

Artículo Original

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE CULTIVO DE CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

EVALUATION OF A CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM CULTURE SYSTEM FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Luis Alberto Taramona Ruiz¹ <https://orcid.org/0000-0001-7670-3210>
Héctor Eduardo Sánchez Vargas^{2*} <https://orcid.org/0000-0003-0640-6151>
Darío Emiliano Medina Castro³ <https://orcid.org/0000-0003-1748-7313>
Heraclio Fernando Castillo Picón⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5576-3027>
Jorge Amador López Herrera¹ <https://orcid.org/0000-0003-0807-6096>
Rafael Alonso Valencia Fajardo¹ <https://orcid.org/0000-0002-1966-4777>

¹ Universidad Le Cordon Bleu, Lima, Perú.

² Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Camagüey, Camagüey, Cuba.

³ Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

⁴ Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, Huaraz, Ancash, Perú.

Recibido: Agosto 29, 2025; Septiembre 12, 2025; Aceptado: Septiembre 19, 2025

RESUMEN

Introducción:

La síntesis de bioetanol por vía lignocelulósica es una promisorio alternativa para la sustitución del petróleo como fuente de energía. Las capacidades de la bacteria *Clostridium thermocellum* la han convertido en un fuerte candidato para el desarrollo de tecnologías fermentativas compactas y eficientes.

Objetivo:

Evaluar un sistema de cultivo para la producción de bioetanol empleando el análisis *in silico* de procesos y la simulación computacional.

Materiales y Métodos:

El sistema de cultivo fue evaluado tomando como referencia los resultados del diseño *in silico* de un proceso fermentativo derivado de dicho sistema de cultivo, que empleó un modelo matemático basado en Monod y cuya solución se efectuó empleando el software MATLAB y su función *ode45*, que incluye un método de integración de Runge-Kutta.



Este es un artículo de acceso abierto bajo una Licencia *Creative Commons* Atribución-No Comercial 4.0 Internacional, lo que permite copiar, distribuir, exhibir y representar la obra y hacer obras derivadas para fines no comerciales.

* Autor para la correspondencia: Héctor E. Sánchez, Email: hectorsanvar2012@gmail.com



Resultados y Discusión:

La evaluación arrojó como resultado que el sistema de cultivo no lograría niveles de concentración de bioetanol que garanticen alta productividad y factibilidad. Esto pudiera ser mejorado en la medida en que el medio de cultivo, la cepa del microorganismo y las condiciones de operación, favorezcan la formación del etanol en un sistema biológico complejo en el que tienen lugar múltiples reacciones y rutas metabólicas competitivas.

Conclusiones:

Los niveles de concentración de bioetanol que se lograrían al finalizar la fermentación empleando el sistema de cultivo evaluado, serían insuficientes para lograr una tecnología competitiva. Sin embargo, el empleo del análisis *in silico* de procesos y la simulación computacional constituyen una propuesta viable para la evaluación de sistemas de cultivo.

Palabras clave: bioetanol; biomasa lignocelulósica; bioproceso consolidado; *Clostridium thermocellum*; sistema fermentativo.

ABSTRACT

Introduction:

The synthesis of bioethanol using lignocellulosic methods is a promising alternative for replacing petroleum as an energy source. The capabilities of the *Clostridium thermocellum* bacterium have made it a strong candidate for the development of compact and efficient fermentation technologies.

Objective:

To evaluate a cultivation system for bioethanol production using *in silico* process analysis and computer simulation.

Materials and Methods:

The cultivation system was evaluated based on the results of the *in-silico* design of a fermentative process derived from said cultivation system. The design employed a Monod-based mathematical model, which was solved using MATLAB software and its ode45 function, which includes a Runge-Kutta integration method.

Results and Discussion:

The evaluation showed that the cultivation system would not achieve bioethanol concentration levels that ensure high productivity and feasibility. This could be improved to the extent that the culture medium, the microorganism strain, and the operating conditions favor ethanol formation within a complex biological system where multiple reactions and competing metabolic pathways take place.

Conclusions:

The bioethanol concentration levels that would be achieved at the end of fermentation using the evaluated cultivation system would be insufficient to develop a competitive technology. However, the use of *in silico* process analysis and computer simulation represents a viable approach for the evaluation of cultivation systems.

Keywords: bioethanol; lignocellulosic biomass; consolidated bioprocess; *Clostridium thermocellum*; fermentative system.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que enfrenta hoy la humanidad tiene que ver con el cambio climático y el efecto invernadero que lo produce. La quema generalizada de los combustibles fósiles ha sido la principal causa del aumento de la concentración de gases en la atmósfera que provoca dicho efecto, lo que ha motivado la adopción de medidas de mitigación y de planes de reducción que tributan a los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) de la Agenda 2030, para el desarrollo sostenible de las Naciones Unidas (CEPAL, 2018). Sin embargo, a pesar de esta problemática, la sustitución del petróleo como fuente de energía constituye un reto científico y tecnológico en el que han trabajado durante años un importante número de investigadores en todo el mundo (Balza et al., 2024; Oliveira et al., 2019).

