secuencia completa de *Clostridium*, recientemente, uno de los problemas que se suscitó fue que la introducción de genes resultaba limitante, debido a un sistema de restricción intrínseco en todas las especies de *Clostridium*, la cual reconoce segmentos palindrómicos 5'-GCNGC-3', y que inactiva la mayoría de las secuencias transferidas de otras especies (Lee *et al.*, 2008). La solución (parcial) a este problema se dió a partir de la construcción de un vector de transferencia de *Bacillus subtilis* reportado por Mermelstein *et al.* (1993), que permite expresar genes exógenos con niveles elevados, tales como los de la vía de síntesis de acetona.

Una vez que los azúcares son metabolizados a piruvato, la fermentación a butanol en *Clostridium* es catalizada por

diversas enzimas: una acetato/butirato CoA transferasa, varias deshidrogenasas y una acetato descarboxilasa, como se muestra en el flujo general de la Fig. 1. Los genes que codifican para estas enzimas se encuentran agrupados en operones activados por sustrato. Además, análisis genómicos de *C. acetobutylicum* han demostrado que posee 11 genes para la formación de celulasas, dispuestos de forma similar que en especies celulolíticas, como *Clostridium cellulolyticum* y aunque *C. acetobutylicum* no hidroliza celulosa, la hacen un blanco interesante para la ingeniería metabólica y poder desarrollar un microorganismo que pueda hidrolizar, al menos parcialmente celulosa, para utilizar directamente lignocelulosa como materia prima para la producción de butanol.

Durante el proceso de producción de butanol con *Clostridium* se presenta, entre otros, un cambio fisiológico importante en la bacteria: los ácidos acético y butírico son liberados al medio durante la fase de crecimiento exponencial los cuales son reabsorbidos al interior de la célula, para ser metabolizados a butanol, acetona y, en mucho menor medida en etanol. Esto se debe a que *C. acetobutylicum* carece de homeostasis al nivel de pH, por lo que depende íntimamente del pH extracelular. La presencia de ácidos en el medio puede provocar una pérdida del potencial protónico de la célula, inactivándola.

El pH es muy importante durante la fermentación acetona-butanol, ya que la solventogénesis inicia con un pH bajo; sin embargo si éste se encuentra por debajo de 4.5 (antes de que se forme una cantidad



**Fig. 1** Vías fermentativas de *C. acetobutylicum* (tomado de Lee *et al.*, 2008).

suficiente de ácidos orgánicos), la solventogénesis será disminuida e improductiva. Una forma sencilla de incrementar el crecimiento, utilización de los carbohidratos así como la producción de butanol es incrementando la capacidad amortiguante del medio. Dependiendo de las condiciones de cultivo y el tipo de sustrato empleado, las fermentaciones tipo lote toman de 2 a 6 días en completarse, la concentración final total de solventes producidos alcanza de 12 a 20 g/L, los cuales pueden ser separados por destilación del medio de fermentación (Lee *et al.*, 2008).

Como se muestra en la Fig. 1, el hierro es un importante componente en la dieta de *Clostridium*, ya que se requiere de una profusa producción de ferredoxina en la

conversión de piruvato en acetil-CoA. También se ha demostrado que en condiciones limitantes de fosfato es posible prevenir la pérdida del plásmido pSOL1 que, como se mencionó anteriormente, es necesario para la síntesis fermentativa de butanol en cepas silvestres (Lee *et al.*, 2008).

