

---

---

**INSTITUTO  
TECNOLÓGICO DE ORIZABA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA  
AIREACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PHB UTILIZANDO  
*BACILLUS SP. IBT42* A PARTIR DE HIDROLIZADOS ÁCIDOS  
OPTIMIZADOS DE BAGAZO DE *AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW*”**

**TRABAJO PROFESIONAL (OPCIÓN I)  
TÉSIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**PRESENTA:  
I.Q. CESAR GALICIA BELTRAN**

**DIRECTORES DE TESIS:  
DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA  
DR.DANIEL GENARO SEGURA GONZALEZ**

**ORIZABA, VER. MÉXICO**

**FEBRERO 2015**



"2014, Año de Octavio Paz"

FECHA : 20/01/2015

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES  
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACION.  
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis  
del (la) C.

**CESAR GALICIA BELTRAN**

la cual lleva el título de:

"ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA AIREACION SOBRE LA  
PRODUCCION DE PHB UTILIZANDO BACILLUS SP. IBT42 A PARTIR DE  
HIDROLIZADOS ACIDOS OPTIMIZADOS DE BAGAZO DE AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW."

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESENTE: DRA. LETICIA LOPEZ ZAMORA

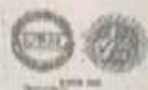
SECRETARIO: MRO. DANIEL GENARO SEGURA GONZALEZ

VOCAL : DRA. EUSEBIO BOLAÑOS REYNOSO

VOCAL SUP. : DRA. ROSALIA CERECERO ENRIQUEZ

EGRESADO(A): DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

OPCION: I Tesis





"2014, Año de Octavio Paz"

FECHA : 20/01/2015

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES  
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACION.  
PRESENTE

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis  
del (la) C.:

**CESAR GALICIA BELTRAN**

la cual lleva el título de:

"ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA AIREACION SOBRE LA  
PRODUCCION DE PHB UTILIZANDO BACILLUS SP. IBT42 A PARTIR DE  
HIDROLIZADOS ACIDOS OPTIMIZADOS DE BAGAZO DE AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW."

concluyéndose que se acepta.

ATENTAMENTE

PRESENTE: DRA. LETICIA LOPEZ ZAMORA

SECRETARIO: MTRO. DANIEL GENARO SEGURA GONZALEZ

LOCAL: DR. EUSEBIO BOLAÑOS REYNOSO

LOCAL SUP.: DRA. ROSALBA CERECERO ENRIQUEZ

REGISTRO(A): DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

ACION: I Tesis



## AGRADECIMIENTOS

*El presente trabajo de investigación fue realizado bajo la supervisión de la Dra. Leticia López Zamora y el Dr. Daniel G. Segura Gonzalez, a quienes, me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento por hacer posible la realización de este estudio. Además, de agradecer su paciencia, tiempo y dedicación que tuvieron para que esto saliera de manera exitosa.*

*A mi novia, por estar a mi lado, apoyándome en mis decisiones, dándome ánimos en mis momentos tristes y fuerza en mis momentos de debilidad.*

*A mis padres, por darme la vida y apoyarme en todo lo que me he propuesto.*

*A mis amigos, por ser parte de mi vida, de mis momentos tristes y alegres, por apoyarme, por nunca dejarme caer, por estar siempre ahí.*

*Agradezco a mis compañeros del IBT que, aunque fue poco el tiempo que pasamos juntos, me brindaron su amistad y conocimiento.*

## RECONOCIMIENTOS

Las presentaciones en congresos obtenidas en esta tesis se enlistan a continuación

2014	Expositor	Analysis of the temperature and aeration effect in the growth of the bacterium <i>Bacillus</i> spp. IBT42 and its yield of Phb. 1 <sup>st</sup> Biotechnology world symposium and 9 <sup>o</sup> Eencuentro Nacional de Biotecnología del IPN. Del 13 al 16 de Octubre de 2014. Tlaxcala, México.
2014	cartel	Maximización de azúcares reductores totales a partir de <i>Agave angustifolia</i> Haw empleando un diseño experimental en la hidrólisis ácida. XXX Encuentro Nacional de la AMIDIQ. 6 al 9 de Mayo de 2014, Puerto Vallarta, México

## RESUMEN

### **Estudio de la influencia de la temperatura y la aireación sobre la producción de PHB utilizando *Bacillus sp.* IBT42 a partir de hidrolizados ácidos optimizados de bagazo de *Agave angustifolia* Haw**

**Elaborado por: Ing. César Galicia Beltrán**

**Dirigida por: Dra. Leticia López Zamora**

**Dr. Daniel Genaro Segura González**

Los productos plásticos tienen cualidades muy versátiles entre los que destacan su durabilidad y resistencia a la degradación. Sin embargo, su uso extensivo genera residuos que se acumulan en el medio ambiente a un ritmo de 25 millones de toneladas por año. Es por eso que es necesario reemplazar a los plásticos derivados del petróleo con plásticos biodegradables, como es el caso del polihidroxibutirato (PHB). En este trabajo se realizó una investigación para determinar el tipo de ácido y las condiciones de reacción a utilizar para optimizar la hidrólisis ácida del bagazo de *Agave angustifolia* Haw, y posteriormente utilizar los hidrolizados obtenidos como sustrato para el cultivo de *Bacillus sp.* IBT42, una bacteria productora de PHB. Se determinó la influencia de la temperatura de cultivo, y la aireación en su crecimiento y acumulación de PHB. Para la optimización de la hidrólisis ácida la experimentación se dividió en 2 etapas. En la primera se aplicó un diseño univariable para determinar el tipo de ácido que permitía obtener mayores conversiones de azúcares, se empleó: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, todos ellos a una concentración del 2 % v/v, determinándose que el HCl presentó el mayor rendimiento de azúcares, con un rendimiento 18.52 % mayor que empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Para la segunda etapa se realizó un diseño Box-Behnken en el que se obtuvieron 2.75 g de azúcar (98% de conversión de hemicelulosa en azúcares fermentables) utilizando un tiempo de 60 min, presión de 1.5 Kg cm<sup>-2</sup> y relación sólido-líquido (RSL) de 1:16. Para la evaluación del efecto de la aireación y temperatura se realizó un diseño 2<sup>2</sup> con 5 puntos centrales, donde se obtuvo que a una T de 37 °C y aireación baja se encontraron los mejores valores, con un crecimiento bacteriano de 41.2 g L<sup>-1</sup> y una acumulación de PHB de 1.4 g L<sup>-1</sup>.

## ABSTRACT

**Study of the influence of the temperature and the aeration on the production of PHB using *Bacillus spp.* IBT42, from optimized acid hydrolysates of *Agave angustifolia* Haw bagasse**

**By: Chemical Engineering César Galicia Beltrán**

**Advisor by: Ph D. Leticia López Zamora**

**Ph D. Daniel Genaro Segura González**

Plastic products have very versatile qualities among which are their durability and resistance to degradation. However, their extensive uses generate wastes which accumulate in the environment at a rate of 25 million tons per year. That is why it is necessary to replace petroleum-based plastics for biodegradable bioplastics, such as the polyhydroxybutyrate (PHB). In this work, a study was performed to determine the type of acid and the conditions to be used for the optimization of acid hydrolysis of *Agave angustifolia* Haw bagasse, and then use these hydrolysates for the cultivation of *Bacillus spp.* IBT42, a PHB producing bacterium. The influence of the temperature of culture, and the aeration in its growth and yield of PHB were determined. For the optimization of acid hydrolysis, 2 stages of experimentation were performed. In the first stage, a univariable design was applied to determine the type of acid allowing the higher conversion of sugar. The acids used were: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, all at a concentration of 2% v/v, determining that the HCl showed the highest yield of sugar, with a yield 18.52% higher than using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. For the second stage, a Box-Behnken design was applied in which 2.75 g of sugar were obtained (98% conversion of hemicellulose into fermentable sugars) using a time of 60 min, pressure of 1.5 Kg cm<sup>-2</sup> and RSL of 1:16. An experimental design 2<sup>2</sup> with 5 central points was used to evaluate the effect of the aeration and temperature. The best results were obtained with a temperature of 37 °C and low aeration, with a cell growth of 41.2 g L<sup>-1</sup> and a production of PHB of 1.43 g L<sup>-1</sup>.

## ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	Iv
LISTA DE TABLAS	Vi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
1.1 Composición de materiales lignocelulósicos	4
1.1.1 Celulosa	4
1.1.2 Hemicelulosa	5
1.1.3 Lignina	7
1.2 Propiedades y usos del <i>Agave angustifolia</i> Haw	8
1.3 Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos	10
1.3.1 Hidrólisis con ácido diluido	10
1.3.2 Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento	12
1.4 Azúcares reductores	14
1.5 Plásticos	15
1.5.1 Definición	15
1.5.2 Clasificación de los plásticos	17
1.5.3 Consumo mundial	17
1.6 Bioplásticos, definición y características	19
1.7 Definición, estructura y propiedades de los polihidroxicanoatos	21
1.7.1 Biosíntesis de PHA	23
1.7.1.1 Rutas de biosíntesis de PHA en microorganismos	24
1.7.2 Aplicación de los PHA	25
1.8 Antecedentes	26
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	



	Pág.
2.1 Obtención de la materia prima	30
2.2 Caracterización de la materia prima	30
2.3 Diseño univariable para la elección del ácido a utilizar en la hidrólisis ácida	31
2.3.1 Caracterización de las muestras de hidrolizado ácido	31
2.4 Optimización de la hidrólisis ácida	31
2.4.1 Diseño univariable empleando diferente relación sólido-líquido	33
2.4.2 Diseño Box-Behnken con variables modificadas	33
2.5 Obtención del biopolímero	34
2.5.1 Acondicionamiento de hidrolizados	34
2.5.2 Activación de la cepa de <i>Bacillus sp.</i> IBT42	35
2.5.3 Preparación de los medios de cultivo	35
2.5.4 Preparación del pre-inóculo	35
2.5.5 Inoculación de la bacteria <i>Bacillus sp.</i> IBT42	36
2.5.6 Determinación de la influencia de la temperatura y aireación en la producción de PHB mediante un diseño de experimentos	36
2.5.7 Extracción del PHB	39
2.5.8 Cuantificación del PHB	39
2.5.9 Cuantificación del crecimiento bacteriano	39
2.5.10 Cuantificación de azúcares reductores	40
2.5.11 Estudio del efecto de una realimentación con diferentes componentes	40
2.5.12 Estudio del efecto del tiempo de la realimentación	41
 CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Caracterización de la materia prima	
3.2 Hidrólisis ácida	43
3.2.1 Valoración de la hidrólisis ácida empleando diferentes ácidos	43
3.2.2 Optimización de la hidrólisis ácida mediante diseño de experimentos Box Behnken	45

	Pág.	
3.2.3	Análisis de gráficas de contornos y superficie de respuesta	47
3.2.4	Diseño univariable empleando diferente relación sólido-líquido	50
3.2.5	Segundo diseño Box-Behnken para la obtención de azúcares reductores	51
3.2.6	Análisis de gráficas de contornos y superficie de respuesta del segundo diseño B.B	54
3.2.7	Análisis canónico	56
3.2.8	Pruebas lignocelulósicas a materia prima con diferentes tiempos de almacenamiento	62
3.3	Producción de PHB	60
3.3.1	Activación de la cepa <i>Bacillus sp.</i> IBT42, preparación del medio de cultivo y preinóculo	60
3.3.2	Evaluación de la influencia de la temperatura y la aireación sobre la producción de PHB	61
3.3.2.1	Cuantificación de azúcares de las fermentaciones para la producción de PHB	66
3.3.3	Evaluación del efecto con diferentes tipos de alimentación	68
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		73
ANEXOS		77
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS		84

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.1	Lignocelulosa	4
1.2	Estructura de la celulosa	5
1.3	Segmento de estructura plana de hemicelulosa	6
1.4	Estructura de la lignina	8
1.5	Hoja de <i>A. angustifolia</i>	9
1.6	Principales productos de degradación originados en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica	13
1.7	Prueba de Fehling	15
1.8	(a) Consumos mundiales de polímeros sintéticos en el año 2013 y (b) demanda de polímeros sintéticos en el año 2013	18
1.9	Estructura del PHA	20
1.10	Monómero del ácido poli-láctico (PLA)	20
1.11	Estructura general de los PHA y ejemplos de su nomenclatura y símbolo según la longitud y posición de la cadena lateral (R)	21
1.12	Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente	23
1.13	Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de PHB a partir de carbohidratos	24
2.1	Metodología general para la producción de PHB	30
2.2	Diseño 2 <sup>2</sup> con 5 puntos centrales para la producción de PHB en las etapas de crecimiento bacteriano y producción de PHB	37
2.3	Matraz con alerones	37
2.4	Curva patrón para la cuantificación de crecimiento bacteriológico	40
3.1	Curva para cuantificar los azúcares reductores totales	44
3.2	Gráficas de contornos para la hidrólisis ácida (a) presión vs tiempo (b) presión vs relación sólido-líquido y (c) tiempo vs relación sólido-líquido.	48
3.3	Gráficas de superficie de respuesta para la hidrólisis ácida (a) tiempo vs presión (b) presión vs relación sólido-líquido y (c) tiempo vs relación sólido-líquido	49

3.4	Gráfica de contornos para la obtención de azúcares con las variables independientes de (a) tiempo y presión, (b) RLS y presión y (c) RSL y tiempo	55
3.5	Gráficas de superficie de respuesta para la hidrólisis ácida (a) tiempo vs RSL (b) presión vs relación sólido-líquido y (c) tiempo vs presión	57
3.6	Gráfica de cuantificación de crecimiento bacteriológico	62
3.7	Gráfica de cuantificación de PHB	63
3.8	Gráfica de cuantificación de azúcares restantes	69
3.9	Cuantificación de crecimiento microbiológico con diferentes tipos de alimentación	71
3.10	Cuantificación de producción de PHB con diferentes tipos de alimentación	71

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.1	Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos	11
1.2	Ventajas y desventajas de los materiales plásticos (Naranjo, 2010)	16
1.3	Propiedades de los PLA comparadas con las propiedades de los PHA (Chen, 2009)	22
2.1	Parámetros para la caracterización del bagazo de agave	31
2.2	Diseño Box-Behnken para la optimización de la hidrólisis ácida	32
2.3	Segundo diseño Box Behnken para la obtención de azúcares reductores	34
2.4	Diseño 2 <sup>2</sup> con 5 puntos centrales	38
2.5	Dosis de nutrientes y fuente de carbono para la preparación de los medios de cultivo	38
2.6	Tipo de realimentación en alimentación continua	41
3.1	Resultados de la caracterización de bagazo de <i>Agave angustifolia</i> Haw	43
3.2	Rendimiento de los diferentes ácidos	44
3.3	Resultados obtenidos del diseño de experimentos Box Behnken	45
3.4	Estimación del efecto de las variables sobre la producción de azúcares reductores	46
3.5	Gramos de azúcar obtenidos con presión de 1.4 Kg cm <sup>-2</sup>	50
3.6	Gramos de azúcar obtenidos con presión de 1.5 Kg cm <sup>-2</sup>	50
3.7	Segundo diseño Box-Behnken para la obtención de azúcares reductores	52
3.8	Valores de glucosa, Xilosa y ácido acético cuantificado mediante HPLC	54
3.9	Cuantificación de crecimiento bacteriológico	61
3.10	Cuantificación de producción de PHB (µg/mL)	63
3.11	Producción específica de PHB a las 18 h de fermentación	66
3.12	Consumo de azúcares reductores del <i>Bacillus sp.</i> IBT42	67
3.13	Consumo de azúcar con diferentes tipos de alimentación	69

3.14	Biomasa producida con diferentes tipos de alimentación	70
3.15	Cuantificación de PHB con diferentes tipos de alimentación	72

## INTRODUCCIÓN

Los materiales lignocelulósicos representan el mayor componente de los residuos agroindustriales, debido a las propiedades físicas y químicas de sus componentes, además de su bajo costo y amplia disponibilidad, los hacen sustratos de interés para ser usados en procesos biotecnológicos (Silva *et al.*, 2004). Por esta razón, la utilización de materiales lignocelulósicos ha sido investigada intensamente. Estas han sido enfocadas a la producción de alcohol, ácidos orgánicos, compostaje, papel, combustible, hongos comestibles y alimento para animales, pero no se han realizado evaluaciones a fondo sobre el aprovechamiento de residuos para la producción de biopolímeros (Naranjo, 2010).

Los materiales lignocelulósicos son sometidos a tratamientos para obtener una solución de azúcares fermentables, y suministrarlos como sustrato a microorganismos con alto rendimiento en producción del biopolímero polihidroxibutirato (PHB). Algunos microorganismos tienen la capacidad de utilizar directamente estos residuos hidrolizados (Chandler *et al.*, 2012).

Los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres termoplásticos sintetizados por diversos organismos, incluyendo microorganismos procariotas. Constituyen biopolímeros importantes por su capacidad para ser producidos a partir de fuentes renovables, así como por su biodegradabilidad (Amada, 2008).