Para sustituir al petróleo como fuente de energía existe una gran variedad de alternativas tecnológicas que descansan básicamente en el uso de las fuentes de energía renovables, tales como la energía solar fotovoltaica y térmica, la energía eólica, la mareomotriz, la geotérmica y la procedente de la biomasa vegetal y animal. Esta última es extremadamente versátil, con la que, a través de procesos termoquímicos, bioquímicos y mecánicos se puede producir energía eléctrica, calor y diferentes tipos de combustibles. Uno de los combustibles más preciados que se obtienen por esta vía es el bioetanol, considerado como el posible sustituto del petróleo como fuente de energía en la transportación automotriz (Pérez et al., 2022) y que es producido a diferentes escalas por numerosas empresas en varios países del mundo (Jarunglumlert & Prommuak, 2021).

Actualmente se producen en el mundo alrededor de 100 mil millones de litros anuales de alcohol etílico y un 98 % de este se obtiene de materias primas ricas en azúcares o almidones, que provienen de tubérculos, cereales, remolacha, caña de azúcar y maíz fundamentalmente. Del total producido, alrededor del 15 % se destina a la combustión automotriz (Licht, 2020), lo que constituye un dilema ético al provenir de fuentes que también deben tributar sustancialmente a la alimentación humana.

Esta contradicción, junto a la alta disponibilidad de biomasa rica en celulosa en el medio natural, ha promovido el desarrollo de tecnologías que emplean la biomasa lignocelulósica y para la obtención de bioproductos, incluyendo el bioetanol. A partir de estas tecnologías más sostenibles se aprovechan diversas formas de biomasa lignocelulósica, como el bagazo de la caña de azúcar, los residuos agrícolas, la paja y la madera, entre otros (Pérez et al., 2022; Saraf & Dutt, 2022).

Las tecnologías que aprovechan la biomasa lignocelulósica constituyen procesos complejos y de varias etapas. Aunque se han estudiado y asimilado diferentes rutas tecnológicas, con ventajas y desventajas específicas, todos estos procesos están constituidos por etapas de pretratamiento, hidrólisis, fermentación, destilación y purificación hasta la obtención del producto final. En el pretratamiento se rompe la estructura de la biomasa para facilitar el acceso a los azúcares, la hidrólisis transforma la celulosa y la hemicelulosa en azúcares fermentables que son degradados y convertidos en etanol mediante la acción microbiana. Finalmente, se desarrollan las etapas de purificación y obtención del alcohol, con sus requisitos específicos en función del destino final del producto (Santos, 2018).

La transformación de materiales lignocelulósicos en bioetanol se puede realizar empleando varias configuraciones en las que se llevan a cabo los procesos de sacarificación y fermentación de manera independiente o con diferentes grados de integración. Atendiendo a dichas variadas configuraciones se tiene: (1) la hidrólisis y la fermentación separada (HFS), en la que cada una de las etapas se puede desarrollar independiente y dentro de condiciones óptimas; (2) la sacarificación y fermentación simultánea (SFS), donde ambas etapas se desarrollan en un mismo reactor, aunque la fermentación de las hexosas ocurre desfasada de la fermentación de las pentosas; (3) la sacarificación y co-fermentación simultánea (SCFS), en la que los procesos fermentativos de hexosas y pentosas ocurren de manera simultánea y (4) el llamado bioproceso consolidado (BPC), que incluye la hidrólisis del material pretratado, las fermentaciones de pentosas y hexosas y la producción de las enzimas que catalizan el proceso, todo en un solo paso y un único biorreactor (Santos, 2018; Saraf & Dutt, 2022).

El BPC se desarrolla en un ambiente complejo donde se llevan a cabo simultáneamente muchos fenómenos en un sistema biológico específico. A pesar de dicha complejidad, este bioproceso presenta algunas ventajas respecto al resto de las alternativas tecnológicas de producir bioetanol aprovechando la biomasa lignocelulósica. Entre estas se tienen a la reducción de los costos operacionales, al prescindir de agregar enzimas exógenas y otros insumos costosos; la simplificación del proceso, al poder diseñar un módulo compacto con ahorros constructivos y en el consumo energético; así como facilidades adicionales durante el escalado industrial (Saraf & Dutt, 2022).