## ESTRATEGIAS MOLECULARES Y DE PROCESO PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE BUTANOL CON *Clostridium*

La formación de butanol marca el inicio de una fase de esporulación en *Clostridium*, causando la inactivación del cultivo. Se ha observado que los cultivos continuos con sistemas integrados de separación *in situ* dan los mayores títulos de butanol. Así, el grupo

de Ezeji *et al.*, en el 2004, obtuvo productividades de 0.91 g/L/h de butanol removiendo éste del medio de cultivo activo por medio de un gas acarreador. En 1983 Lin & Blaschek caracterizaron una cepa de *C. acetobutylicum* que alcanzó títulos de producción de butanol de 7.9 g/L en un medio que contiene extracto de maíz al 6%. En ese trabajo, los autores reportan el desarrollo de mutantes tolerantes al butanol, que obtuvieron mediante transferencias consecutivas a medios con cantidades gradualmente mayores de butanol. En efecto, una de sus cepas tolerantes reportó el máximo porcentaje de consumo de carbohidrato, el mejor rendimiento de conversión a butanol y la mayor concentración alcanzada (18.6 g/L de butanol). Sin embargo, como *C. acetobutylicum* posee una fermentación mixta, también se produjeron cantidades importantes de acetona y etanol, aún en la cepa adaptada (Lin & Blaschek, 1983). Utilizando cultivos lote con 6% de glucosa y cepas de *C. beijerinckii*, se alcanzaron títulos de hasta 18.6 g/L de butanol (Formanek *et al.*, 1997), aunque desafortunadamente también se produjeron 8.6 g/L de acetona. Complementariamente, grupos como el de Liyanage han disminuido la toxicidad del butanol hacia el cultivo mediante la generación de ARN antisentido contra la glicerol deshidrogenasa en *C. beijerinckii* (Liyanage *et al.*, 2000). En un estudio subsecuente (Nair & Papoutsakis, 1994) con la finalidad de hacer el proceso más específico, transformaron mutantes de *C.*

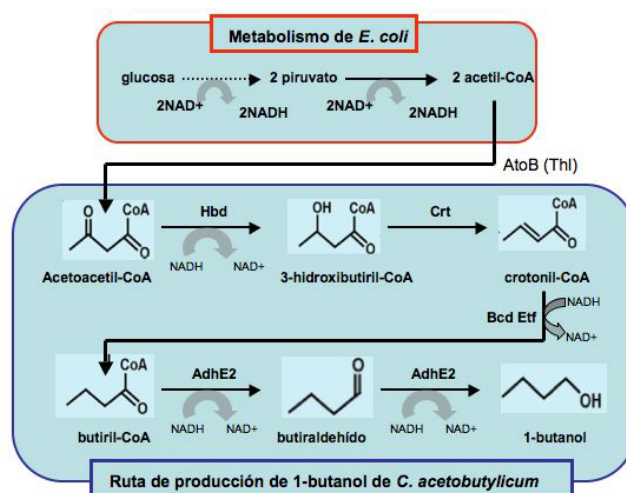
*acetobutylicum* deficientes en la producción de butanol y acetona con un plásmido portador del gen que codifica para la enzima aldehído/alcohol deshidrogenasa (AAD). Esta sobre-expresión reestableció la producción de butanol (84 mM) sin la formación de acetona ni un incremento en la producción de etanol.

Aunque algunos grupos han intentado la selección adaptativa para aumentar la resistencia de los cultivos ante el butanol, este no ha sido el enfoque más adecuado debido a que la regulación de la solventogénesis está íntimamente acoplada a la esporulación y por tanto es necesario manipular genéticamente cepas de *Clostridium* para evitar que las bacterias detecten las señales de inicio del proceso de esporulación y no formen cuerpos de resistencia, ya que estos no son productores de butanol. Algunos grupos están intentando modificar el factor de transcripción Spo0A para interrumpir la capacidad de regulación de esporulación, pero hasta ahora sin mucho éxito (Lee *et al.*, 2008). Otros puntos del metabolismo regulatorio pueden ser interrumpidos, el reciente desarrollo del sistema ClosTron, que funciona mediante el apareamiento de un intrón modificado y que permite interrumpir genes en cualquier especie de *Clostridium*, de una manera estable, potencialmente podrá solventar estas limitantes para inactivar genes que hasta hace poco no se sabía que existían. Este sistema ha sido probado con cuatro especies diferentes con éxito (Heap *et al.*, 2007).