Los PHA son poliésteres alifáticos constituidos por monómeros de entre 1000 y 3000 unidades. Estos poseen, en general, características fisicoquímicas similares a las de los poliésteres sintéticos (Khanna y Srivastava, 2007; Patnaik, 2005).

El uso de plásticos obtenidos a partir del petróleo (plásticos sintéticos) es parte fundamental del *modus vivendi* contemporáneo, en gran medida gracias a sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas, que permiten sustituir el uso de otros materiales más caros y menos resistentes. Sin embargo, estos compuestos acarrearán también desventajas de manera inherente: no son biodegradables, se obtienen a partir de un recurso no renovable, como lo es el petróleo, por lo que su producción se ve afectada por el incremento al precio del mismo debido a la

disminución en las reservas, el aumento en el consumo y cambios geopolíticos críticos para la industria petrolera (Masuda, 2008).

De igual manera, analizando el ciclo de vida de los plásticos obtenidos del petróleo se observa que tienen impactos negativos hacia el ambiente, de los cuales los principales son (Naranjo, 2010):

- Consumo de petróleo como materia prima.
- Consumo energético durante su producción.
- Emisiones de gases de efecto invernadero durante su producción.
- Impacto sobre los suelos y cuerpos de aguas en su disposición final.



# **CAPÍTULO I**

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

## CAPITULO 1 FUNDAMENTOS TEORICOS

### 1.1 Composición de materiales lignocelulósicos

La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) cuya composición se observa en la Figura 1.1, es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis. Anualmente se forman 200 000 millones de toneladas en el mundo. La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros de la lignocelulosa varían entre las especies de las plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Cuervo *et al.*, 2009).

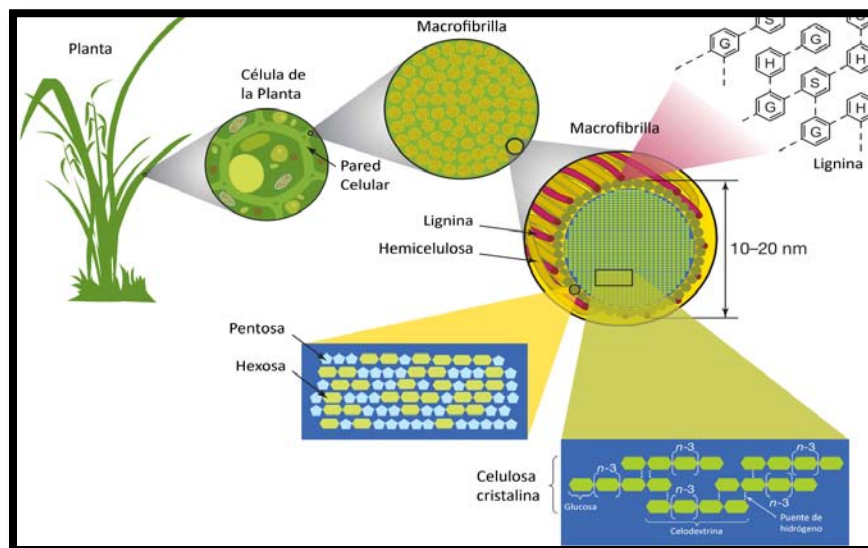


Figura 1.1 Lignocelulosa (Tomada de Rubín, 2008)

#### 1.1.1 Celulosa

La celulosa es la principal materia “esquelética” de las plantas. Existen en varias formas, de las cuales la forma alfa es la más abundante. La celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas muy resistentes e insolubles al agua. De esta manera, se originan

fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales (Mantilla, 2012).

La celulosa, compuesta principalmente por D-glucosa, es el material orgánico más abundante sobre la corteza terrestre. La celulosa es además la forma más común de encontrar el carbono de la biomasa. Las plantas sintetizan la celulosa como material estructural para soportar su peso. Las moléculas largas de celulosa llamadas microfibrillas, forman haces por los puentes de hidrógeno que se crean entre los numerosos grupos-OH de los anillos de glucosa (Cuervo *et al.*, 2009).

En la celulosa las unidades de D-glucosa están unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4, disposición bastante rígida y muy estable. En la Figura 1.2, se muestra una estructura parcial de la celulosa. La longitud del polímero es altamente variable y dependiente del organismo del cual la celulosa haya sido obtenida, así como de la edad y estado metabólico al momento de la extracción (Espinosa, 2013).

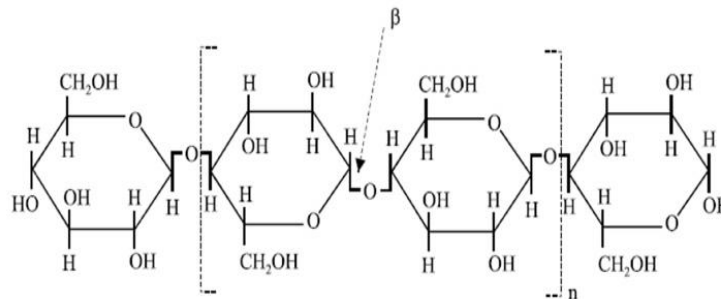


Figura 1.2. Estructura de la celulosa

Se calcula que la molécula de celulosa contiene entre 1600 y 2700 unidades  $\beta$ -D-glucosa. Esto se basa en las mediciones del peso molecular (presión osmótica, viscosidad y ultra centrifugación) que dan valores de 300,000 a 500,000 unidades para la celulosa (Mantilla, 2012).

### 1.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es una estructura compleja de hidratos de carbono que contiene diferentes monosacáridos como pentosas (como xilosa y arabinosa), hexosas

(como manosa, glucosa y galactosa), y ácidos de azúcar. El componente dominante de la hemicelulosa de las maderas duras y plantas agrícolas, como las hierbas y paja, es xilano (Hendriks y Zeeman 2009).

En contraste con la celulosa, la cual es cristalina, fuerte y resistente a la hidrólisis, las hemicelulosas son estructuras aleatorias, amorfas con pequeña solidez, fácilmente hidrolizables en ácidos o bases diluidas. La mayoría de las hemicelulosas se presentan como heteropolisacáridos, poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos casi siempre por enlaces  $\beta$ -1,4 (de menor longitud que la de celulosa, ver Figura 1.3). De esta pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar de longitud. Se clasifican usualmente de acuerdo a los azúcares residuales presentes. Los tipos y cantidades de hemicelulosa presentes en las paredes de las maderas de angiospermas y coníferas son diferentes (Cortínez, 2010).

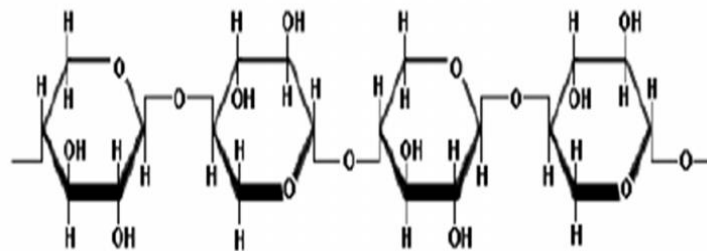


Figura 1.3. Segmento de estructura plana de hemicelulosa.

Las solubilidades de los diferentes compuestos de hemicelulosa en orden descendente son: manosa, xilosa, glucosa, arabinosa y galactosa. La solubilidad aumenta con el aumento de la temperatura. La solubilidad de polímeros moleculares más altos no puede predecirse, debido a puntos de fusión desconocidos (Hendriks y Zeeman, 2009).

La hemicelulosa se caracteriza por ser una molécula con ramificaciones, tal como el ácido urónico, capaz de unirse a las otras moléculas mediante enlaces que

constituyen la pared rígida que protege a la célula de la presión ejercida sobre ésta por el resto de las células que la rodean (Cortínez, 2010).

Las hemicelulosas cubren y unen a las microfibrillas de celulosa en una matriz común. La corta extensión de las cadenas incrementa la solubilidad de las hemicelulosas y la posición expuesta de las mismas en la superficie de las microfibrillas, explicaría por qué este polímero está entre los primeros componentes de la pared celular atacados por los hongos causantes de la putrefacción (Espinosa, 2013).

### **1.1.3 Lignina**

La lignina es el tercer componente con mayor abundancia en los materiales lignocelulósicos, es por ello el tercer polímero natural más abundante en la naturaleza tras la celulosa y hemicelulosa. El contenido de lignina, al igual que en el caso de las hemicelulosas, difiere entre los diferentes materiales lignocelulósicos (Tomas, 2010).

La lignina es el polímero natural más complejo en relación a su estructura y heterogeneidad. Por esta razón no es posible describir una estructura definida de la lignina; sin embargo, se han propuesto numerosos modelos que representan su estructura como en la Figura 1.4. La molécula de lignina presenta un elevado peso molecular. Los polímeros de lignina son estructuras conectadas con un peso molecular de 10.000 uma, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico). El acoplamiento aleatorio de estos radicales da origen a una estructura tridimensional. La lignina, como la hemicelulosa, normalmente comienza a disolverse en agua alrededor de los 180 °C en condiciones neutras. La solubilidad de la lignina en ambientes ácidos, neutros o alcalinos depende, sin embargo, del precursor de la lignina (p-cumaril, coniferílico, sinapílico alcohol o combinaciones de ellos) (Hendriks y Zeeman 2009).

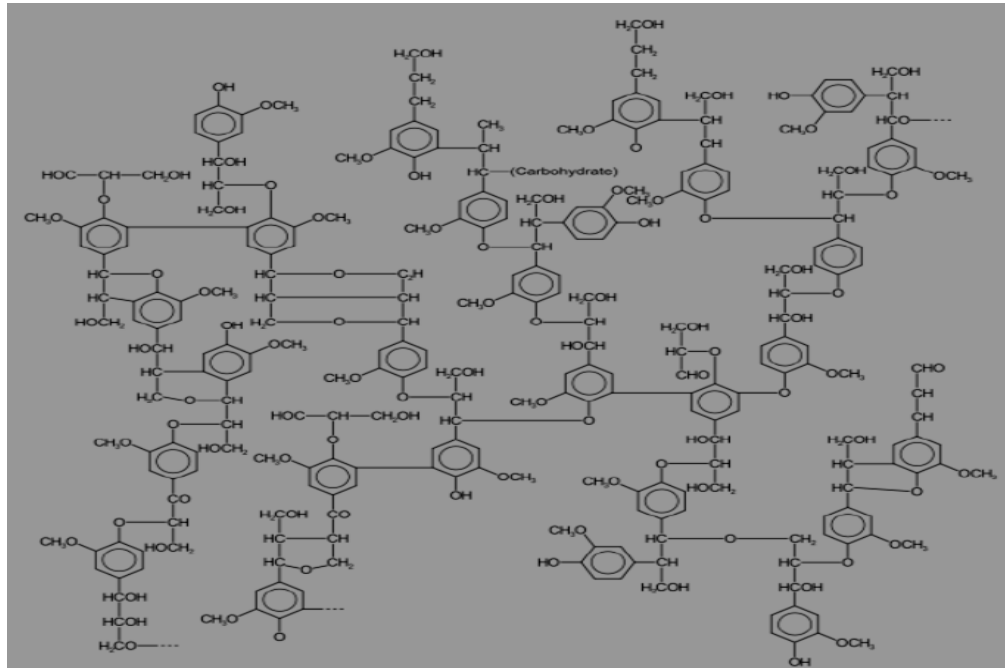


Figura 1.4. Estructura de la lignina

La base estructural de la lignina es el fenil-propano, teniendo enlazado al anillo bencénico un número variable de grupos hidroxílicos y metoxílicos. Esos grupos hacen que el fenil propano tome la forma de radicales químicos bien definidos. Así es que en la lignina que se presenta en la madera de las gimnospermas predominan radicales de guaiacil-propano (metoxi-3-hidroxi-4-fenil-propano); mientras que en las angiospermas predominan radicales de siringil-propano (dimetoxi-3-5-hidroxi-4-fenil-propano) (Mantilla, 2012).

## 1.2 Propiedades y usos del *Agave angustifolia* Haw

La *Agavaceae* es una familia de plantas con 9 géneros y cerca de 293 especies de los cuales el género más importante es el *Agave* con cerca de 166 especies (Rodríguez-Garay *et al.*, 2009).

El *Agave tequilana* y *A. angustifolia* pertenecen al género *Agave* y ambas son localizadas en el grupo *Rigidae*, del cual su característica genotípica más importante son sus hojas lanceoladas y rígidas (Gendry, 1982 citado por Rodríguez-Garay *et al.*, 2009) como se pueden observar en la Figura 1.5.



Figura 1.5 Hoja de *A. angustifolia*

De todas las especies de *Agave* con importancia biológica, cultural y económica en México y Centroamérica el *A. angustifolia* ha jugado un rol muy importante debido a sus varios usos, entre los que destacan: alimento (flores y frutos); combustible (plantas secas); fibra para fabricación de cuerdas y, la más importante, la elaboración de bebidas (la planta es cocida y su jugo extraído, fermentado y destilado para la creación de una bebida alcohólica) (García-Mendoza y Chiang 2003).

En el estado de Oaxaca se produce el mezcal de forma artesanal, bebida alcohólica que se obtiene por destilación de mostos preparados a partir de los azúcares extraídos de las “cabezas” o “piñas” (tallo o eje floral con hojas cortadas) maduras y cocidas, provenientes de diferentes agaves. El más destacado debido a su alta producción de azúcares es el *A. angustifolia* (Vera *et al.*, 2009).

Durante el proceso de extracción del mezcal, al final de la etapa de fermentación y destilación del tallo o “piña”, se elimina el bagazo de maguey, el cual dependiendo del proceso artesanal de molienda se estima entre el 14 y 20 % del peso total de la piña, mientras que en Jalisco, México, las piñas del maguey tequilero (*A. tequilana* Weber) son procesadas industrialmente y el peso del bagazo es en promedio el 40 % del peso húmedo. La industria mezcalera de Oaxaca produce

anualmente 122 696 t de bagazo o desecho, producto subutilizado que es vertido en ríos, arroyos o utilizado mínimamente como combustible en hornos ladrilleros, ocasionando un grave problema al ambiente (Martínez et al., 2013)

### **1.3 Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos**

Por mucho tiempo se ha investigado la digestibilidad de los materiales lignocelulósicos para obtener una mayor conversión de (hemi) celulosa a etanol, metano y, en los últimos años, hidrógeno. Aun no se sabe, que características de los materiales lignocelulosicos son importantes para determinar que pretratamiento es el adecuado (Hendriks y Zeeman, 2009).

El propósito de los pretratamientos es remover la lignina y hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa, e incrementar la porosidad del material. Estos pretratamientos deben cumplir con los siguientes requerimientos: (1) Promover la formación de azúcares o la habilidad para subsecuentemente formar azúcar de la hidrólisis enzimática; (2) Evitar la degradación o pérdida de carbohidratos; (3) Evitar la formación de subproductos inhibidores de la hidrólisis o de su fermentación; y (4) ser factible económicamente (Sun y Cheng, 2002).

Existen diferentes tecnologías de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, que pueden ser clasificadas según su naturaleza en: pretratamientos físicos, químicos, biológicos y físico-químicos. Dichos métodos se resumen en la Tabla 1.1 (Mantilla, 2012).

#### **1.3.1 Hidrólisis con ácido diluido**

El contenido de hemicelulosa suele estar entre el 11% al 37% del peso seco del material lignocelulósico. Esta es hidrolizada relativamente fácil por ácidos, dando como resultado xilosa, glucosa, galactosa y arabinosa (Morohoshi, 1991; Sjöström, 1993, citado por Mohammad y Karimi, 2007). Uno de los mayores problemas asociados con la hidrólisis ácida diluida de biomasa lignocelulósica es la pobre fermentabilidad de los hidrolizados producidos (Larsson *et al.*, 1999).



Tabla 1.1. Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos (Tomado de Mantilla, 2012)

Naturaleza	Método	Procedimiento	Observaciones
Físico	Pulverizado Mecánico	Reducción a astillas, molienda y/o trituración	Residuos de madera, desechos de caña, y otras materiales muy fibrosos.
	Agua Líquida Caliente	Vapor a presión que liberan ácidos volátiles y de la auto hidrólisis	Despolimerización de la celulosa, y se hidrolizada el 90% aproximadamente de la hemicelulosa.
Químico	Tratamiento con Amoniacó	Por cada kg de biomasa seca se añade 1 a 2 kg de amoniacó por 30 min a 90 °C	Requiere la recuperación del amoniacó, no se producen inhibidores. Para material con alto contenido de lignina no es eficiente.
	Explosión con CO <sub>2</sub>	Por cada kg de biomasa seca se añade 4 kg CO <sub>2</sub> a 5 kPa	Conversión de la celulosa. No forma compuestos inhibidores.
	Hidrólisis con ácido diluido	Se utiliza H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o HCl del 1 al 5% a 200°C	Altas conversiones de hemicelulosa a xilosa. La temperatura es favorable para la degradación de la celulosa. La lignina no se solubiliza.
	Hidrólisis alcalina	Se utiliza NaOH diluido con una relación de 20:1, en concentraciones de 0,124 a 0,24 M a 70°C por 1 h aproximadamente	Existe una solubilización del 70 al 80% de la lignina, se puede dar degradación de la celulosa.
Biológico	Degradación de lignina	Utilizando hongos o bacterias por tiempos prolongados se degrada la lignocelulosa.	Proceso lento, aunque tiene altos rendimientos y produce pocos compuestos tóxicos
Físico-químico	Des-lignificación oxidativa	Peroxidasas y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 20 °C por 8 h	Solubiliza aproximadamente el 50% de la lignina y casi la totalidad de la hemicelulosa.
	Explosión a vapor	Vapor saturado desde 160 °C a 260°C, y presión de 4.5x10 <sup>6</sup> Pa por varios minutos	Disminuye inhibidores, mejora la eficiencia de la posterior hidrólisis.