Actualmente, la producción industrial de bioetanol empleando BPC está limitada por importantes retos tecnológicos. Se necesita desarrollar sistemas microbianos capaces de producir simultáneamente enzimas lignocelulósicas y fermentativas. Los microorganismos que intervienen en el proceso deben ser eficientes en condiciones operacionales en las que deben desarrollar la sacarificación y la fermentación de manera simultánea. También deben ser resistentes a la toxicidad por las altas concentraciones de etanol a las que se deben enfrentar (Arya et al., 2022; Sandoval et al., 2022).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido el microorganismo más empleado durante la primera generación de producción de etanol a partir de fuentes de carbono derivadas de la caña de azúcar, cereales y tubérculos. Sin embargo, en la segunda generación de producción, en la que se emplean fuentes de carbono derivadas de la biomasa lignocelulósica, han jugado un importante papel algunas bacterias como *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* y el *Clostridium thermocellum*, entre otras (Pérez et al., 2022).

Es el *Clostridium thermocellum* uno de los microorganismos más promisorios para la producción de bioetanol por medio del BPC. Su tolerancia a altas concentraciones de etanol y elevadas temperaturas, así como su capacidad para sintetizar una compleja enzima extracelular llamada celulosoma le proporciona grandes ventajas para solubilizar la biomasa y emplear la celulosa como fuente de carbono (Arya et al., 2022). Esta bacteria ha sido estudiada por muchos autores en los últimos años desde el punto de vista de su fisiología, metabolismo y regulación genética (Arya et al., 2022; Sánchez et al., 2022; Sandoval et al., 2022; Wen et al., 2025), entre otros aspectos; pero no abundan los estudios publicados en los que se aborda la productividad en la producción

de bioetanol y el diseño de los sistemas fermentativos. Teniendo en cuenta la necesidad de continuar los estudios relacionados con el perfeccionamiento de los sistemas de cultivo, para la síntesis de bioetanol y las potencialidades observadas en la bacteria *Clostridium thermocellum* y los BPC, el objetivo de este trabajo es evaluar un sistema de cultivo para la producción de bioetanol empleando el análisis *in silico* de procesos y la simulación computacional.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El sistema de cultivo a evaluar representa un caso de estudio tomado de la literatura especializada y tiene como ente activo a una cepa mejorada genéticamente de la bacteria *Clostridium thermocellum*. Para lograr el objetivo del estudio, partiendo del referido sistema de cultivo, se llevó a cabo primeramente el diseño del proceso fermentativo que incluyó la definición del modo de operación del biorreactor para un volumen útil de 300 L. En el proceso de diseño se determinó también el tiempo de cada ciclo del proceso fermentativo con sus correspondientes operaciones, el número de ciclos productivos anuales a partir de un tiempo disponible dado; así como, la concentración de etanol a la salida del fermentador y las capacidades productivas diarias y anuales que se pudieran lograr para el volumen del biorreactor especificado. Los resultados del diseño fueron tomados en cuenta para la evaluación del sistema de cultivo.

Se seleccionó un biorreactor de tanque agitado en operación discontinua para el desarrollo del proceso fermentativo. Este es el modo de operación predominante para la producción de bioetanol a partir del cultivo del *Clostridium thermocellum* a nivel mundial, empleado por gran número de autores (Ahmad et al., 2021; Hochegger et al., 2019; Islam et al., 2015; Thompson & Trinh, 2017).

Para el diseño del proceso fermentativo se utilizaron herramientas de análisis *in silico* de procesos. El modelo matemático empleado fue un modelo fenomenológico obtenido a partir de los balances de masa por componentes de cada una de las especies químicas claves involucradas en la fermentación.

El balance de masa empleado como modelo se complementó con un modelo cinético basado en el conocido modelo de Monod. Este es un modelo que, a pesar de su simpleza, ha sido empleado en diversos estudios y actividades de diseño de sistemas fermentativos, tiene gran versatilidad y adaptabilidad a muchos sistemas de expresión, tanto en cultivo de levaduras como en bacterias. Algunos autores han empleado este modelo o sus modificaciones en estudios de sistemas fermentativos del *Clostridium thermocellum*, Aros et al. (2011), Linville et al. (2013) y Zhang et al. (2015). Los valores de los parámetros del modelo cinético empleado en este trabajo fueron estimados por los propios autores que propusieron el sistema de cultivo (Linville et al., 2013).

El desarrollo del balance de masa en el sistema fermentativo partió de la ecuación 1, que constituye la ecuación general para la obtención de los balances de masa para cada componente (*i*) del sistema.

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = q_e C_{ie} - q_s C_{is} + Vr_i - Vr_i' \quad (1)$$

El término $\frac{d(VC_i)}{dt}$ representa la acumulación o variación de la concentración del componente i en el interior del biorreactor. En la propia ecuación 1, q_e y q_s son los flujos volumétricos totales a la entrada y salida del biorreactor respectivamente, mientras que C_{ie} y C_{is} se refieren a las concentraciones másicas de cada componente i a la entrada y salida del sistema reaccionante. El volumen del biorreactor ha sido designado como (V) y los términos r_i y r_i' se corresponden con las velocidades de generación y consumo del componente i respectivamente.