## USO DE *Escherichia coli* COMO MICROORGANISMO PRODUCTOR DE BUTANOL

En un intento para aminorar los problemas asociados al uso de *C. acetobutylicum*, tales como formación de subproductos, baja velocidad de crecimiento y dificultades para realizarle ingeniería genética, se ha empleado a *Escherichia coli* como sistema de expresión de genes heterólogos para generar vías metabólicas que den lugar a la formación de butanol. *E. coli* es una bacteria con una fisiología y genética ampliamente estudiadas, por lo que se puede hacer uso de toda una gama de herramientas para su manipulación. *E. coli* ha probado ser un microorganismo adecuado para la producción de diversos metabolitos (Martin *et al.*, 2003), sin embargo no produce

butanol de forma natural, por lo que es necesario emplear técnicas de ingeniería de vías metabólicas, para introducirle la ruta bioquímica de síntesis. Un estudio importante al respecto, evaluó la producción de butanol en una cepa de *E. coli* en la cual se expresaron inicialmente seis genes de la vía de *C. acetobutylicum* utilizando plásmidos con promotores inducibles (Fig. 2). La sola expresión de la vía permitió la obtención de butanol (0.0139 g/L) en condiciones anaeróbicas. Posteriormente, se expresó el gen que codifica para la enzima que ayuda a dirigir el acetil-CoA hacia la vía de síntesis de butanol. Este cambio, junto con el uso de condiciones microaeróbicas aumentaron el título de 1-butanol a más de 0.060 g/L, (Atsumi *et al.*, 2008a). Finalmente, para complementar la actividad de estas enzimas,



**Fig. 2.** Esquema de producción de butanol en *E. coli* modificada genéticamente. La ruta modificada está formada de seis pasos enzimáticos a partir de acetil-CoA, AtoB, (acetil-CoA aciltransferasa), Thl (tiolasa), Hbd (3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa), Crt (crotonasa), Bcd (butiril-CoA deshidrogenasa), Etf (flavoproteína transportadora de electrones), (aldehído/alcohol deshidrogenasa). (Tomado de Atsumi *et al.*, 2008a).



se realizaron interrupciones en los genes que codifican para otras enzimas de vías competitivas del acetil-CoA, así como del regulador transcripcional Fnr. La combinación de estas estrategias mejoró la producción de butanol, alcanzando concentraciones de 0.373 g/L en medio mínimo adicionado con 2% de glucosa, (Atsumi *et al.*, 2008a).

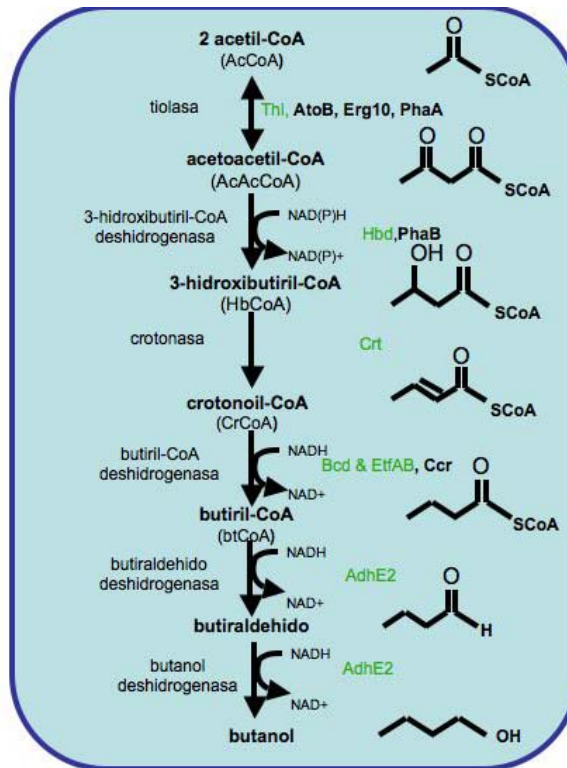
En una aproximación diferente, que utiliza una mayor parte de vías nativas de *E. coli*, también se logró producir butanol en *E. coli* (Shen & Liao, 2008). Este trabajo hizo uso de las vías de síntesis de los cetoácidos norvalina y treonina, bloqueando las rutas competitivas de producción de otros aminoácidos como valina, leucina, metionina e isoleucina. El razonamiento contempló el uso del oxaloacetato producido como intermediario de oxidación de la glucosa, para redirigirlo hacia 2-cetobutirato y 2-cetovalerato. Estos dos compuestos pueden ser transformados a 1-propanol y a 1-butanol, respectivamente, mediante la acción de dos enzimas: la 2-cetoácido descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa, dichos genes que codifican para éstas enzimas y que provienen de la bacteria *Lactococcus lactis* y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se introdujeron a *E. coli*.