El uso de ácidos concentrados resulta menos atractivo para la obtención de azúcares, debido a la formación de compuestos inhibidores para los microorganismos utilizados durante los procesos de fermentación. Además, ocurren problemas de corrosión en los equipos, es difícil la recuperación del ácido y alto costo de mantenimiento operacional, lo que hace que el método sea de poco interés a escala comercial. Las condiciones de la hidrólisis en cada etapa deben ser estudiadas dependiendo del material a utilizar, La complejidad estructural y composición dependen del tipo de residuo que se esté utilizando (Chandler *et al.*, 2012).

La hidrólisis con ácido diluido es probablemente el método más utilizado. Es un método que puede ser utilizado como pretratamiento para la hidrólisis enzimática o bien, como un método para hidrolizar material lignocelulósico a azúcares (Mohammad y Karimi, 2007).

El rango común de concentración para el uso de ácidos diluidos es de 1 a 6%, la temperatura de 100 a 200 °C, y un tiempo de reacción de hasta 300 min. Si se aplican altas temperaturas y largos tiempos de reacción, los monosacáridos resultados de la hemicelulosa se degradan para formar compuestos de furano y ácidos carboxílicos. Por esta razón, se recomienda que el proceso de hidrólisis sea realizado en dos etapas (Saucedo *et al.*, 2010).

### **1.3.2 Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento**

Cuando los materiales lignocelulósicos se someten a condiciones severas durante el pretratamiento (alta temperatura, alta presión, ambiente ácido) puede darse cierta degradación de la lignina y de los azúcares, ya sean hemicelulósicos o celulósicos, generándose productos tóxicos que pueden afectar las siguientes etapas de hidrólisis y fermentación. La naturaleza y concentración de los compuestos tóxicos generados durante el pretratamiento dependen de la materia prima, del pretratamiento utilizado, de las condiciones del mismo y de la utilización o no de catalizadores. Atendiendo a su origen, los compuestos de degradación

pueden dividirse en tres grupos: derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos (Figura 1.6) (Tomas, 2010).

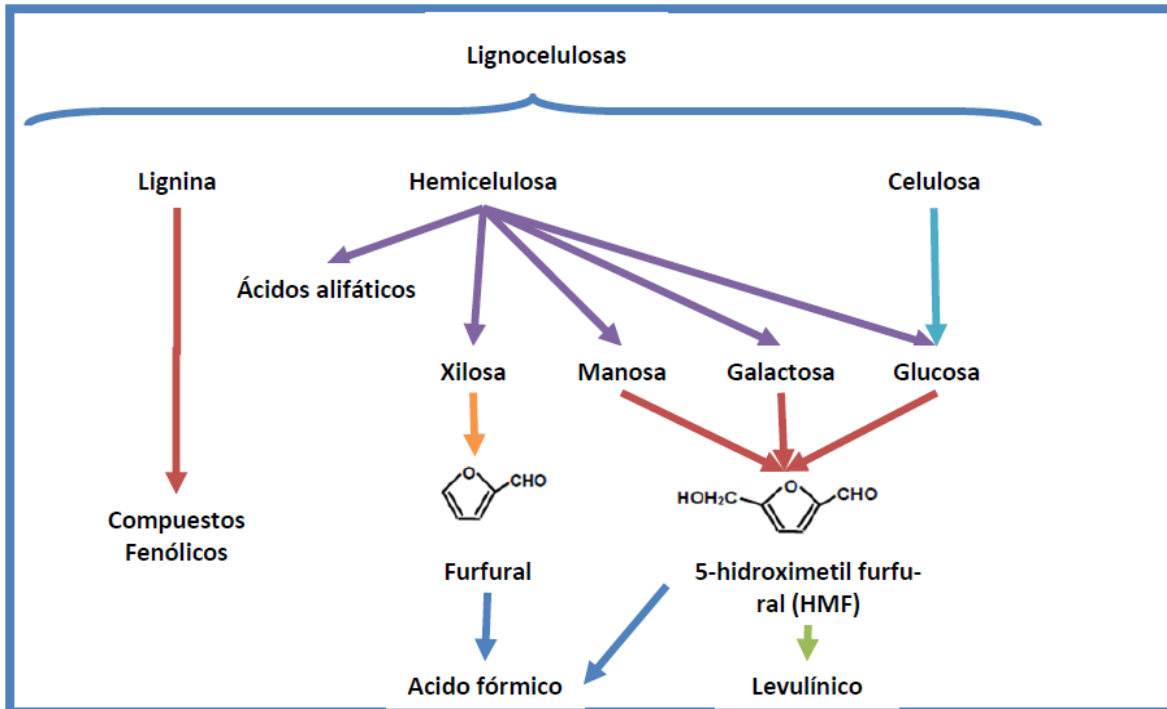


Figura 1.6. Principales productos de degradación originados en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Tomado de Tomas, 2010)

Los principales derivados del furano son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) que provienen de la degradación de las pentosas y hexosas, respectivamente. En anaerobiosis, la mayoría de los microorganismos fermentadores son capaces de reducir los furanos a sus correspondientes alcoholes de menor toxicidad. Los ácidos alifáticos generados durante el pretratamiento son principalmente el ácido acético, producido a partir de los restos acetilo de las hemicelulosas, y el ácido fórmico, procedente de la degradación del furfural e HMF (Mantilla, 2012).

El hidroximetilfurfural, HMF o 5-(Hidroximetil) furfural es un aldehído y un furano intermediario que se forma por la degradación de azúcares a elevadas temperaturas. Se ha demostrado que reduce la velocidad específica de crecimiento de diversos microorganismos, el rendimiento de masa celular y el

rendimiento volumétrico de etanol. Entre los intentos para evitar el efecto negativo de los inhibidores presentes en los hidrolizados, los métodos mejor establecidos para la desintoxicación del hidrolizado incluyen la adición de resinas de intercambio iónico, la adición de carbón activo, la desintoxicación enzimática utilizando lacasa y la adición de cal (Ruiz *et al.*, 2011).

Los efectos producidos por el furfural sobre los microorganismos son los mismos que los producidos por el HMF, pero debido a que tiene una mayor toxicidad este efecto es mayor (Larsson *et al.*, 2000).

El efecto tóxico ocasionado por los furanos parece deberse a que, al ser aldehídos, son compuestos químicamente reactivos que pueden formar compuestos con determinadas moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, o bien producir daños sobre la membrana plasmática. Además, el furfural produce la inhibición de enzimas glicolíticas y fermentativas (Zaldivar *et al.*, 1999).

#### **1.4 Azúcares reductores**

Azúcares reductores son aquellos que, como la glucosa, fructosa, lactosa y maltosa presentan un grupo carbonilo intacto su estructura y pueden reducir, en determinadas condiciones, a las sales cúpricas. Los monosacáridos y la mayoría de los disacáridos poseen poder reductor, que deben al grupo carbonilo que tienen en su molécula. Este carácter reductor puede ponerse de manifiesto por medio de una reacción redox llevada a cabo entre ellos y el sulfato de Cobre. Las soluciones de esta sal tienen color azul. Tras la reacción con el glúcido reductor se forma óxido de Cobre de color rojo. De este modo, el cambio de color indica que se ha producido la citada reacción y que, por lo tanto, el glúcido presente es reductor. Una prueba para identificar este tipo de azúcares es la de Fehling, cuya reacción se presenta en la Figura 1.7 (Espinosa, 2013).

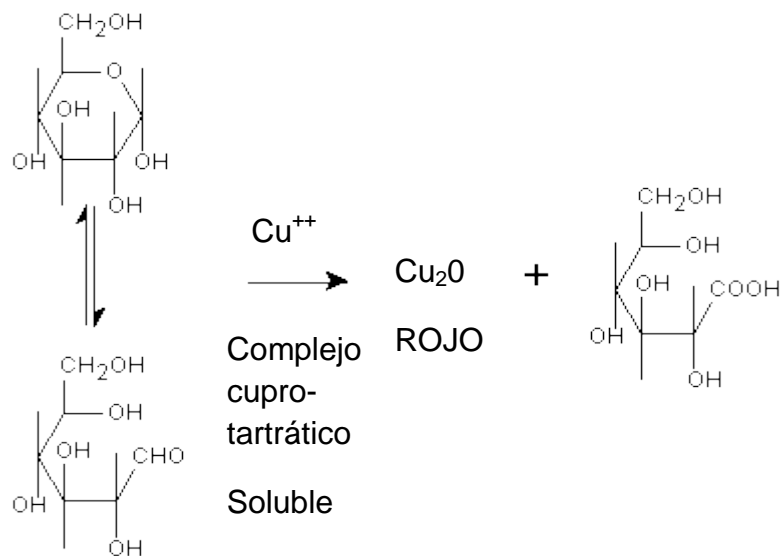


Figura 1.7. Prueba de Fehling

Los azúcares o carbohidratos pueden ser monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos reaccionan de acuerdo a los grupos hidroxilo y carbonilo que poseen. Los disacáridos y los polisacáridos se pueden hidrolizar para producir monosacáridos (espinosa, 2013).

## 1.5 Plásticos

### 1.5.1 Definición

Los plásticos son polímeros constituidos a partir de la condensación orgánica de diferentes monómeros con la pérdida de una molécula de agua. Los materiales plásticos se han convertido en una parte integral de la vida contemporánea y se están utilizando cada vez más debido a su durabilidad, facilidad de moldeo y resistencia a la biodegradación. Esta última propiedad, junto con el hecho de que los plásticos más comunes se producen a partir de fracciones de petróleo crudo no renovable, causa una gran preocupación. Los plásticos derivados del petróleo llevan varios cientos de años para degradarse y se acumulan en el medio ambiente a un ritmo de 25 millones de toneladas por año. Por otra parte, el reciclaje de plástico ofrece posibilidades limitadas y la incineración puede producir compuestos tóxicos (Joao *et al.*, 2009).

En cualquier plástico, dos parámetros son particularmente importantes: el punto de transición vítrea y el punto de fusión. Básicamente los polímeros derivados del petróleo y usados para constituir productos con propiedades plásticas (termoplásticos) son susceptibles de ser remodelados infinitamente cuando son calentados a temperaturas superiores al punto de transición vítrea, y al ser enfriados bajo ese punto, se portan como un sólido vítreo (Cerrone, 2011).

Los materiales más utilizados para crear objetos de uso diario son los plásticos. Desde su invención, los plásticos han tenido una gran aceptación debido a sus características. En la Tabla 1.2 se pueden observar algunas de sus ventajas y desventajas. El plástico es la tercera aplicación más extendida del petróleo después de la energía y el transporte, convirtiéndose en una fuente significativa de contaminación, pues su creciente consumo genera problemas de acumulación de grandes cantidades de este material. A esto se le suma que en su proceso de producción hay altos consumos de energía y emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera (Naranjo 2010).

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de los materiales plásticos (Naranjo 2010).

Ventajas	Desventajas
Tienen una baja densidad	Poca resistencia mecánica
Existen materiales plásticos permeables e impermeables	Limitada resistencia al calor
Son aislantes eléctricos	Inestabilidad dimensional
Son aislantes térmicos, aunque la mayoría no resiste temperaturas elevadas	Las reparaciones: no es práctico ni rentable reparar una pieza plástica, en muchos casos una reparación es imposible
Son resistentes a la corrosión y a la intemperie	La mayoría no se degrada fácilmente
Resisten muchos factores químicos	
Son fáciles de trabajar	
Sus costos de producción son bajos	

Los impactos ambientales negativos generados en todo el ciclo de vida de los materiales plásticos (como su dependencia del petróleo para su producción, la emisión de gases efecto invernadero durante su producción e incineración, el consumo energético y la acumulación y permanencia en el ambiente después de su vida útil, ya que no son biodegradables), hacen necesario el desarrollo de nuevos materiales que tengan propiedades similares a los plásticos sintéticos, pero que no generen tanto impacto negativo. Una alternativa interesante es la producción de biopolímeros. Las ventajas de estos materiales frente a los polímeros sintéticos son:

- Se producen a partir de fuentes renovables de carbono
- La mayoría son completamente biodegradables en cortos periodos de tiempo y no son tóxicos (Wolf *et al.*, 2005).

### **1.5.2 Clasificación de los plásticos**

Los plásticos pueden dividirse en tres grandes grupos: los termoplásticos, los elastómeros y los termoestables. Esta clasificación atiende a los comportamientos que presentan antes distintas situaciones físico-mecánicas. Los termoplásticos son los que adquieren propiedades plásticas (capacidad de deformación y moldeado estable por tiempo indefinido) una vez calentados por encima de su punto de fusión, y tras lo cual adquieren un estado viscoso-líquido que se mantiene hasta que se enfrían, adquiriendo aspecto sólido. En este grupo se engloban plásticos tales como el PVC (cloruro de polivinilo), HDPE (polietileno de alta densidad), o PP (polipropileno). Una de sus características principales es que precisamente en ese estado sólido asumen un comportamiento vítreo (Cerrone, 2011).

### **1.5.3 Consumo mundial**

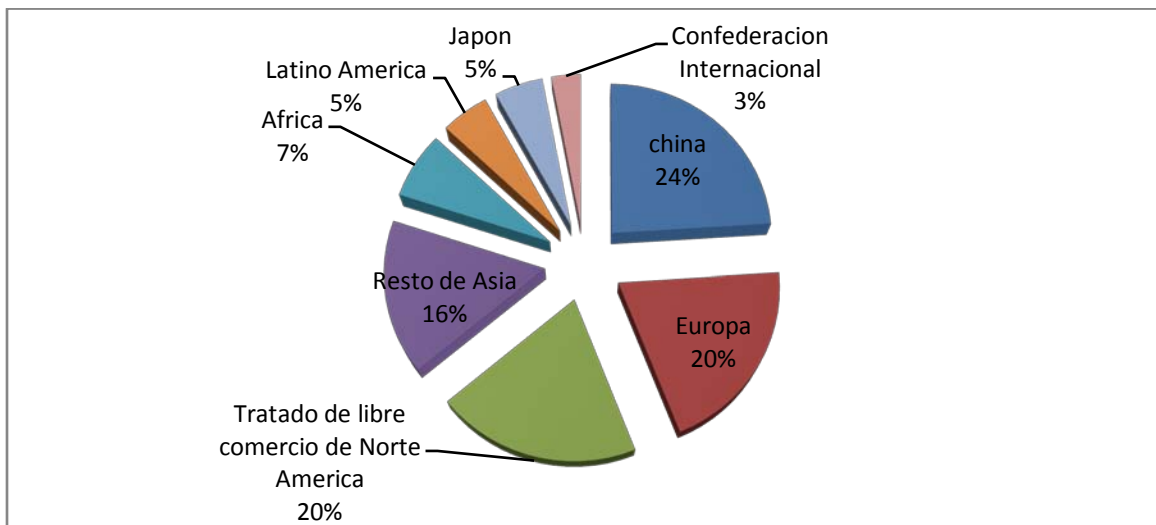
A partir de los años 50, La producción mundial de plásticos mostró una tasa de crecimiento anual promedio de 8.7%, un aumento de casi nueve veces desde la década de 1970, en comparación con un crecimiento de 4.5 veces para el aluminio

y 2.5 veces en acero. Estas diferencias pueden atribuirse a la evolución relacionada con la investigación, el descubrimiento de nuevas aplicaciones y materiales innovadores, y la sustitución gradual de otros materiales (es decir, metal, vidrio, etc.). La demanda en África, América Latina, Oriente Medio y China crecerá en un 54% (de 101 a 156 millones de toneladas), superior a la de Europa y los Estados Unidos (110 millones de toneladas). Datos obtenidos del estudio de la PlasticsEurope Italia 2013.

Se ha intentado atacar la problemática de la acumulación de plásticos en el ambiente a través de procesos de incineración, reciclaje, fotodegradación o reusó. Sin embargo, estas medidas presentan desventajas por lo que no se consideran como soluciones 100% efectivas. Por ejemplo, durante el proceso de incineración se puede desprender ácido cianhídrico y ácido clorhídrico con potenciales daños para la salud. En el caso del reciclaje, este es complicado y consume mucho tiempo, además de que la presencia de muchos aditivos en los plásticos, como pigmentos y cubiertas, limita el proceso (González *et al.*, 2013).