En un biorreactor que opera en modo discontinuo se anulan los términos correspondientes a los flujos de entrada y salida. De esta manera, y teniendo en cuenta que el volumen del sistema reaccionante es constante y sale del diferencial, los balances de masa por componente se transforman en el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (2, 3 y 4):

$$\frac{dX}{dt} = r_x - r_d \quad (2)$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p \quad (4)$$

Donde:

x – concentración celular en (g/L)

S – concentración de cualquier sustrato (S) en (g/L)

P – concentración de cualquier producto (P) en (g/L)

r_x , r_d , r_s y r_p son las velocidades de crecimiento y muerte celular, la velocidad de consumo del sustrato S y la de generación del producto P , respectivamente.

Este estudio tomó como referencia la variante del modelo de Monod (Linville et al., 2013); como componentes claves del sistema fermentativo de *Clostridium thermocellum* en la síntesis de bioetanol, estos autores consideran a las células, la celobiosa como sustrato y a los productos etanol y acetato, partiendo de que este último es un subproducto de este BPC y que es generado en elevada proporción, compitiendo con la propia síntesis de etanol (Arya et al., 2022).

Bajo las consideraciones anteriores, la concentración de celobiosa es representada como S y de la ecuación 4 se derivan las dos ecuaciones siguientes:

$$\frac{dP_E}{dt} = r_{P_E} \quad (5)$$

$$\frac{dP_A}{dt} = r_{P_A} \quad (6)$$

Donde, P_E y P_A se refieren a las concentraciones de etanol y de acetato respectivamente. A partir del modelo tomado como referencia, se emplearon las siguientes ecuaciones cinéticas (7, 8, 9 y 10), para determinar las velocidades de consumo o generación de las especies presentes en el sistema.

Para el crecimiento celular:

$$r_X = (\mu - k_d)X \quad (7)$$

Para el consumo de sustrato (celobiosa):

$$r_S = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (8)$$

Para la síntesis de productos (etanol y acetato):

$$r_{PE} = \frac{Y_{E/S} \cdot \mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (9)$$

$$r_{PA} = \frac{Y_{A/S} \cdot \mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (10)$$

Donde:

μ – velocidad específica de crecimiento celular (h^{-1})

k_d – velocidad específica de muerte celular (h^{-1})

$Y_{X/S}$ – rendimiento biomasa-sustrato (g/g)

$Y_{E/S}$ – rendimiento etanol-sustrato (g/g)

$Y_{A/S}$ – rendimiento acetato-sustrato (g/g)

La velocidad específica de crecimiento celular (μ) depende, según el modelo de Monod, de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}), relación representada matemáticamente por la ecuación (11).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{k_S + S} \right) \quad (11)$$

Donde el término k_S de esta ecuación se conoce como constante de saturación. Los valores numéricos de k_S y del resto de los parámetros del modelo cinético, se tomaron de los ajustes del modelo realizado por Linville et al. (2013), cuyos valores se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros del modelo de Monod ajustado para el sistema de expresión

Parámetros	Valor
μ_{max} (h^{-1})	1,223
k_d (h^{-1})	0,12
k_S (g/L)	2,217
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,244
$Y_{E/S}$ (g/g)	0,088
$Y_{A/S}$ (g/g)	0,254

Se asumió el empleo del medio de cultivo usado por Linville et al. (2013), que ha sido diseñado para este microorganismo y también ha sido utilizado por otros autores: Ozkan et al. (2001); Zhang & Lynd (2003). El componente principal de este medio es la

celobiosa; además, contiene: 0,336 g/L de KCl, 0,25 g/L de NH_4Cl ; 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,70 g/L de KH_2PO_4 ; 0,50 g/L de $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$ (aminoácido utilizado como tampón); 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,75 g/L de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (citrato trisódico hidratado), 0,6 g/L de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (urea); 1 g/L de L-cisteína; 0,30 mg/L de resazurina; 2 mL de minerales (1000 MTC) y 1,25 mL de vitaminas (50 MTC).

Las condiciones de la fermentación fueron concebidas según las empleadas en el propio sistema usado como referencia (Linville et al., 2013). Atendiendo a esto, se seleccionó para el diseño la cepa de *Clostridium thermocellum* genéticamente mejorada por dichos autores a partir de la cepa nativa ATCC 27405. Se estableció la concentración inicial de celobiosa en 85 g/L y se usó una concentración celular inicial de 0,035 g/L. La temperatura y el pH se controlaron de manera constante durante el proceso fermentativo en valores de 58 °C y 7 respectivamente.