Otras modificaciones han incluido la sobre-expresión de enzimas de la vía de síntesis de 2-cetovalerato resistentes a retroinhibición y el aumento de disponibilidad intracelular de treonina. La mejor cepa modificada con los puntos anteriores sobrepasó los 0.8 g/L de butanol en fermentaciones con 30 g/L de glucosa y 5 g/L de extracto de levadura (Atsumi *et al.*, 2008b).

## MODIFICACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA PRODUCIR n-BUTANOL

En la búsqueda de nuevos microorganismos productores de butanol en el 2008 Steen *et al.*, modificaron vías metabólicas en *S. cerevisiae* para la producción de *n*-butanol, ya que es un organismo bien caracterizado y genéticamente manejable. Estos investigadores también razonaron que la única diferencia entre el butanol y el etanol son dos carbonos por lo que *S. cerevisiae* puede ser capaz de tolerar altas concentraciones de *n*-butanol por los mismos mecanismos que tolera el etanol.

En la Fig. 3 se observa la ruta biosintética que se generó en *S. cerevisiae* para la producción de *n*-butanol. Los genes fueron clonados en dos diferentes plásmidos y transformados en *S. cerevisiae* BY4742. Las cepas denominadas por los autores ESY2, ESY3 y ESY4 fueron modificadas con genes de *Ralstonia eutropha* (*pha* y *phaB*), *Streptomyces collinus* (*crr*), *Clostridium beijerinckii* (*crt* y *adhe2*), *E. coli* (*atoB*) y *S. cerevisiae* (*erg10*). Los autores reportan que la cepa que generó el nivel mas alto de *n*-butanol (0.001 g/ml) fue EYS2, sugiriendo que la PhA es una de las tiasas clave en esta ruta metabólica. En una segunda etapa, también probaron diferentes isoenzimas para el 3-hidroxi-butiril-CoA (HbCoA) deshidrogenasa, ésta última utiliza NADPH (PhaB) como cofactor. La mejor cepa, la ESY7 produjo 0.0025 g/ml de *n*-butanol utilizando 2% de galactosa como fuente de



**Fig. 3.** Ruta heteróloga para la biosíntesis de butanol en *S. cerevisiae*. Enzimas en negro son de otros microorganismos: AtoB, *E. coli*; Erg10, *S. cerevisiae*; PhaA, *R. eutropha*; PhaB, *R. eutropha*; Ccr, *S. collinus*. Enzimas en verde son de *C. beijerinckii*, thl, enzima nativa de *Clostridium*.

carbono. En esta cepa se sobre-expresó la tiasa nativa (ERG10) y la HbCoA deshidrogenasa.