En la Figura 1.8 se puede observar el consumo y la demanda de plástico sintético utilizados en el mundo.

(a)





(b)

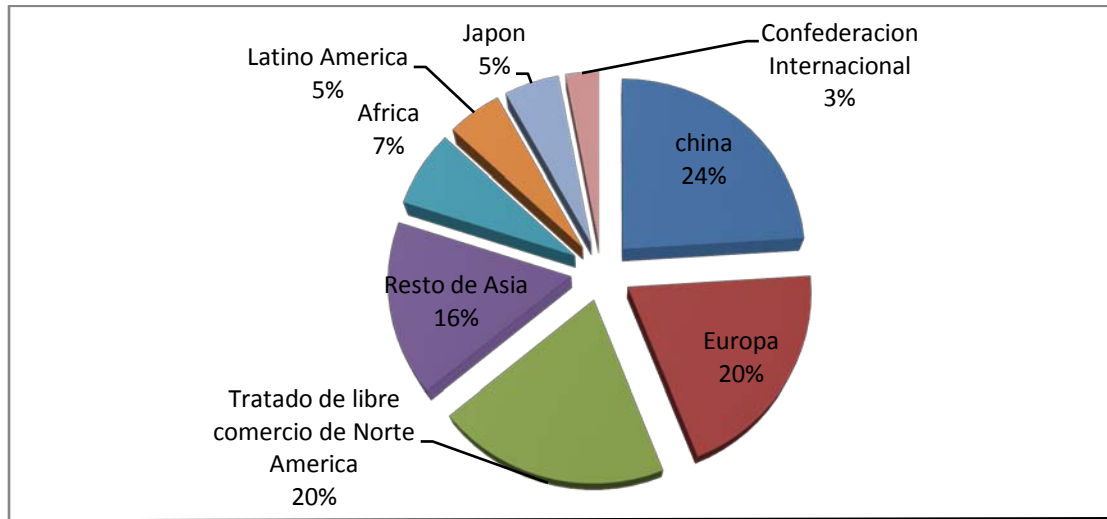


Figura 1.8(a) Consumos mundiales de polímeros sintéticos en el año 2013 y (b) demanda de polímeros sintéticos en el año 2013 (Tomadas de la PlasticsEurope Italia, 2013)

## 1.6 Bioplásticos, definición y características

Se considera bioplástico todo “aquél polímero con propiedades plásticas parecidas a la de un polímero termoplástico, pero que en lugar de proceder de petróleo, procede de una fuente orgánica renovable”. Toda la materia plástica derivada del petróleo es de por sí degradable: es cuestión de tiempo y condiciones ambientales, pero el problema radica en la lentitud del proceso.

Los requisitos que debe cumplir un material para ser considerado biodegradable se pueden consultar en el protocolo EN13432 establecido por la ISO (International Organization for Standardization) (Cerrone, 2011).

Los polímeros biodegradables se pueden clasificar en:

- Polímeros extraídos o removidos directamente de la biomasa: polisacáridos como almidón y celulosa; Proteínas como caseína, queratina, y colágeno

- Polímeros producidos por síntesis química clásica utilizando monómeros biológicos de fuentes renovables
- Polímeros producidos por microorganismos, bacterias productoras nativas o modificadas genéticamente

Entre los plásticos biodegradables, los más prometedores desde el punto de vista comercial son los derivados del almidón y la celulosa, y los polímeros producidos por microorganismos, como por ejemplo los polihidroxialcanoatos (PHA) cuya estructura se puede observar en la Figura 1.9, y los polímeros del ácido láctico (PLA) Figura 1.10.

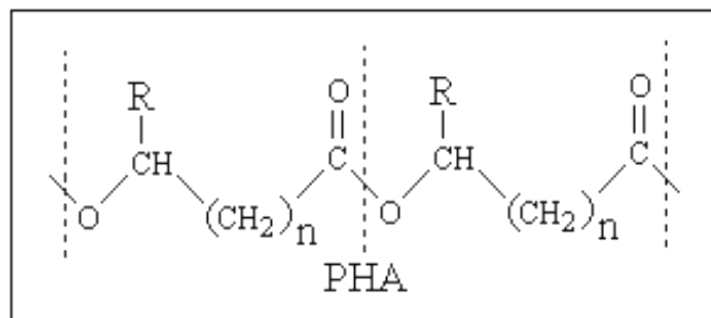


Figura 1.9 Estructura del PHA

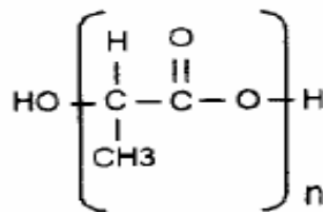


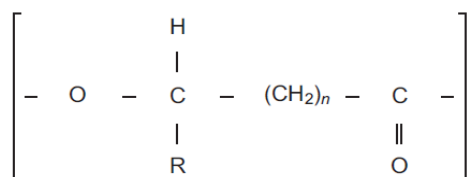
Figura 1.10. Monómero del ácido poli-láctico (PLA)

Entre todos los polímeros biodegradables con aplicación industrial anteriormente citados, los PHA han despertado un creciente interés, tanto a nivel científico como comercial, debido a que presentan propiedades similares a los termoplásticos convencionales y son completamente biodegradables, siempre que se encuentren

en el ambiente adecuado. Además, y a diferencia de los polímeros del ácido láctico (PLA), cuya producción supera actualmente a la producción de los PHA, son polímeros susceptibles de ser sintetizados mediante metabolismo bacteriano a partir de cualquier residuo, y por lo tanto con un costo cero desde el punto de vista económico y ambiental, ya que al convertir un residuo en un sustrato se consigue aprovechar un desecho. Por el contrario, la producción de PLA conlleva el uso de recursos agrícolas utilizados para el consumo humano directo (caso de plantas de maíz, por ejemplo) para obtener el almidón y posteriormente PLA, con el consiguiente agotamiento de los recursos naturales (Cerrone, 2011) en la Tabla 1.3 se comparan algunas de sus propiedades.

### 1.7 Definición, estructura y propiedades de los polihidroxicanoatos

Los PHA son polímeros de ácidos hidroxialcanóicos que algunas bacterias, arqueas y acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía. La estructura general y nomenclatura de estos compuestos se muestra en la Figura 1.11.



N	R	Nombre del polímero	Símbolo
1	Hidrógeno	Poli (3-hidroxipropionato)	PHP
	Metil	Poli (3-hidroxibutirato)	P3HB
2	Hidrógeno	Poli (4-hidroxibutirato)	P4HB
3	Hidrógeno	Poli (5-hidroxivalerato)	P5HV

Figura 1.11. Estructura general de los PHA, y ejemplos de su nomenclatura y símbolo según la longitud y posición de la cadena lateral (R)

Tabla 1.3 Propiedades de los PLA comparadas con las propiedades de los PHA  
(Chen, 2009)

Característica	PLA	PHA
Estructura de los monómeros	Solo D- y L- Ácido láctico (LA)	Al menos 150 monómeros
Métodos de producción	Bioproducción de LA y síntesis química de PLA	Biosintetizado totalmente como poliéster intracelular.
Costos de producción	Es comparable con los plásticos convencionales como el PET	Al menos el doble del de PLA
Propiedades del material	Poco controlable, flexible o elástico, puede ser ajustado por regulación de la relación D- y L-LA	Totalmente controlable, flexible, elástico
Madurez de la tecnología	Producción de la establecida, su polimerización a PLA es complicada aun, solo una compañía NatureWorks, produce PLA a gran escala	Al menos 10 compañías a nivel mundial produjeron o producen PHA cerca de 2000 toneladas por año mediante fermentación microbiana
Inversión	Inversión de capital alto: NatureWorks ha invertido 1 billón de dólares en los últimos años para correr en la planta 140 000 toneladas de PLA	Inversión pequeña: hay plantas de fermentación microbiana aeróbica con procesos modificados que pueden ser usados para la producción de PHA
Propiedad intelectual	Están cubiertas casi todas las áreas de producción y aplicación	Existen varios espacios por explorar
Áreas de aplicación	Empaque, implantes médicos, impresión	En la mayoría de las áreas plásticas convencionales, limitado solo por sus altos costos de producción.

Los PHA poseen, en general, características fisicoquímicas similares a las de los poliésteres sintéticos. Los homopolímeros como el PHB suelen ser materiales muy cristalinos y rígidos, pero los heteropolímeros de hidroxibutirato – hidroxivalerato son más dúctiles y resistentes. La adición de monómeros de hidroxivalerato disminuye el punto de fusión, pero aumenta su biodegradabilidad. Los copolímeros PHBV suelen formarse cuando se utilizan mezclas de sustratos, como glucosa y valerato (Rivera- Mackintosh *et al.*, 2009).

Los PHA son biodegradables, respetuosos del medio ambiente y termoplásticos biocompatibles.

Se acumulan como polímeros, móviles y amorfos en forma de gránulos que se alojan en el citoplasma microbiano, rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene enzimas polimerasas y despolimerasas como se observa en la Figura 1.12.

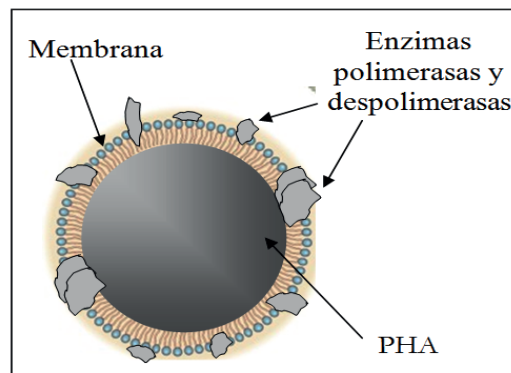


Figura 1.12. Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente (Tomado de Verlinden *et al.*, 2007)

### 1.7.1 Biosíntesis de PHA

Numerosas bacterias tienen la capacidad de sintetizar PHA como material de reserva y fuente de poder reductor. A pesar de conseguir un biopolímero parecido, las rutas metabólicas implicadas se diferencian tanto en base al tipo de bacteria como por el sustrato empleado (Cerrone, 2011).

### 1.7.1.1 Rutas de biosíntesis de PHA en microorganismos

Dentro de los polihidroxicanoatos el PHB ha sido el más estudiado, por lo que su mecanismo de síntesis es conocido. En los distintos microorganismos la ruta más común de biosíntesis ocurre como se describe en la Figura 1.13.

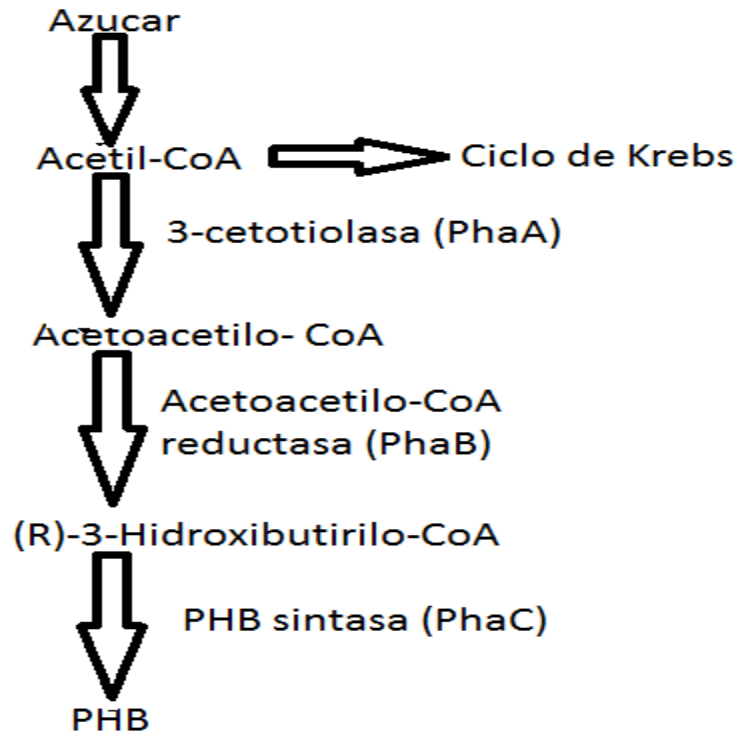


Figura 1.13. Ruta metabólica para la síntesis de PHB a partir de carbohidratos

Las rutas metabólicas para la biosíntesis de PHB también han sido estudiadas en otras bacterias y las enzimas involucradas en el proceso también han sido caracterizadas. La enzima 3-cetotiolasa de bacterias como *Azotobacter beijerinckii*, *Ralstonia eutropha*, *Zooglea ramigera* y *Rhizobium japonicum* ha sido purificada y estudiada. Esta enzima ha mostrado ser la que controla la biosíntesis de PHB en *R. eutropha*, con la CoA como el metabolito clave. Por su parte, la enzima acetoacetil-CoA reductasa ha sido investigada en las bacterias *Azotobacter beijerinckii*, *Rhodospseudomonas spheroides*, *Rhodomicrobium vannielii* y *Streptomyces coelicolor* (Gonzalez et al., 2013).

Muchos estudios se han centrado en la producción de PHA en bacterias por su uso potencial como un termoplástico biodegradable. *Ralstonia eutropha* (antes, *Alcaligenes eutrophus*) es la bacteria que con mayor frecuencia ha sido empleada para la producción de PHAs con monómeros de cadena de longitud corta (4 o 5 carbonos). El Poli-3-hidroxi-butirato es un homopolímero de 3-hidroxi-butirato, es el más extendido y mejor caracterizado miembro de los PHA. Los genes de biosíntesis de PHB de *R. eutropha* se clonaron en *E. coli* y se secuenciaron y caracterizaron en detalle. Los tres genes forman un operón en el orden de PHB-C-A-B, de codificación para PHB sintasa, cetotilasa y NADPH dependiente de acetoacetyl-CoA reductasa, respectivamente. Durante los estudios de clonación, se demostró que estos tres genes se expresaron constitutivamente a partir del promotor nativo de *R. eutropha*. Ésta bacteria tiene varias ventajas sobre *R. eutropha*, tales como la capacidad de utilizar varias fuentes baratas de carbono, fácil recuperación de PHB, y no degradación de PHB (Shi *et al.*, 2001).

### 1.7.2 Aplicación de los PHA

Al principio de los años 80, varias compañías intentaron producir varios PHA, tanto a nivel piloto como industrial basados en la suposición de que el precio del petróleo se incrementaría, al igual que este se acabaría al no ser un recurso renovable, y las personas tendrían que empezar a usar un plástico no-petroquímico amigable con el ambiente (Chen, 2009).

Los PHA exhiben pesos moleculares relativamente altos, características termoplásticas o elastoméricas y otras propiedades físicas y mecánicas que los hacen candidatos para varias aplicaciones en la industria de empaques, medicina, farmacia, agricultura y alimentos (Cerrone, 2011).

En el caso del polihidroxi-3-Butirato (PHB), que es un termoplástico con propiedades similares al polipropileno, se usa principalmente para técnicas de moldeado. En cambio, los copolímeros de P (3HBco3HV), tienen aplicaciones como material de empaque, productos higiénicos, agrícolas y biomédicos. La aplicación más conocida de estos biopolímeros de cadena corta es para la

fabricación de botellas desechables para champú, contenedores para productos alimenticios, bolsas y otros productos desechables como pañales, servilletas, rastrillos, vasos y cubiertos (González *et al.*, 2013).

También es posible usarlos en la forma de látex acuoso para cubierta de materiales fibrosos como papel o cartón. Debido a su resistencia al agua, ésta cubierta protege al papel o cartón contra el deterioro causado por la humedad. Otra aplicación de interés es su uso como material de empaque, dado que estos PHA presentan una baja difusividad de oxígeno (González *et al.*, 2013).

### 1.8 Antecedentes

Tripathi *et al.*, (2013) realizaron la optimización de 3 variables físicas del proceso en la producción de PHB, las variables a optimizar fueron: pH, temperatura y velocidad de agitación. La experimentación se realizó en un reactor tipo lote con capacidad de trabajo de 5.6 L utilizando melaza de caña y urea como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente. Como bacteria de producción de PHB usaron *Alcaligenes sp.* Las condiciones de operación óptima con las que obtuvieron una biomasa máxima de  $11 \text{ g L}^{-1}$  y un contenido de PHB de  $8.8 \text{ g L}^{-1}$  después de 48 h de fermentación (productividad de  $0.19 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) fueron una temperatura de  $34.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , 6.54 pH y una velocidad de agitación de 3.13 Hz.