Para la planificación del proceso productivo se estableció un régimen laboral en función de las operaciones del proceso, con un tiempo disponible anual (t_{da}) para la producción de 300 días y tres turnos de trabajo diarios de 8 horas. Empleando un diagrama Gantt, se determinó el tiempo necesario para un ciclo fermentativo (t_c), y el número de ciclos fermentativos anuales (n_c) se calculó empleando la ecuación 12.

$$n_c = \frac{t_d}{t_c} \quad (12)$$

Empleando la ecuación 13 se determinó la producción potencial de bioetanol en un ciclo fermentativo (P_{EC}), expresada en kg/ciclo, a partir de la concentración que se logra al finalizar la fermentación (C_E) y del volumen útil del biorreactor piloto (V_b).

$$P_{EC} = C_E \cdot V_b \quad (13)$$

Para determinar la producción potencial anual de bioetanol (P_{EA}), expresada en L/año, se empleó la ecuación 14.

$$P_{EA} = \frac{P_{EC} \cdot n_c}{f_{ma} \cdot \rho_E} \quad (14)$$

Donde, f_{ma} es la fracción másica de etanol en el azeótropo de la mezcla etanol-agua y ρ_E es la densidad del etanol a la temperatura de referencia. La ecuación 14 incluye la consideración de que, después de la etapa fermentativa, con la operación de destilación se logra una concentración de etanol en la mezcla etanol-agua del 95 % peso, debido a la existencia del azeótropo característico de esa mezcla binaria.

La solución del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias, constituido por los balances de masa por componentes del sistema, se efectuó empleando el software MATLAB (The MathWorks Inc., 2020). Se programó un código de dicho software que incluyó la función ode45, que emplea uno de los métodos de integración de Runge-Kutta.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestran las curvas que denotan el comportamiento de celobiosa, bioetanol y acetato a través del tiempo, con el eje para el sustrato a la izquierda y el de los productos a la derecha.

Se puede observar que, en un tiempo cercano a las seis horas, la concentración de sustrato se reduce desde una concentración inicial de 85 g/L hasta consumirse totalmente. En ese momento final la concentración de bioetanol alcanza su máximo valor, que luego se mantiene constante con el tiempo y cercano a 7,5 g/L. Esta afirmación es consistente con la alta concentración de acetato que se observa al final del proceso.

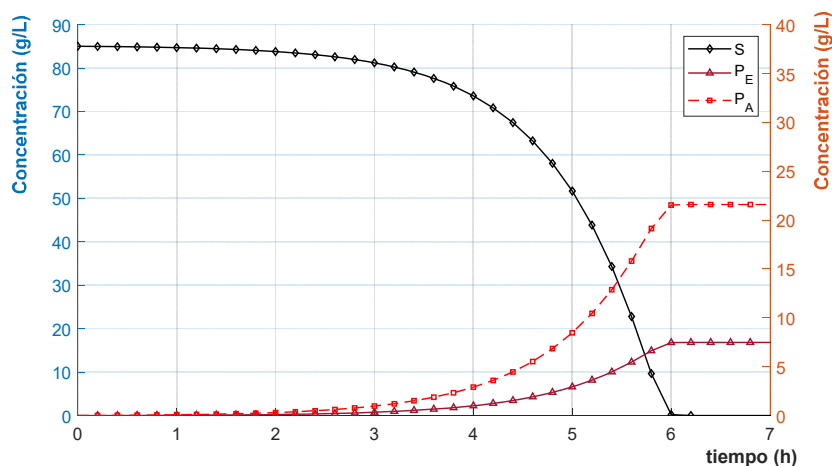


Figura 1. Comportamiento de la concentración de celobiosa, bioetanol, y acetato a través del tiempo de fermentación

Durante gran parte del proceso fermentativo la bacteria disponía de suficiente sustrato para crecer y mantener sus funciones vitales y metabolismo. Esto se evidencia en la figura 2, en la que se observa que el crecimiento de células viables (x_v) mantuvo una tendencia de crecimiento exponencial hasta alcanzar un pico de concentración, coincidente con el momento del agotamiento del sustrato alrededor de las seis horas. También se muestra una tendencia creciente de la muerte celular con el incremento de la concentración de células muertas (x_d), fenómeno que se acentúa también alrededor de las seis horas de fermentación y que de forma natural ocurre, tanto por la carencia de sustrato, como por el incremento de las concentraciones de etanol y acetato.