## COMENTARIOS FINALES

La fermentación ABE fue ampliamente utilizada en el siglo pasado, su aplicación industrial es todavía muy limitada: tanto por el elevado costo de re-cuperación-separación de los productos por su baja concentración; en el caso particular que atañe a esta revisión, por los bajos rendimientos del butanol; así como también por la inactivación del microorganismo durante la producción de

acetona-butanol-etanol. El interés reciente en la producción de butanol a partir de biomasa ha permitido la re-examinación de la fermentación ABE, incluyendo estrategias para reducir o eliminar la toxicidad del butanol en el medio de cultivo o para modificarlo para obtener una mejor especificidad del producto y rendimiento (Chukwumeka *et al.*, 2007). Aunque actualmente, los rendimientos y productividades obtenidos de este alcohol son bajos, su obtención mediante microorganismos es un proceso prometedor a mediano plazo. Entre los grandes retos que se tienen que superar para que la obtención

microbiológica del butanol pueda desplazar a otros biocombustibles como el etanol, están el aumentar el rendimiento de conversión de azúcares en butanol minimizando la formación de subproductos y optimizar las condiciones de fermentación para alcanzar mayores concentraciones de producto. Una solución indirecta proviene de la implementación de sistemas de separación del solvente *in situ*, y aunque estos sistemas resultan todavía muy costosos se reporta que ya se cuenta con algunas alternativas económicamente factibles (Lee *et al.*, 2008). A la fecha, la comparación de niveles de producción de butanol con microorganismos modificados genéticamente (máximo de 0.8 g/L), en comparación con los obtenidos en cultivos de cepas silvestres de *Clostridium* (hasta 20 g/L), parece indicar que la aplicación industrial a corto plazo favorece a este último microorganismo, principalmente con la ayuda de la extracción *in situ* del alcohol para mejorar la productividad y factibilidad económica del proceso.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia Tecnología – México a través de los proyectos FOMIX Estado de Morelos: MOR-2007-CO1-80360 y de Redes de Fuentes de Energía, así como del Proyecto UNAM-PAPIIT-DGAPA: IN220908.

## REFERENCIAS

Atsumi S, Cann AF, Connor MR, Shen CR, Smith KM, Brynildsen MP, Chou KJY, Hanai T & Liao JC (2008a) Metabolic

Engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metabol. Eng.* 10: 305–311.

Atsumi S, Hanai T & Liao JC (2008b) Non-fermentative pathways for the synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* 451: 86-89.

Ezeji TC, Qureshi N & Blaschek H (2007) Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18: 220-227.

Ezeji TC, Qureshi N & Blaschek HP (2004) Acetone Butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: Reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 653-658.

Formanek J, Mackie R, Blaschek HP (1997) Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2306-2310.

Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP & Minton NP (2007) The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J. Microbiol. Methods.* 70: 452-464.

Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW & Foust TD (2007) Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315: 804-807.

Lee SY, Park JH, Jang SH, Nielsen LK, Kim J & Jung KS (2008) Fermentative butanol

- production by Clostridia. *Biotechnol. Bioeng.* 101: 209-228.
- Lin YL & Blaschek HP (1983) Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 966-973.
- Lyanage H, Young M & Kashket ER (2000) Butanol tolerance of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 associated with down-regulation of *gldA* by antisense RNA. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2: 87-93.
- Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD & Keasling JD (2003) Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21: 796-802.
- Mermelstein LD & Papoutsakis ET (1993) In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage w3TI methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1077-1081.
- Nair RV & Papoutsakis ET (1994) Expression of plasmid-encoded *aad* in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production. *J. Bacteriol.* 176: 5843-5846.
- Ni Y & Sun Z (2009) Recent progress on industrial fermentative production of acetona-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *App. Microbiol. Biotechnol.* 83: 415-423.
- Shen & Liao JC (2008) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways. *Metab. Eng.* 10: 312-320.
- Steen EJ, Chan R, Prasad N, Myers S, Petzold CJ, Redding A, Ouellet M & Keasling JD (2008) Metabolic engineering of *S. cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microbial cell Factories.* 7-36: 1-8.