Chandler (2012) realizó una investigación para obtener azúcares fermentables del bagazo de caña de azúcar mediante hidrólisis ácida diluida en dos etapas. La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor autoclave de 100mL de capacidad, con ácido sulfúrico al 1% v/v, relación líquido-sólido de 15:1 y tiempo de reacción de 3 min. La primera etapa de la hidrólisis se realizó en un rango de temperatura de  $100\text{-}160^\circ\text{C}$  y en la segunda etapa se emplearon dos temperaturas: 160 y  $180^\circ\text{C}$ , manteniendo constantes el resto de las condiciones. Se encontró que la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la producción de azúcares reductores, así como en la generación de algunos subproductos que pueden resultar tóxicos para los microorganismos. Los mejores valores de temperatura para la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar mediante dos etapas secuenciales



por carga fueron 140°C para la primera etapa y 180°C para la segunda. La presencia de furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético y compuestos fenólicos indica que se producen reacciones de degradación asociadas tanto a pentosas como hexosas derivadas de la hidrólisis de la hemicelulosa y la celulosa respectivamente.

Annarita *et al.* (2011), estudiaron la síntesis, producción y aplicación biotecnológica de exopolisacáridos y polihidroxicanoatos por diferentes especies de arqueas. Utilizaron arqueas debido a que esta familia de microorganismos están dentro de los llamados extremófilos, los cuales pueden soportar mayores temperaturas que otros microorganismos, al igual que soportan presiones, pH, salinidad, toxicidad, y niveles de radiación, que resultan inhabitables para otros microorganismos. Como resultados encontraron que el candidato ideal para producir PHA es haloarquea en un medio salinizado con el cual obtuvieron 6 g de PHA por litro (cada litro tiene 10 g de fuente de carbono). El medio salinizado evita el crecimiento de otros microorganismos contaminantes reduciendo así los requerimientos de esterilización del medio y por tanto reduciendo los costos de producción. Adicionalmente es relativamente fácil recuperar PHA de la bacteria haloarquea, comparado con otras bacterias acumuladoras de estos bioplásticos.

El polihidroxibutirato (PHB) es ampliamente utilizado como biomaterial, para cuestiones médicas o aplicación en la ingeniería, aunque tiene una cristalinidad relativamente alta que limita su aplicación. Rodman *et al.*, (2011) estudiaron la aplicación de etil-celulosa (EtC) al PHB para modificar sus propiedades. Encontraron que al agregar EtC reducía la cristalinidad del PHB y promovían su degradación mediante condiciones fisiológicas, esto sin alterar su biocompatibilidad, y manteniendo una fuerza del material compuesto de  $6.5 \pm 0.6$  Mpa con un 40% (p/p) de EtC. De esta manera se hace más eficiente el PHB para poder moldearlo y sirva como soporte para biomedicamentos.

Rodman *et al.*, (2011) aplicaron PEG (polietilen-glicol) al biopolímero PHB de esta manera observaron cómo afecta la cristalinidad, la cual lo vuelve un material muy

quebradizo. Como resultados obtuvieron una reducción de la cristalinidad, del 70%, en el cual, se encuentra el PHB naturalmente, al 41.5% con una mezcla del 30 % (p/p) de PEG. La mezcla vuelve más maleable el material, incrementando la flexibilidad de las películas con una extensión al quiebre de  $2.49 \pm 1.01\%$  para biopelículas de PHB y  $8.32 \pm 1.06\%$  para películas que contienen un 30% (p/p) de PEG. De esta manera se concluyó que la adición de PEG al biopolímero aumenta sus ventajas para poder utilizarlo de una manera más eficiente tanto en las aplicaciones médicas como en cuestiones de ingeniería.

Almeida *et al.*, (2010) comprobaron que al analizar la producción de PHB, la cantidad de polímero acumulado en los cultivos con glucosa como fuente de carbono acompañó el crecimiento de las bacterias, es decir, a niveles altos de aireación (250 rpm) observó su mayor acumulación de PHB (6.32 g/L). De esta manera concluyó que las condiciones óptimas de agitación durante la producción de PHB si afectan de manera significativa.

Naranjo (2010) estudió la obtención de polihidroxiburato a partir de residuos agroindustriales utilizando 2 microorganismos: *Cupriavidus necator* NCIMB 11842 (microorganismo de referencia de la American Type Culture Collection 17697) y *Bacillus megaterium* (un microorganismo nativo aislado de los estuarios de Bahía Blanca Argentina) y usando glicerol como única fuente. Los resultados que obtuvo para la producción de PHB fueron muy parecidos en ambos microorganismos, la única diferencia marcada fue, en el tiempo de crecimiento microbiano. Mientras que en la fase estacionaria por el *C. necator* era alcanzada después de 140 horas, el *B. megaterium* la alcanzaba después de 30 h aproximadamente. Marcando como mejor el *B. megaterium* por estabilizarse en menor tiempo. Utilizando glicerol al 98 % de pureza los costos de producción del PHB oscilaban entre 1.937 a 2.384 dólares/Kg contra los 0.5 dólares/Kg que cuesta producir un plástico sintético.

**CAPÍTULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Obtención de la materia prima

El bagazo de *Agave angustifolia* Haw fue obtenido de una fábrica ubicada en Santiago Matatlán, Tlacolua, Oaxaca. Se tomaron las muestras del área de desecho, depositándose en costales de rafia para su almacenamiento, transporte y posterior utilización.

La metodología general que se siguió en el presente trabajo se presenta en la Figura 2.1.

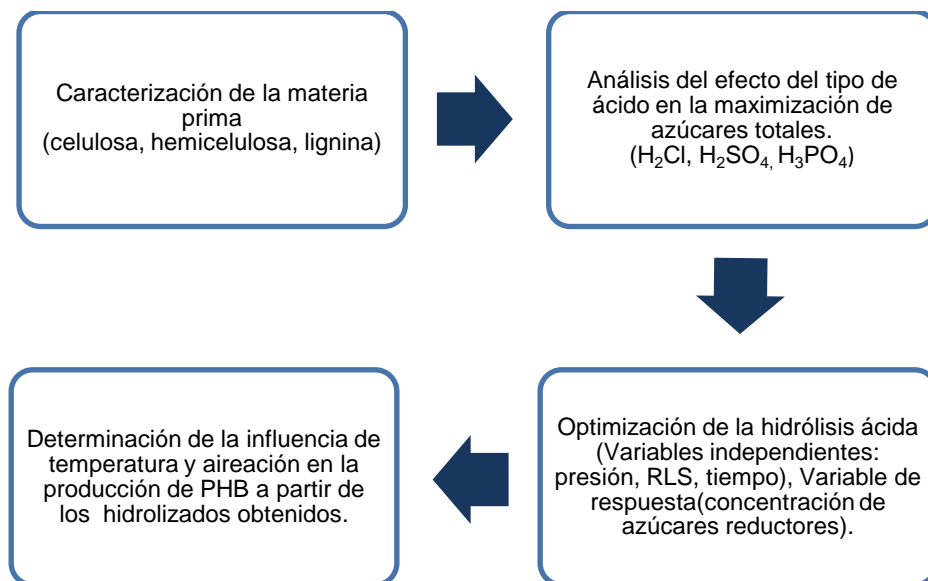


Figura 2.1 Metodología general para la obtención de PHB

### 2.2 Caracterización de la materia prima

Para la etapa inicial de la caracterización, se realizaron análisis de humedad, cenizas del material, así como la cuantificación de la fibra presente (celulosa, hemicelulosa y lignina). En la Tabla 2.1, se enlistan las pruebas realizadas y los métodos empleados.

Tabla 2.1. Parámetros para la caracterización del bagazo de agave

Prueba	Método
Hemicelulosa	Fibra detergente neutro y ácido (ANKOM)
Celulosa y lignina	Fibra detergente ácido-lignina (ANKOM)
Humedad	AOCS Ab 2-49
Cenizas	AOCS Ba 5 <sup>a</sup> -49

### 2.3 Diseño univariable para la elección del ácido a utilizar en la hidrólisis ácida

Se realizó un diseño de experimentos univariable realizando una réplica de la experimentación para elegir el ácido con el cual se obtendría la mayor cantidad de azúcares totales de la materia prima. Los ácidos empleados fueron HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

El experimento se llevó a cabo en una autoclave marca AESA modelo CV250, a una presión de 1.2 Kg cm<sup>-2</sup>, una concentración de 2% v/v de los ácidos, en una relación sólido-líquido de 1:12, durante 40 min.

El hidrolizado ácido se filtró con tela de manta para recuperar la mayor cantidad.

#### 2.3.1 Caracterización de las muestras de hidrolizado ácido

La cuantificación de azúcares reductores se realizó mediante el método de DNS, descrito en el anexo C.

### 2.4 Optimización de la hidrólisis ácida

Después de determinar que ácido produce la mayor cantidad de azúcares totales, se realizó un diseño de experimentos Box-Behnken para optimizar el tratamiento de hidrólisis. Se consideraron como variables independientes: (a) tiempo de

residencia (20, 30, 40 min), (b) Presión de autoclave (1.0, 1.2, 1.4 Kg cm<sup>-2</sup>) y (c) RSL (1:10, 1:12, 1:14), siendo la variable de respuesta la concentración de azúcares reductores obtenida (g).

Se pesaron 10 g de muestra de bagazo. El ácido se empleó a una concentración del 2 % v/v, el tiempo de residencia, la presión del autoclave y la RSL dependió del número del experimento realizado, como se puede observar en el Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Diseño Box-Behnken para la optimización de la hidrólisis ácida

<b>Número de experimento</b>	<b>Tiempo de residencia (min)</b>	<b>Presión (Kg cm<sup>-2</sup>)</b>	<b>RSL</b>
1	20	1.0	1:12
2	20	1.4	1:12
3	40	1.0	1:12
4	40	1.4	1:12
5	20	1.2	1:10
6	20	1.2	1:14
7	40	1.2	1:10
8	40	1.2	1:14
9	30	1.0	1:10
10	30	1.0	1:14
11	30	1.4	1:10
12	30	1.4	1:14
13	30	1.2	1:12
14	30	1.2	1:12
15	30	1.2	1:12

La cuantificación de azúcares reductores se realizó mediante el método de Fehling, descrito en el Anexo D.

### **2.4.1 Diseño univariable empleando diferente relación sólido-líquido (RSL)**

En virtud de que el análisis de diseño de experimentos B.B mostró que la variable más significativa era la RSL, se realizó un diseño de experimentos univariable modificando la RSL a 1:12, 1:14, 1:16 y 1:18. Esta experimentación se llevó a cabo con un tiempo de 30 min en el autoclave y con HCl al 2% v/v. Se realizó a 2 diferentes presiones: a 1.4 y 1.5 Kg cm<sup>-2</sup>. Estas condiciones de presión se establecieron debido a que el análisis de los resultados obtenidos del primer diseño Box-Behnken permitió establecer que las mejores condiciones de trabajo se encuentran a presiones mayores. Se limitó el estudio a 1.5 Kg cm<sup>-2</sup> debido a las limitaciones del autoclave para trabajar en presiones mayores.

### **2.4.2 Diseño Box-Behnken con variables modificadas**

Debido a los resultados obtenidos del diseño de experimentos planteado en la sección 2.4.1, se propuso realizar un diseño de experimentos B.B utilizando como puntos centrales del diseño los valores que presentaron el mejor rendimiento, es decir 1:14 de RSL y 1.4 Kg cm<sup>-2</sup> como presenta en las Tablas 3.5 y 3.6. De igual manera, la variable tiempo se modificó a un rango que permitiera observar su efecto en la obtención de azúcares.

En la Tabla 2.3 se pueden observar las condiciones con las que se trabajó el segundo planteamiento del diseño Box-Behnken. Se utilizó la misma metodología planteada en el apartado 2.4

El hidrolizado ácido se filtró para cuantificar mediante HPLC azúcares de xilosa y glucosa. También el ácido acético derivado de la descomposición de pentosas y hexosas se cuantificó utilizando la metodología descrita en el Anexo A. De igual manera se realizó un comparativo con los métodos de Fehling y DNS descritos en los Anexos C y D.

Tabla 2.3 Segundo diseño Box Behnken para la obtención de azúcares reductores

Exp.	Variables codificadas			Variables naturales		
	Tiempo	Presión	RSL	Tiempo (min)	Presión (Kg cm <sup>-2</sup> )	RSL
1	-1	-1	0	40	1.3	1:14
2	-1	1	0	40	1.5	1:14
3	1	-1	0	80	1.3	1:14
4	1	1	0	80	1.5	1:14
5	-1	0	-1	40	1.4	1:12
6	-1	0	1	40	1.4	1:16
7	1	0	-1	80	1.4	1:12
8	1	0	1	80	1.4	1:16
9	0	-1	-1	60	1.3	1:12
10	0	-1	1	60	1.3	1:16
11	0	1	-1	60	1.5	1:12
12	0	1	1	60	1.5	1:16
13	0	0	0	60	1.4	1:14
14	0	0	0	60	1.4	1:14
15	0	0	0	60	1.4	1:14

## 2.5 Obtención del biopolímero

La obtención del biopolímero tenía como antecedente el estudio realizado por Vázquez (2013), quien produjo PHB utilizando la bacteria *Bacillus* IBT42 y evaluó los efectos de las variables: concentración de carbono, relación C:N (carbono, nitrógeno) y relación C:P (carbono, fósforo). La producción requiere de una serie de etapas que se describen a continuación.

### 2.5.1 Acondicionamiento de hidrolizados

Para el crecimiento de la bacteria *Bacillus sp.* IBT42, los hidrolizados obtenidos se ajustaron a pH 7 con hidróxido de Calcio, 90% de pureza. Enseguida se centrifugaron durante 10 min, a 3000 rpm para separar los residuos sólidos. Finalmente se ajustó la concentración de Carbono a 14 g L<sup>-1</sup> realizando una dilución con agua destilada.



### 2.5.2 Activación de la cepa de *Bacillus sp.* IBT42

Para activar la cepa bacteriana, se realizó la hidratación de las células liofilizadas con aproximadamente 400  $\mu\text{L}$  de medio LB líquido (el método de preparación del medio se muestra en el Anexo E). Enseguida, la suspensión de células se sembró en cajas Petri preparadas previamente con medio LB sólido, la solución se distribuyó uniformemente en las cajas con ayuda de perlas de vidrio esterilizadas y, finalmente, se llevó a incubación a 30 °C durante 24 h.

### 2.5.3 Preparación de los medios de cultivo

Se preparó un medio de cultivo utilizando como fuente de carbono el hidrolizado ácido óptimo de bagazo de agave, obtenido a partir de la metodología descrita en el apartado 2.4. El medio se suplementó con una fuente de nitrógeno orgánico (utilizando una solución base de extracto de levadura a 75 g L<sup>-1</sup>), y una fuente de fósforo (empleando una solución base de 0.8 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.2 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Los medios se enriquecieron además con un volumen correspondiente al 0.1% del sulfato de fierro a 5 g L<sup>-1</sup> y cloruro de magnesio a 160 g L<sup>-1</sup>. La concentración de las fuentes de nitrógeno y fósforo se ajustó a una relación C:N y C:P de 1:0.1618 y 1:0.1451 respectivamente, los cuales fueron los valores óptimos para el crecimiento reportados por Vázquez (2013).

### 2.5.4 Preparación del pre inóculo

Las células de la bacteria *Bacillus sp.* IBT42 se inocularon en matraces estériles de 500 mL con 100 mL del medio de cultivo preparado como se establece en el apartado 2.5.3, incubándose por 18 h a 30 °C y 200 rpm. Una vez que la bacteria creció en el medio de cultivo, se determinó el volumen a agregar a cada matraz en función de la biomasa producida. La biomasa fue cuantificada midiendo la turbidez de la suspensión con ayuda de un espectrofotómetro a 600 nm. Se determinó la cantidad de biomasa producida y a cada matraz se le agregó 1% del volumen del matraz de biomasa.

### 2.5.5 Inoculación de la bacteria *Bacillus sp.* IBT42

Los matraces con el medio de cultivo se inocularon con volúmenes iguales del pre inóculo para garantizar cantidades iniciales similares de biomasa (1%). Los medios se prepararon utilizando los hidrolizados ácidos del bagazo de agave como fuente de carbono, la cantidad utilizada se expresa como  $\text{g L}^{-1}$  de Azúcares Reductores (AR), como se describe en el apartado 2.5.3.

### 2.5.6 Determinación de la influencia de la temperatura y aireación en la producción de PHB mediante un diseño de experimentos

Los azúcares y subproductos obtenidos en la hidrólisis ácida del bagazo de agave se utilizaron como sustrato para la producción de PHB, y se evaluaron las variables de temperatura y aireación, en la etapa de crecimiento bacteriano para aumentar la biomasa, y en la etapa de producción de PHB para aumentar la cantidad de este biopolímero. Se utilizó la bacteria *Bacillus sp.* IBT42, aislada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Adaya, 2010).

Se utilizó un diseño de experimentos  $2^2$  con 5 puntos centrales para cada una de las etapas, como se puede observar en la Tabla 2.3. La adición de puntos centrales es un método utilizado para replicar ciertos puntos en un diseño factorial  $2^k$  y de esta manera proteger el diseño contra la curvatura, además de permitir obtener estimaciones de error independiente. Se consideraron dos variables independientes con dos niveles cada una: (a) aireación (baja y alta) y (b) temperatura (23 °C, y 37 °C).