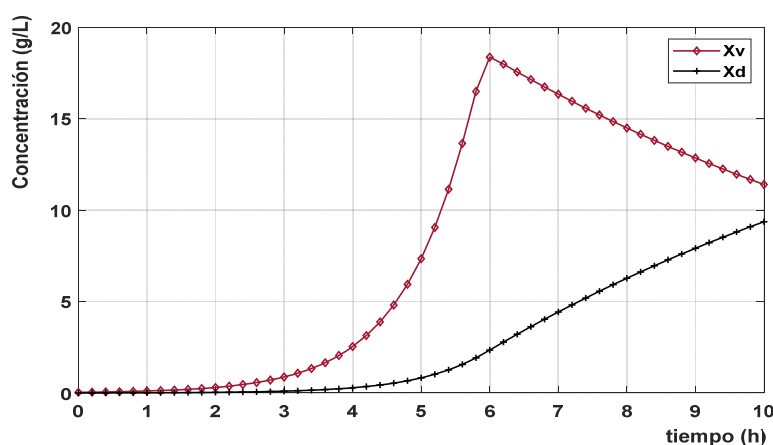


Figura 2. Comportamiento de las concentraciones de células viables (x_v) y muertas (x_d) a través del tiempo de fermentación

A partir del tiempo de fermentación determinado por simulación que se muestra en la figura 1 y teniendo en cuenta una cobertura de tiempo ante imprevistos y la posible variabilidad natural del sistema, se estableció para el diseño del proceso un tiempo de fermentación de 420 minutos (7 h). Teniendo en cuenta las experiencias prácticas de los autores de este trabajo, se realizó una estimación de los tiempos de las operaciones de cada ciclo fermentativo, cuya distribución se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Tiempos de las operaciones de cada ciclo fermentativo

<i>Operación</i>	<i>Tiempo (min)</i>
Descongelación del vial	120
Cultivo en erlenmeyer de 250 mL	480
Inoculación en biorreactor de propagación	20
Fermentación en biorreactor de propagación	300
Preparación del medio de cultivo en biorreactor piloto	60
Calentamiento y esterilización	100
Enfriamiento	60
Ajuste de pH e inoculación de biorreactor piloto	40
Fermentación en biorreactor piloto	420
Descarga	20
Limpieza del biorreactor	60

A partir de la solución del modelo matemático se logró simular y graficar el comportamiento del sistema fermentativo en cuanto a la evolución de las concentraciones de las principales especies involucradas.

Se conoce que, a pesar de las potencialidades de este microorganismo, el rendimiento de etanol para la cepa nativa es relativamente bajo debido a las vías metabólicas ramificadas que utiliza y a que se generan subproductos como acetato, formiato y lactato (Arya et al., 2022). El carácter competitivo de las referidas vías metabólicas exige encontrar las condiciones que favorecen la formación del etanol en detrimento de los subproductos no deseados. Se deduce entonces, que las condiciones de operación

empleadas no son del todo favorables en este sentido y que pudieran estar muy lejos de las condiciones óptimas. Tampoco es suficientemente eficiente la cepa obtenida por Linville et al., (2013).

Estos elementos ponen en evidencia la necesidad de trabajar desde la ingeniería genética para la obtención de cepas modificadas genéticamente más eficientes; así como, en la búsqueda de las condiciones óptimas del proceso, de manera que se aprovechen mejor las potencialidades del *Clostridium thermocellum*, microorganismo que puede tolerar entre 50 y 70 g/L de etanol (Sandoval et al., 2022), requisito indispensable para lograr altos niveles de productividad.

Para mejorar los resultados en el diseño de este proceso fermentativo dirigido a la producción de bioetanol, además del trabajo enfocado hacia la búsqueda de cepas mejoradas, también deben realizarse estudios encaminados a lograr modelos matemáticos más robustos y eficientes. Los estudios cinéticos sobre el celulosoma, necesarios para mejorar dichos modelos, han sido escasos debido a su compleja estructura y mecanismo catalítico y se han centrado principalmente en la relación entre el crecimiento bacteriano y la acumulación de glucosa. Estos estudios no han podido describir directamente la relación entre el celulosoma y la acumulación de productos y resultan ineficientes para optimizar las condiciones de operación, algo de extrema importancia en el diseño del proceso (Zhang et al., 2015).

Al realizarse un solapamiento de las operaciones entre ciclos, de manera que pueda desarrollarse más de un ciclo fermentativo en diferentes etapas o fases, se acorta el tiempo de duración del ciclo y se logran mayores niveles productivos en un periodo de tiempo dado o tiempo disponible para la producción. De este caso se logran ciclos repetitivos cada 12,66 h (t_c) a partir del segundo ciclo.

El empleo de la ecuación 12, para un t_c de 12,66 h y un t_d de 7200 h (300 días) permitió determinar que el número de ciclos fermentativos (n_c) sería igual a 568. Por otro lado, el empleo de la ecuación 13 para una concentración de etanol al finalizar el ciclo 7,5 g/L (C_E) y un V_b de 300 L permitió determinar que la producción de un ciclo fermentativo (P_{EC}) sería igual a 2,25 kg. Finalmente se determinó que la producción anual de bioetanol (P_{EA}) en el sistema fermentativo bajo estudio y la capacidad instalada sería de 1705 L/año de bioetanol.

Los resultados obtenidos en el diseño del sistema fermentativo han aportado información valiosa para el cumplimiento del objetivo de este trabajo dirigido a la evaluación del sistema de cultivo objeto de estudio. Este sistema, formado por el microorganismo, el medio de cultivo y las condiciones de operación, ha mostrado baja eficacia en cuanto al logro de niveles de concentración de bioetanol que garanticen productividades elevadas y la factibilidad del proceso productivo de bioetanol.

Cada uno de estos elementos del sistema debe ser mejorado. Estas mejoras deben ser enfocadas en diseñar y emplear medios de cultivos que garanticen los requerimientos nutricionales del microorganismo, desarrollar cepas mejoradas genéticamente que sean capaces de alcanzar altos niveles de expresión y optimizar las condiciones de operación con el empleo de modelos más robustos y el uso de herramientas computacionales.

A pesar de los resultados negativos que se han alcanzado con la evaluación del sistema de cultivo objeto de estudio, este trabajo presenta una propuesta metodológica viable de evaluación, que se sustenta en el empleo del diseño *in silico* de procesos y la simulación

computacional. Este método de evaluación pudiera ser empleado y generalizado a otros sistemas de similar naturaleza.

4. CONCLUSIONES

1. Como resultado de la evaluación se puede afirmar que los niveles de concentración de bioetanol que se lograrían al finalizar la fermentación empleando el sistema de cultivo evaluado, serían insuficientes para lograr una tecnología competitiva, lo que pudiera ser superado en la medida que se logren cepas genéticamente modificadas más eficientes que las actuales.
2. El análisis *in silico* de procesos y la simulación computacional presentadas en este trabajo, constituyen una propuesta viable para la evaluación de sistemas de cultivo dirigidos a la producción de bioetanol, empleando la ruta de degradación de biomasa lignocelulósica.
3. El uso de herramientas computacionales y el diseño *in silico* de procesos, junto a la construcción de nuevos y robustos modelos matemáticos, pudieran ser muy útiles para establecer las condiciones de cultivo óptimas en la producción de bioetanol en un BPC, proceso complejo en el que tienen lugar múltiples reacciones y rutas metabólicas competitivas

REFERENCIAS

- Ahmad, Q., Manzoor, M., Chaudhary, A., Yang, S., Shim, H., & Qazi, J. (2021). Bench-scale fermentation for second generation ethanol and hydrogen production by *Clostridium thermocellum* DSMZ 1313 from sugarcane bagasse. *Environmental Progress Sustainable Energy*, 40(2), (e13516). <https://doi.org/10.1002/ep.13516>
- Aros, N., Cifuentes, M., & Mardones, J. (2011). Modelación, simulación y control de procesos de fermentación. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 19(2), 210-218. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-33052011000200006>
- Arya, D., Vincent, S., & Balagurusamy, N. (2022). *Physiology of ethanol production by Clostridium thermocellum*. En A. Y. Hernández Almanza, N. Balagurusamy, H. A. Ruiz Leza, & C. N. Aguilar (Eds.), *Bioethanol: Biochemistry and biotechnological advances* (pp. 43–52). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781003277132>
- Balza, L., Mata, C., Matías, D., & Ríos, R. (2024). Navegando la transición energética en América Latina y el Caribe. *Banco Interamericano de Desarrollo*. <https://publications.iadb.org/publications/spanish/document/Navegando-la-transicion-energetica-en-America-Latina-y-el-Caribe-volatilidad-y-senalizacion-de-precios-en-los-mercados-electricos-a-corto-plazo.pdf>
- CEPAL. (2018). La agenda 2030 y los objetivos de desarrollo sostenible. Una oportunidad para América Latina y el Caribe. <https://www.cepal.org/es/publicaciones/40155-la-agenda-2030-objetivos-desarrollo-sostenible-oportunidad-america-latina-caribe>
- Hochegger, M., Trimmel, G., Cottyn, B., Cézard, L., Majira, A., Schober, S., & Mittelbach, M. (2019). Influence of base-catalyzed organosolv fractionation of
-