Los puntos centrales se evaluaron con aireación media y con una temperatura de 30 °C. El diseño factorial queda gráficamente como se observa en la Figura 2.2.

Para las condiciones de aireación baja se utilizó un volumen de llenado del matraz a 2/5 (100 mL) en matraces de 250 mL, para la aireación media un llenado de 1/5 (50 mL) del volumen y para la alta se utilizaron matraces de 250 mL con 3 deflectores como se muestra en la Figura 2.3.

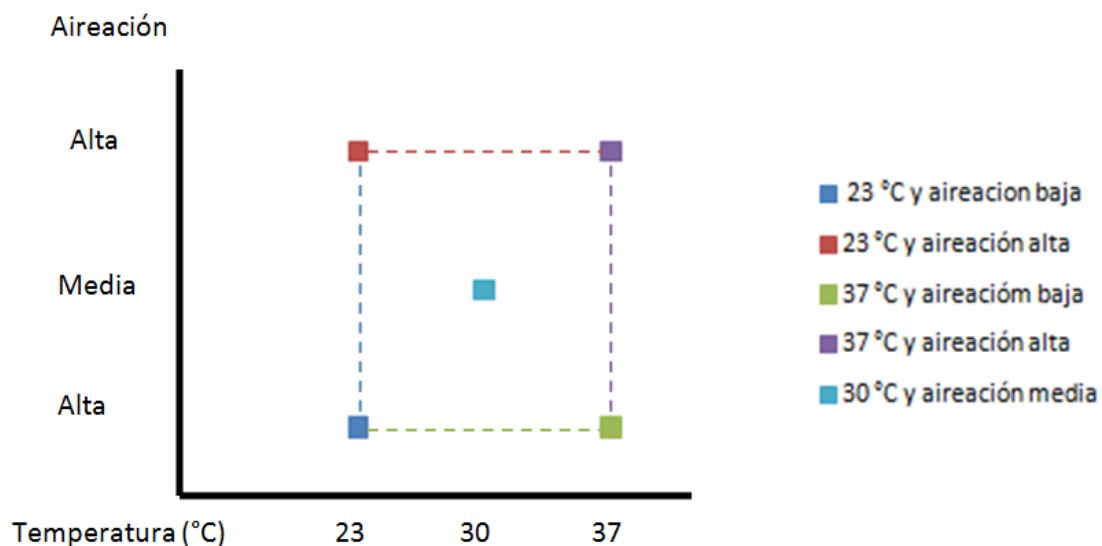


Figura 2.2 Diseño  $2^2$  con 5 puntos centrales para la producción de PHB en las etapas de crecimiento bacteriano y producción de PHB



Figura 2.3 Matraz con deflectores

La razón por la que se ocupan diferentes llenados es para que exista una diferencia en la relación superficie de aireación/volumen, lo que modifica la cantidad de oxígeno disponible para las bacterias. Se optó por realizarlo de esta manera, ya que esta es la forma más sencilla de variar la oxigenación en las incubadoras utilizadas.

Las variables dependientes fueron la cantidad de biomasa producida ( $\text{g L}^{-1}$ ) y la cantidad de biopolímero producido ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (empleando hidrolizados de residuos de *A. angustifolia* como fuente de carbono).

Tabla 2.4 Diseño  $2^2$  con 5 puntos centrales

Experimento	Aireación	Temperatura (°C)
1	Baja	23
2	Alta	23
3	Baja	37
4	Alta	37
5	Media	30
6	Media	30
7	Media	30
8	Media	30
9	Media	30

Para ajustar las concentraciones de AR y nutrientes se utilizaron las cantidades mostradas en la Tabla 2.5

Tabla 2.5 Dosis de nutrientes y fuente de carbono para la preparación de los medios de cultivo.

Componente	Cantidad (mL)
Hidrolizado ácido de bagazo de <i>Agave angustifolia</i> Haw	21.605
Extracto de levadura (75 g L <sup>-1</sup> )	7.026
Mezcla de fosfatos (ver sección 2.5.3)	7.202
H <sub>2</sub> O	14.067

A cada medio se le adicionó una cantidad fija del 1% del volumen final de soluciones de MgCl<sub>2</sub> y FeSO<sub>4</sub> a 160 g L<sup>-1</sup> y 5 g L<sup>-1</sup> respectivamente.

Para los experimentos 1 y 3 se utilizó el doble de las cantidades descritas en la Tabla 2.5. Esto se debió a que al aumentar el volumen a 100 mL no se debían

alterar las relaciones en cuanto a concentración de los componentes, sino simplemente el nivel de la aireación y su disponibilidad para las bacterias.

### **2.5.7 Extracción del PHB**

Para la extracción del PHB se tomaron muestras de 1 mL de los cultivos al comienzo de la inoculación (tiempo 0) y a las 18, 24 y 36 h de fermentación. Se centrifugaron a 13 000 rpm por 10 min, para separar las células. Cada paquete celular se trató con 1 mL de NaClO comercial diluido al 30%, y se incubó a 30 °C por 1 h. El polímero se recuperó por centrifugación desechando el sobrenadante. El polímero precipitado se lavó con 1 mL de agua, 1 mL de etanol absoluto y 1 mL de acetona, centrifugando a 13 000 rpm por 20 min, desechando el líquido en cada ocasión.

### **2.5.8 Cuantificación del PHB**

Para la cuantificación del PHB, el polímero resultante del proceso de extracción se disolvió en 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, calentándolo a 95°C por 10 min, lo que permite la conversión del polímero en ácido crotónico. Finalmente, se cuantificó la absorbancia de las muestras a  $\lambda=235$  nm, en una celda de cuarzo, para estimar la concentración de ácido crotónico (Law y Slepecky, 1961).

La determinación del consumo de las fuentes de carbono se realizó por el método de DNS, explicado en el Anexo C al finalizar el proceso.

### **2.5.9 Cuantificación del crecimiento bacteriano**

La determinación de la biomasa se realizó estimando el contenido en proteína de las células obtenidas por centrifugación de las muestras de los cultivos. La proteína se cuantificó por el método de Lowry *et al.*, (1951) (Anexo B). Se utilizó una curva patrón de proteína albúmina bovina como se puede observar en la Figura 2.4.

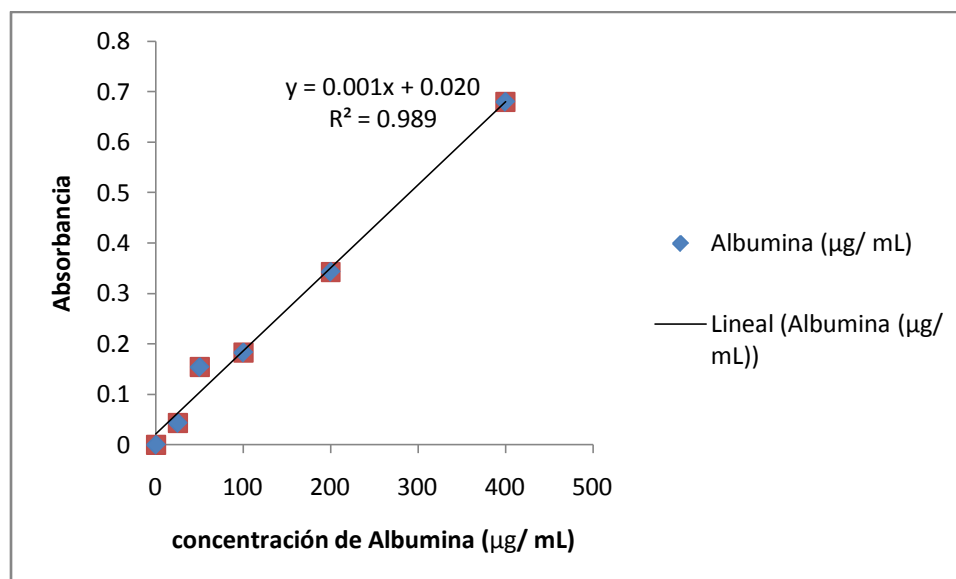


Figura 2.4 Curva patrón para la cuantificación de crecimiento bacteriológico

### 2.5.10 Cuantificación de azúcares reductores

Las muestras obtenidas al final de cada una de las experimentaciones se sometieron a cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS, descrito en el anexo B2, esto con el objetivo de saber la cantidad de azúcares consumidos por la bacteria y sus rendimientos en crecimiento y producción de PHB

### 2.5.11 Estudio del efecto de una realimentación con diferentes componentes

En 8 matraces se iniciaron los experimentos de acuerdo a lo establecido en los apartados 2.5.1 al 2.5.5, a las temperaturas y aireaciones propuestas en la Tabla 2.3. Se tomaron 2 muestras de 1 mL a las 18 h de la fermentación en cada uno de los matraces para la cuantificación de PHB, crecimiento bacteriológico y azúcares reductores (las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 13000 rpm y después se sometieron a congelación), se realizó una realimentación de 10 mL con diferentes condiciones para cada matraz como se muestra en la Tabla 2.6. Esta realimentación se realizó con el objetivo de aumentar la cantidad de azúcares reductores disponibles para la bacteria *Bacillus sp.* IBT42

Tabla 2.6 Tipo de realimentación en alimentación continua.

No. Matraz	Tipo de alimentación	Muestra
1	Carbono	C1
2	Carbono	C2
3	Carbono: Nitrógeno	CN1
4	Carbono: Nitrógeno	CN2
5	Carbono: Fosforo	CP1
6	Carbono: Fosforo	CP2
7	Carbono: Nitrógeno: Fosforo	CNP1
8	Carbono: Nitrógeno: Fosforo	CNP2

Se tomaron 2 muestras de 1 mL a las 24 h de la fermentación y se volvieron a realimentar 10 mL de la realimentación para cada uno de los matraces. Finalmente se tomaron muestras a las 36 h de la fermentación y se cuantificaron azúcares reductores, PHB y proteína para todas las muestras recolectadas. De acuerdo con lo establecido en las secciones 2.5.7 al punto 2.5.10.

#### 2.5.12 Estudio del efecto del tiempo de la realimentación

Con los datos obtenidos en la experimentación de la Tabla 2.5 se realizó una realimentación con el tipo de alimentación que presentó los mejores resultados. La realimentación se realizó a diferentes horas de la fermentación, se realizaron las realimentaciones a las 14 y 16 horas y se tomaron muestras a las 18 y 24 h para ambos casos se realizó por duplicado, se cuantificaron azúcares reductores, PHB y proteína para todas las muestras recolectadas de acuerdo con lo establecido en las secciones 2.5.7 a la 2.5.10.

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Caracterización de la materia prima

La caracterización del bagazo de Agave, consistió en realizar un análisis de humedad, cenizas y fibra (celulosa, hemicelulosa y lignina). En la Tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos comparándolos con otros dos estudios realizados previamente.

Tabla 3.1 Resultados de la caracterización de bagazo de *Agave angustifolia* Haw

Parámetro	Pruebas realizadas	Vázquez (2013)	Martínez (2013)
Hemicelulosa (%)	20	10.78	28.32
Celulosa (%)	29	34.07	41.09
Lignina (%)	8	13.06	10.68
Otros (%)	43	42.08	19.94
Humedad (%)	10	8.87	80
Cenizas (%)	12	9	10

Se puede observar que la diferencia más significativa se encuentra en el porcentaje de hemicelulosa, ya que los valores obtenidos en esta experimentación son más cercanos a los reportados por Martínez (2013) que los reportados por Vázquez (2013), teniendo un 85% más de hemicelulosa. Esto se puede deber a varios factores, como la maduración de la planta, y el efecto de las impurezas debido a que al bagazo no se le realizó ningún tipo de limpieza antes de su utilización.

### 3.2 Hidrólisis ácida

#### 3.2.1 Valoración de la hidrólisis ácida empleando diferentes ácidos

La conversión de azúcares se calculó con base en el contenido teórico de hemicelulosa (28% en promedio).

En la Figura 3.1, se puede observar la grafica de la curva de calibración para cuantificar el contenido de azúcares reductores utilizando como patrón glucosa, la cual tuvo un ajuste del 99.3%

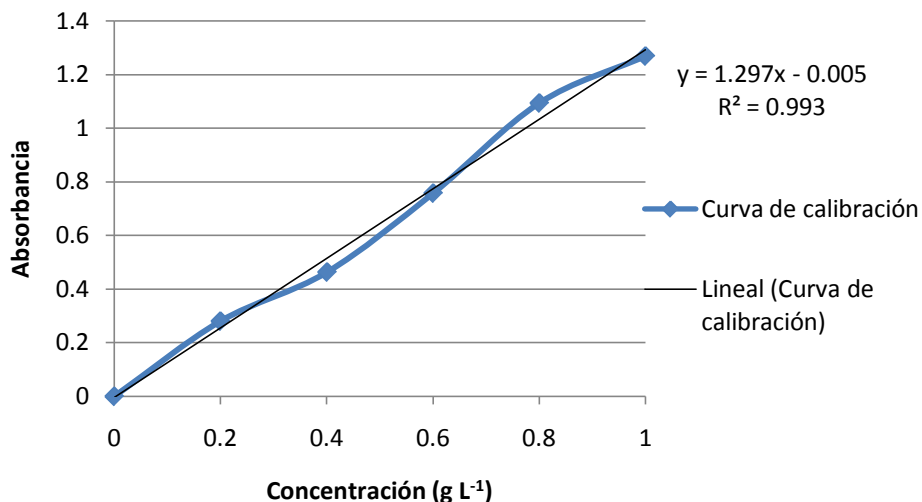


Figura 3.1. Curva para cuantificar los azúcares reductores totales

En la Tabla 3.1 se pueden observar los resultados en del diseño univariable de la hidrólisis ácida

Tabla 3.2 Rendimientos de los diferentes ácidos

Muestra	Tipo de ácido	Concentración de azúcares (g L <sup>-1</sup> )	Réplica (g L <sup>-1</sup> )
1	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	16.2	16.1
2	HCl	26.3	27.3
3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	23	22.5
4	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	16	16.2
5	HCl	27.7	27.3
6	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	21.7	22.5

Como resultado del diseño univariable se obtuvo que el HCl produjo una mayor cantidad de azúcares (27.7 g L<sup>-1</sup>). El ácido comúnmente ocupado es el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con el cual se obtuvo un rendimiento del 81.48% del valor obtenido con HCl, en tanto que el H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solamente presentó un rendimiento del 59.29%. El mejor valor

reportado por Chandler *et al.*, (2012) utilizando ácido sulfúrico al 1 %, una RSL (relación sólido-líquido) de 1:15 y temperatura de 140 °C para bagazo de caña de azúcar, fue de 14 g L<sup>-1</sup>. Comparando este valor con los valores obtenidos para este trabajo se demuestra que los resultados están dentro de un valor de conversión aceptable, aunque se trate de muestra lignocelulósica diferente.

### 3.2.2 Optimización de la hidrólisis ácida mediante diseño de experimentos Box Behnken

Los resultados del diseño Box Behnken planteado en la sección 2.4 se presentan en la Tabla 3.3

Tabla 3.3 Resultados obtenidos del diseño de experimentos Box Behnken.

Orden	Tiempo de residencia (min)	P del autoclave (Kg cm <sup>-2</sup> )	Relación sólido-líquido	Azúcares reductores (g L <sup>-1</sup> )	Azúcares (g)
1	20	1.0	1:12	23.80	1.83
2	20	1.4	1:12	21.27	1.34
3	40	1.0	1:12	23.47	1.942
4	40	1.4	1:12	30.86	2.59
5	20	1.2	1:10	27.77	1.86
6	20	1.2	1:14	19.23	1.92
7	40	1.2	1:10	26.31	1.42
8	40	1.2	1:14	23.47	2.41
9	30	1.0	1:10	27.77	1.333
10	30	1.0	1:14	22.72	2.223
11	30	1.4	1:10	25	1.475
12	30	1.4	1:14	24.39	2.44
13	30	1.2	1:12	25	1.925
14	30	1.2	1:12	25	2.175
15	30	1.2	1:12	22.22	1.7111

Debido a que la relación sólido-líquido es una variable que modifica la cantidad de solución que se obtiene en cada experimentación y esto puede afectar los resultados si se expresan en g L<sup>-1</sup>, se optó por expresar la conversión de azúcares en gramos.

Se puede observar que la máxima producción de glucosa (2.59 g), se alcanzó con los niveles altos de tiempo y presión, y con una relación sólido-líquido en nivel medio. Los datos obtenidos del diseño Box Behnken fueron analizados estadísticamente en el programa NCSS versión 2007. La ecuación (3.1) representa el modelo obtenido con un ajuste del 84%, en el modelo se consideran las variables codificadas.

$$\text{Azúcares (g)} = 24.07 + 1.545*t + 4.545^{-2}*t^2 + 0.468*P + 2.477*t*P + 0.738*P^2 - 2.088*RLS + 1.511 t*RLS + 1.115*P*RLS + 0.162*RLS^2 \quad (3.1)$$

A partir del ANOVA (Tabla 3.4) se observa que las tres variables resultaron significativas en la obtención de azúcares reductores, por lo que se deberá trabajar con otra región para obtener valores óptimos, aunque el mejor resultado (2.59 g) es muy cercano al valor del 100% de hemicelulosa (2.8 g de azúcar / 10 g de bagazo) reportado por Martínez *et al.*, (2013).