- larch wood sawdust on fraction yields and lignin properties. *Catalysts*, 9(12), 996. <https://doi.org/10.3390/catal9120996>
- Islam, R., Sparling, R., Cicek, N., & Levin, D. (2015). Optimization of Influential Nutrients during Direct Cellulose Fermentation into Hydrogen by *Clostridium thermocellum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 3116-3132. <https://doi.org/10.3390/ijms16023116>
- Jarunglumlert, T., & Prommuak, C. (2021). Net Energy Analysis and Techno-Economic Assessment of Co-Production of Bioethanol and Biogas from Cellulosic Biomass. *Fermentation*, 7(4), 229. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040229>
- Licht, F. (2020). World ethanol production to rebound in 2021. *Sugar & Ethanol*. <https://informaconnect.com/world-ethanol-production-to-rebound-in-2021/>
- Linville, J., Rodríguez, M., Mielenz, J., & Cox, C. (2013). Kinetic modeling of batch fermentation for *Populus* hydrolysate tolerant mutant and wild type strains of *Clostridium thermocellum*. *Bioresource Technology*, 147, 605–613. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.086>
- Oliveira, L., Portocarrero, I., & Ferraz, D. (2019). Los biocarburantes sostenibles: un análisis del marco regulatorio de la Unión Europea. *Veredas do Direito*, 16(36), 67-89. <http://dx.doi.org/10.18623/rvd.v16i36.1614>
- Ozkan, M., Desai, S., Zhang, Y., Stevenson, D., Beane, J., White, E., Guerinot, M., & Lynd, L. (2001). Characterization of 13 newly isolated strains of anaerobic, cellulolytic, thermophilic bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 275-280. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000082>
- Pérez, L., del Rio, C., Lafuente, D., & de La Fuente, N. (2022). *Physiology of ethanol production by Zymomonas mobilis*. In A. Y. Hernández Almanza, N. Balagurusamy, H. A. Ruiz Leza, & C. N. Aguilar (Eds.), *Bioethanol: Biochemistry and biotechnological advances* (pp. 21–42). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781003277132>
- Sánchez, S., Castro, M., Barbosa, F., Mier, E., Balbino, T., Rubio, D., Hernández, J., Santos, C., & Aguilar, S. S. Da Silva. (2022). *Metabolic engineering of yeast, Zymomonas mobilis, and Clostridium thermocellum to increase yield of bioethanol*. In A. Y. Hernández Almanza, N. Balagurusamy, H. A. Ruiz Leza, & C. N. Aguilar (Eds.), *Bioethanol: Biochemistry and biotechnological advances* (pp. 97–140). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781003277132>
- Sandoval, D., Romero, T., Arellano, M., Gschaedler, A., & Amaya, L. (2022). *Genetic regulation of principal microorganisms (yeast, Zymomonas mobilis, and Clostridium thermocellum) producing bioethanol/biofuel*. In A. Y. Hernández Almanza, N. Balagurusamy, H. A. Ruiz Leza, & C. N. Aguilar (Eds.), *Bioethanol: Biochemistry and biotechnological advances* (pp. 53–96). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781003277132>
- Santos, T. (2018). *Autohidrólisis y deslignificación organosolv de madera de Pinus radiata para la recuperación de hemicelulosas y lignina con aprovechamiento de la fracción celulósica por vía enzimática*. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/16148>
- Saraf, C., & Dutt, K. (2022). *Challenges in developing sustainable fermentable substrate for bioethanol production*. In A. Y. Hernández, N. Balagurusamy, H. A.

- Ruiz Leza, & C. N. Aguilar (Eds.), *Bioethanol: Biochemistry and biotechnological advances* (pp. 161–194). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781003277132>
- The MathWorks Inc. (2020). Matlab (Version 9.8.0.1323502 (R2020a)). Programa de computador. Natick, MA, USA: The MathWorks Inc.
- Thompson, R., & Trinh, C. (2017). Overflow metabolism and growth cessation in *Clostridium thermocellum* DSM1313 during high cellulose loading fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(11), 2592–2604. <https://doi.org/10.1002/bit.26374>
- Wen, W., Chen, C., Cui, Q., Xuan, J., & Feng, Y. (2025). The final proteolytic step in transmembrane signaling of multiple RsgI anti- σ factors in *Clostridium thermocellum*. *Bioscience Reports*, 45(4), 233-245. <https://doi.org/10.1042/BSR20253055>
- Zhang, P., Wang, B., Xiao, Q., & Wu, S. (2015). A kinetics modeling study on the inhibition of glucose on cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Bioresource Technology*, 190, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.037>
- Zhang, Y., & Lynd, L. (2003). Quantification of cell and cellulase mass concentrations during anaerobic cellulose fermentation: development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based method with application to *Clostridium thermocellum* batch cultures. *Analytical Chemistry*, 75(2), 219-227. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac020271n>

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

- Dr.C. Luis Alberto Taramona Ruiz. Gestión de proyectos, investigación, supervisión.
 - Dr.C. Héctor Eduardo Sánchez Vargas. Investigación, conceptualización, metodología, software.
 - Dr.C. Darío Emiliano Medina Castro. Conceptualización, metodología, análisis formal, redacción - revisión y edición.
 - Dr.C. Heraclio Fernando Castillo Picón. Investigación, supervisión, validación.
 - Dr.C. Jorge Amador López Herrera. Conservación de datos, redacción - revisión y edición.
 - M.Sc. Rafael Alonso Valencia Fajardo. Redacción - revisión y edición, recursos.
-