Tabla 3.4 Estimación del efecto de las variables sobre la producción de azúcares reductores

Parámetros	Coficiente	Error estándar	Proporción T	Prob. Nivel
Tiempo	1.545	0.669	<b>2.31</b>	0.068
Presión	0.468	0.669	<b>0.70</b>	0.514
RSL	-2.088	0.669	<b>-3.12</b>	0.026
Tiempo <sup>2</sup>	0.045	0.985	0.05	0.964
Presión <sup>2</sup>	0.738	0.985	0.75	0.487
RSL <sup>2</sup>	0.162	0.985	0.17	0.875
T*P	2.477	0.946	2.62	0.047
T*RSL	1.511	0.946	1.60	0.171
P*RSL	1.115	0.946	1.18	0.291

Estos resultados concuerdan con los realizados por Chandler *et al.*, (2012), quienes obtuvieron que la temperatura tiene un efecto significativo sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis ácida de la caña de azúcar y la temperatura óptima de operación fue 140 °C, obteniendo una conversión del 39.41% del valor teórico de conversión total de azúcares reductores aunque este valor lo obtuvo con 2 etapas de hidrólisis ácida.

Jiménez *et al.*, (2012) demostraron que con tiempos altos en el proceso de hidrólisis ácida se aumenta la probabilidad de degradación de los azúcares reductores, realizando una hidrólisis ácida de *Beta bulgaris* L. y aunque solo ocupó temperaturas menores a los 60 °C, utilizó tiempos de 3 a 4 h, lo que encarece el proceso, mientras que en esta experimentación el mayor tiempo fue de 40 min.

### **3.2.3 Análisis de gráficas de contornos y superficie de respuesta**

Para observar claramente las tendencias de las variables en la producción de azúcares, se construyeron gráficas de contornos, las cuales se muestran en la Figura 3.5, donde se puede observar que no existe una zona óptima.

A partir de la Tabla 3.4 y la Figura 3.2 se observa que la concentración de azúcar alcanzada aumenta conforme aumentan las condiciones de las variables, es decir, cuando se encuentran en sus puntos más altos.

Esta tendencia se puede observar mejor en la Figura 3.3 en la cual se presentan las superficies de respuesta para la hidrólisis ácida.

Se observa que la producción de azúcares reductores tiene una tendencia a aumentar en los valores altos de las variables manipuladas  $t$  (40 min), RSL (1:14) y  $P$  (1.4 Kg/cm<sup>2</sup>). De igual manera, se observa que las 3 gráficas presentan la tendencia de ir hacia una región de trabajo con valores mayores, por lo que se decidió realizar otra experimentación que consistió en trabajar con las mismas variables manipuladas, pero en otras regiones (Tabla 2.3) a fin de lograr delimitar claramente una región y de esta manera cerrar la región óptima de obtención de azúcares reductores.

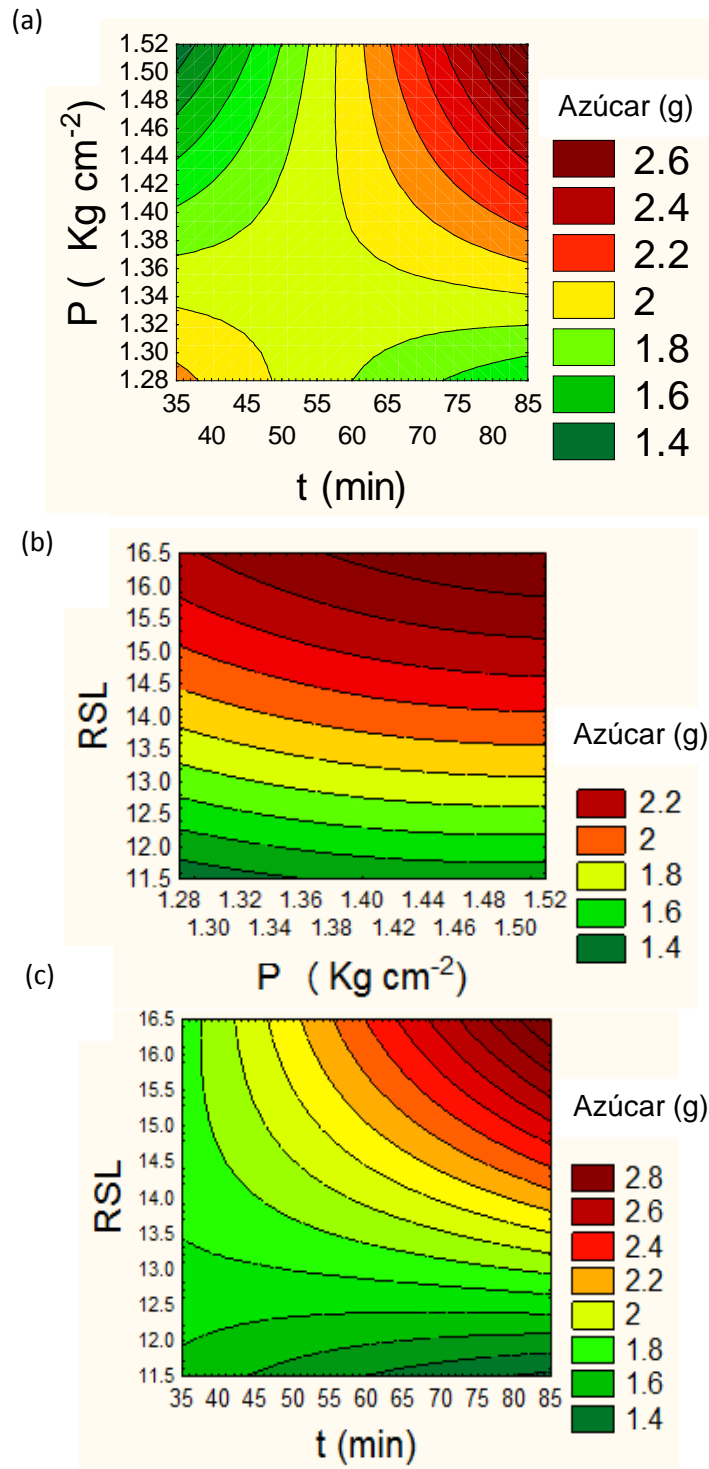


Figura 3.2 Gráficas de contornos para la hidrólisis ácida (a) presión vs tiempo (b) presión vs relación sólido-líquido y (c) tiempo vs relación sólido-líquido.

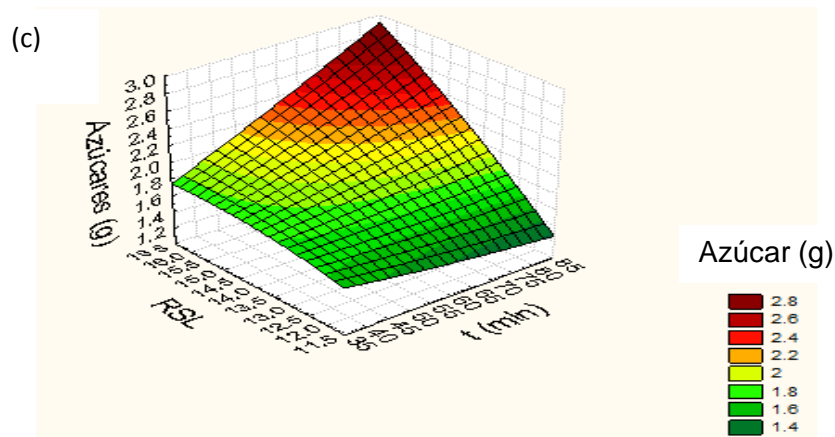
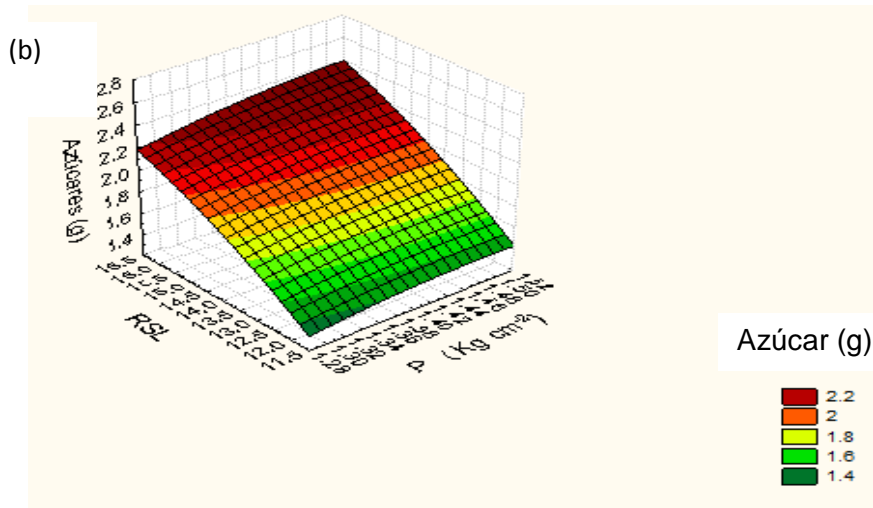
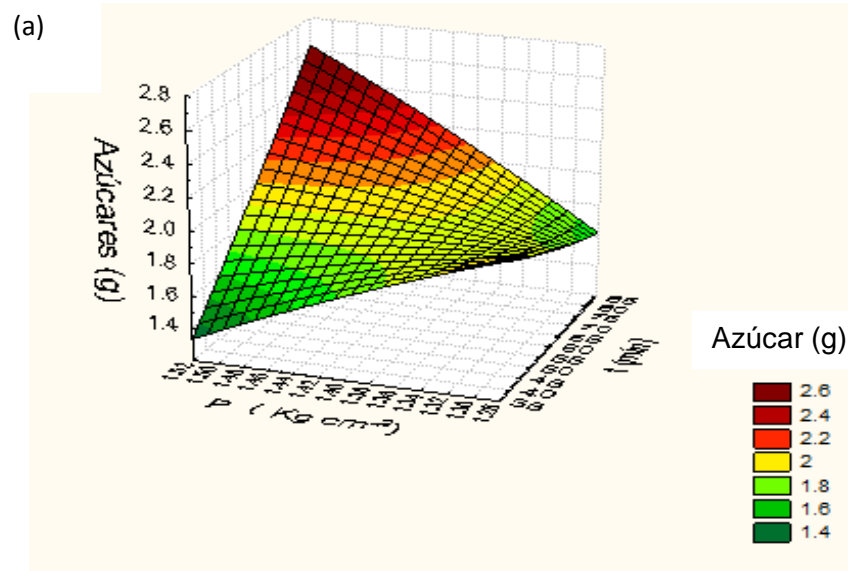


Figura 3.3 Gráficas de superficie de respuesta para la hidrólisis ácida (a) tiempo vs presión (b) presión vs relación sólido-líquido y (c) tiempo vs relación sólido-líquido.

### 3.2.4 Diseño univariable empleando diferente relación sólido-líquido

Los resultados obtenidos a  $1.4 \text{ Kg cm}^{-2}$  se pueden observar en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Gramos de azúcar obtenidos con presión de  $1.4 \text{ Kg cm}^{-2}$

RSL	Azúcares reductores ( $\text{g L}^{-1}$ )	Azúcar (g)
1:12	15.151	1.818
1:14	12.50	1.75
1:16	10.638	1.70
1:18	10.0	1.80

El mejor resultado se obtuvo con una RSL de 1:12, aunque resultó 30% menor al obtenido en el diseño B.B, ya que la cantidad de azúcar obtenida en el diseño B.B fue de 2.59 g, mientras que el que obtenido con el diseño univariable fue de 1.818 g. Debido a este resultado se optó por realizar el mismo diseño pero ahora con una presión de  $1.5 \text{ Kg cm}^{-2}$ . Los resultados de esta experimentación se observan en la Tabla 3.6

Tabla 3.6 Gramos de azúcar obtenidos con presión de  $1.5 \text{ Kg cm}^{-2}$

RSL	Azúcares reductores ( $\text{g L}^{-1}$ )	Azúcar (g)
1:12	16.129	1.935
1:14	13.888	1.944
1:16	11.363	1.818
1:18	10.204	1.836

Se observa una del 6% en la producción de azúcar con respecto a lo obtenido a una presión de  $1.4 \text{ Kg cm}^{-2}$ , sin embargo sigue estando un 24% por debajo de lo obtenido en el diseño B.B.

También se observa que la cantidad de azúcar se incrementó al emplear a una RSL de 1:14, sin embargo, la cantidad de azúcares disminuyó al aumentar a 1:16 y 1:18 de RSL. Esto se puede atribuir al hecho de que al haber una mayor cantidad de líquido también existe una mayor cantidad de ácido, lo que puede



provocar que se empiecen a formar inhibidores como lo son el hidroximetilfurfural (HMF) o ácido fórmico.

Es importante enfatizar que el bagazo utilizado para realizar estos últimos 2 diseños univariados tenía un tiempo de almacenamiento de 6 meses, mientras que el utilizado para realizar el diseño B.B solo tenía 15 días de almacenamiento, por lo que se considera que el bajo rendimiento de azúcares obtenidos en estos diseños se puede deber a un envejecimiento de la materia lignocelulósica.

### **3.2.5 Segundo diseño Box-Behnken para la obtención de azúcares reductores**

Se procedió a realizar un segundo diseño B.B utilizando la misma metodología mencionada en la sección 2.4 utilizada para la realización del primer diseño B.B. pero empleando otros rangos para las variables independientes. En la Tabla 2.3 se pueden observar los nuevos rangos con los que se trabajara. Estos rangos fueron elegidos debido a la tendencia de ir a valores más altos, como se observa en las Figuras 3.2 y 3.3.

Los resultados del diseño de experimentos se pueden observar en la Tabla 3.7, dando como mejor resultado el del experimento 12, el cual está relacionado con un tiempo medio (60 min), RSL alta ( 1:16 ) y temperatura alta (1.5 Kg cm<sup>-2</sup>). Estos valores presentan la misma tendencia del primer diseño B.B, aunque los valores de las variables independientes son diferentes.

De igual manera, se realizó una comparativa entre 3 métodos de cuantificación de azúcares reductores para observar las diferencias que arrojan cada uno de los métodos. Los métodos utilizados fueron HPLC, DNS y Fehling, de los cuales sus metodologías se encuentran en los Anexos A, C, D.

Tabla 3.7 Resultados del diseño de experimentos B.B

No. Experimento	Azúcar (g) Fehling	Azúcar (g) DNS	Azúcar (g) HPLC
1	1.55	2.128	1.396
2	1.66	2.100	1.428
3	1.62	2.338	1.678
4	2.02	2.324	1.858
5	1.5	1.708	1.248
6	1.33	1.651	1.144
7	1.71	2.248	1.597
8	1.6	1.814	1.483
9	2	2.136	1.548
10	1.9	2.512	1.686
11	1.5	1.855	1.394
12	2.42	2.752	2.062
13	2.1	1.946	1.499
14	2.1	2.24	1.674
15	2.1	2.534	1.842

Los datos obtenidos del diseño Box Behnken fueron analizados estadísticamente en el programa NCSS versión 2007. La ecuación (3.2) representa el modelo obtenido con un ajuste del 86% utilizando el método de medición de azúcares DNS en el modelo se consideran las variables naturales.

$$\begin{aligned} \text{Azúcares (g)} = & 2.1 + 0.113*t + 0.066*P + 0.067*RSL - 0.403*t^2 + 0.0162*P^2 - 0.161*RSL^2 \\ & + 0.072*t*P + 0.015*t*RSL + 0.255*P*RSL \end{aligned} \quad (3.2)$$

Se puede observar que se mejoró el ajuste de los datos al diseño cuadrático en un 2%. De igual manera el mejor valor obtenido fue de 2.75 g que comparado con el valor del anterior diseño Box-Behnken 2.59 g, se incrementó un 6% la obtención de azúcares reductores.

Los datos obtenidos del diseño Box Behnken fueron analizados estadísticamente en el programa NCSS versión 2007. La ecuación (3.3) representa el modelo obtenido con un ajuste del 60%, utilizando el método de medición de azúcares Fehling. En el modelo se consideran las variables naturales.

$$\text{Azúcares (g)} = 20.358 + 0.0708*t - 23.9125*P - 0.645*RSL - 1.009375*t^2 + 1.625*P^2 - 0.0403*RSL^2 + 0.03625*t*P + 0.000375*t*RSL \quad (3.3)$$

La ecuación (3.4) representa el modelo obtenido con un ajuste del 76% utilizando el método de medición de azúcares HPLC. En el modelo se consideran las variables naturales.

$$\text{Azúcares (g)} = 29.04 + 0.041*t - 41.039*P - 0.1129RSL + 11.14*P^2 + 0.0185*P*t - 0.0000625*t*RSL + 0.6625*P*RSL \quad (3.4)$$

De los valores obtenidos mediante el método de HPLC se pueden observar los valores por separado de xilosa y glucosa, estos valores se presentan la Tabla 3.8

Para realizar los análisis de las graficas de contornos y superficies de respuesta, así como el análisis canónico, se utilizaron los datos del análisis de obtención de azúcar con el método de DNS, ya que es el que tiene un mejor ajuste de sus datos.

La alta concentración de xilosa frente a glucosa es un indicio de que se hidrolizó casi completamente hemicelulosa y la baja concentración de ácido acético indica que no se llegó a un tiempo o temperatura suficiente para crear una mayor cantidad de inhibidores.

Tabla 3.8 Valores de glucosa, Xilosa y ácido acético cuantificado mediante HPLC

Experimento	Glucosa (g)	Xilosa (g)	Acido acético (g)
1	2.023	7.951	0.473
2	2.277	7.928	0.527
3	3.113	8.873	0.651
4	3.762	9.513	0.725
5	2.267	8.140	0.524
6	1.127	6.025	0.231
7	4.135	9.177	0.138
8	2.267	7.006	0.133
9	2.987	9.916	0.149
10	2.533	8.010	0.151
11	3.433	8.183	0.113
12	3.487	9.401	0.187
13	2.672	8.040	0.158
14	3.310	8.648	0.152
15	3.124	10.032	0.176

### 3.2.6 Análisis de gráficas de contornos y superficie de respuesta del segundo diseño B.B

En la Figura 3.4 se puede observar que se pudieron delimitar las regiones para obtener el mejor resultado de azúcares.

De la Figura 3.4 (a) se puede observar que el mejor resultado que se obtiene trabajando con las variables presión y tiempo es de 2 g de azúcar, considerando un rango de presión de entre 1.4 y 1.5 Kg cm<sup>-2</sup>, y un tiempo de entre 60 y 70 min de operación. Este resultado no puede ser mejorado debido a las limitaciones del equipo ya que la presión máxima de trabajo del autoclave utilizado es de 1.5 kg cm<sup>-2</sup>, y aumentar el tiempo de residencia no es viable, ya implicaría un incremento en el costo sin tener un aumento significativo en la obtención de azúcares.

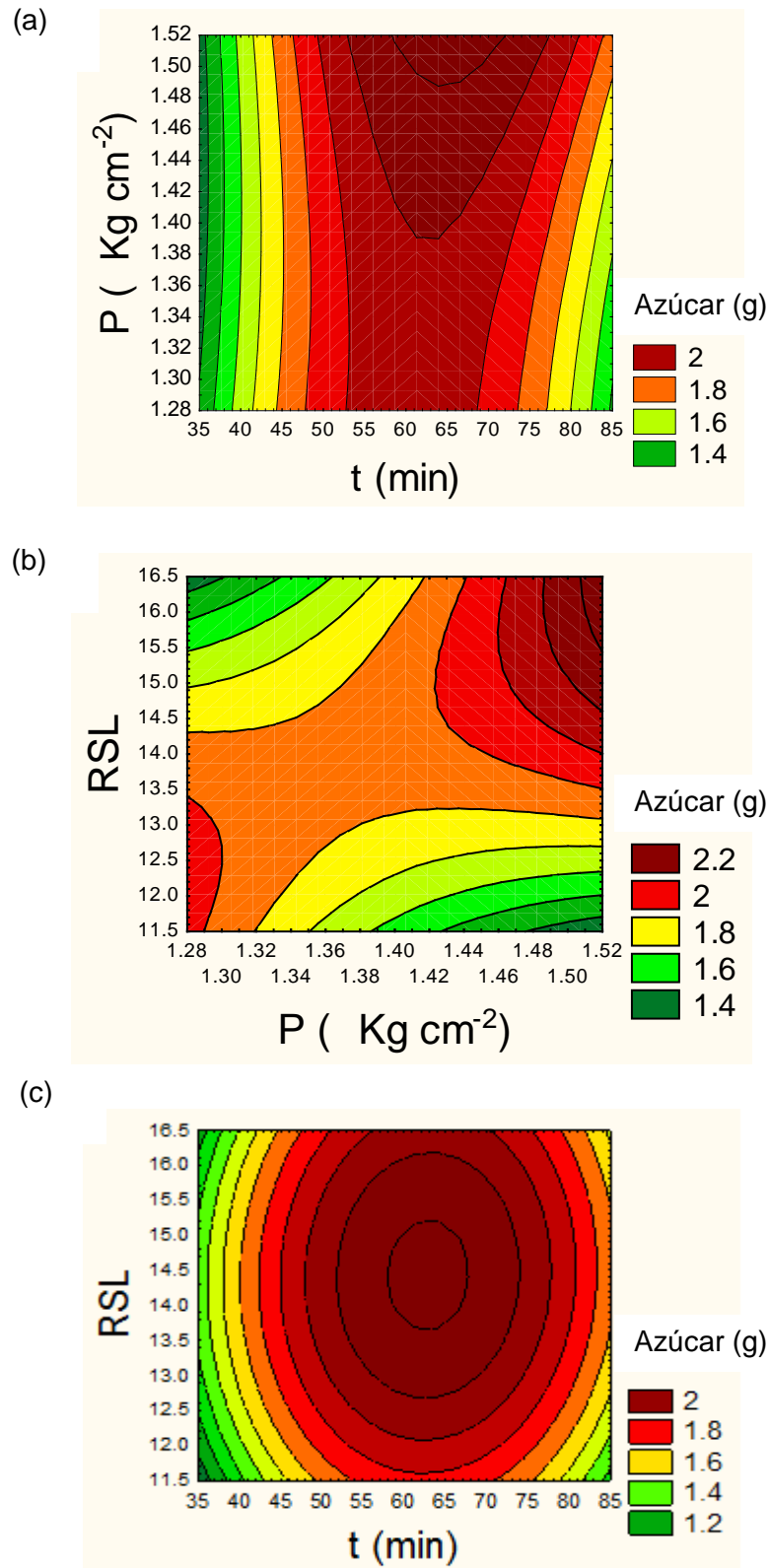


Figura 3.4 Gráfica de contornos para la obtención de azúcares con las variables independientes de (a) tiempo y presión, (b) RLS y presión y (c) RSL y tiempo

En la Figura 3.4 (b) se observa que la mejor región de trabajo queda comprendida en los rangos de presión entre 1.44 a 1.5 y de RSL de 15 a 16.5, dando como resultado 2.2 g de azúcar. De la misma manera que en la Figura 3.4 (a), se observa una tendencia de obtención de azúcares mayor en regiones de presión superiores, aunque como ya se explicó anteriormente, las especificaciones del equipo no permiten un aumento de presión mayor a  $1.5 \text{ Kg cm}^{-2}$ .

En la Figura 3.4 (c) se observa la superficie de respuesta para la obtención de azúcares utilizando las variables independientes de tiempo y RSL.

En la Figura 3.4 (c) se logra encontrar un punto óptimo de trabajo, esto se debe a que esta figura no se depende de la presión del autoclave por lo que las limitaciones físicas del equipo no afectan la búsqueda de una región óptima, se observa que la RSL se puede trabajar en la región de 14 a 15 y con un tiempo de 60 a 70 min y se obtiene un valor óptimo de 2 g de azúcar.

La Figura 3.5, muestra la tendencia de los datos, se logra apreciar una curvatura en la Figura 3.5 (a), que es donde se encontró la región óptima en función del tiempo y la RSL. En las Figuras (b) y (c) se observa que los resultados siguen una tendencia a aumentar la presión pero debido a los costos altos y riesgosos de operar a presiones mayores, aumentadas a las limitaciones del equipo, no es recomendable trabajar en condiciones de presión mayor.

### **3.2.7 Análisis canónico**

De acuerdo a Montgomery (1991), puede obtenerse una solución general para el punto estacionario de acuerdo a la notación matricial a partir del modelo de segundo orden (Ec. 3.5):

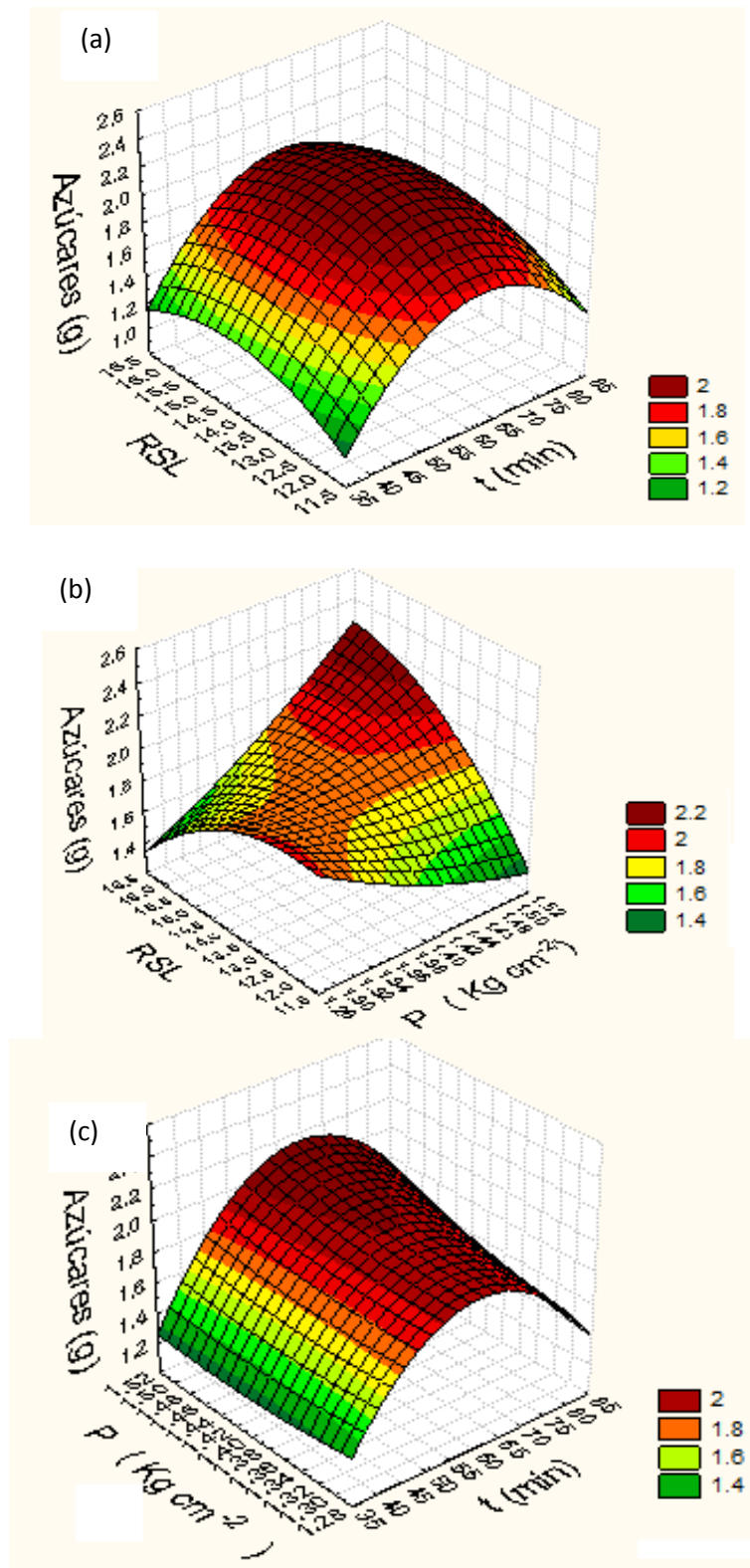


Figura 3.5 Gráficas de superficie de respuesta para la hidrólisis ácida (a) tiempo vs RSL (b) presión vs relación sólido-líquido y (c) tiempo vs presión

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + x' b + x' Bx \quad (3.5)$$

Dónde:

$$x = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ X_K \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_1 \\ \hat{\beta}_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \hat{\beta}_K \end{bmatrix} \quad y \quad B = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_{11}, & \hat{\beta}_{12}/2 & , \dots, & \hat{\beta}_{1K}/2 \\ & \hat{\beta}_{22}, & , \dots, & \hat{\beta}_{2K}/2 \\ [sim & & & \hat{\beta}_{kk} \end{bmatrix}$$

El punto estacionario está dado por la ecuación 3.6:

$$x_0 = -\frac{1}{2} B^{-1} b \quad (3.6)$$

Sustituyendo las dos ecuaciones anteriores se determina la respuesta predicha en el punto estacionario, teniendo finalmente la ecuación 3.7.

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \frac{1}{2} x_0' b \quad (3.7)$$

Aplicando el procedimiento anterior se generan las siguientes matrices para el cálculo del punto estacionario, a partir del modelo de regresión (3.2).

$$b = \begin{bmatrix} 0.113 \\ 0.066 \\ 0.067 \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} -0.403 & 0.036 & 0.0075 \\ 0.036 & 0.0162 & 0.127 \\ 0.0075 & 0.127 & -0.161 \end{bmatrix}$$

$$x_0 = -\frac{1}{2} \begin{bmatrix} -0.403 & 0.036 & 0.0075 \\ 0.036 & 0.0162 & 0.127 \\ 0.0075 & 0.127 & -0.161 \end{bmatrix}^{-1} * \begin{bmatrix} 0.113 \\ 0.066 \\ 0.067 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.08775 \\ -0.54222 \\ -0.21552 \end{bmatrix}$$

Calculando la respuesta predicha se tiene lo siguiente:

$$y = 2.1 + \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 0.08775 \\ -0.54222 \\ -0.21552 \end{bmatrix}^T * \begin{bmatrix} 0.113 \\ 0.066 \\ 0.067 \end{bmatrix} = 2.12$$



Decodificando las variables de  $x_0$  para volverlas a variables naturales utilizando la Ec. (3.8).

$$x = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon}{\Delta x} \quad (3.8)$$

Para la variable presión

$$0.08775 = \frac{1.4 - \varepsilon}{0.1}$$

$$\varepsilon = 1.39$$

Es decir trabajar con una presión de  $1.4 \text{ Kg cm}^{-2}$

Realizando para la variable de tiempo tenemos:

$$-0.5542 = \frac{60 - \varepsilon}{20}$$

$$\varepsilon = 70.88$$

Es decir un tiempo de 70 min

Realizando para la variable de RSL tenemos:

$$-0.2155 = \frac{14 - \varepsilon}{2}$$

$$\varepsilon = 14.43$$

Es decir trabajar con una RSL de 1:14.5

El modelo matemático expresa que trabajando con las condiciones de presión de  $1.4 \text{ Kg cm}^{-2}$ , tiempo de 70 min y RSL de 1:14.5 se obtendrá una respuesta de conversión de azúcares de 2.12 g. Realizando una comparación con el mejor valor experimental obtenido en el segundo diseño B.B, es decir, una conversión de azúcar de 2.75 g con las condiciones de presión de  $1.5 \text{ Kg cm}^{-2}$ , tiempo de 60 min

y RSL de 1:6, se concluye que el valor experimental tiene una conversión del 29% mayor a la esperada por el modelo matemático.

Análisis canónico

$$\hat{y} = \hat{y}_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (3.9)$$

Los valores propios  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  son las raíces de la ecuación determinante

$$|B - \lambda I| = 0$$

$$\begin{vmatrix} -0.403 - \lambda & 0.036 & 0.0075 \\ 0.036 & 0.0162 - \lambda & 0.127 \\ 0.0075 & 0.127 & -0.161 - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

El cual se reduce a:  $-\lambda^3 - 0.5478\lambda^2 - 0.382651\lambda + 0.007827$

Las raíces de esta ecuación cúbica son  $\lambda_1 = 0.019869$ ,  $\lambda_2 = -0.2838$  y  $\lambda_3 = 0.2838$ , al tener signos conjugados se concluye que se encuentra en un punto de silla. Esto se debe a las limitantes del equipo para trabajar a una presión mayor, por lo que el efecto de la presión no se puede demostrar completamente, lo que provoca que no se llegue a obtener puntos óptimos de las 3 variables, como se logra observar en la Figura 3.5. No obstante, aunque se encuentra en un punto de silla la conversión de hemicelulosa disponible es cercana al 98%, por lo que se considera optimizado el proceso.

### 3.3 Producción de PHB

#### 3.3.1 Activación de la cepa *Bacillus sp.* IBT42, preparación del medio de cultivo y preinóculo

La cepa IBT42 se activó a partir de su liofilizado, cultivando la bacteria durante 16 h como se establece en la sección 2.5.2. Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo a lo establecido en la sección 2.5.3, en matraces de 250 mL con un volumen de 50 mL a una concentración de 6 g/L de azúcares reductores y una relación C/N y C/P de 1:0.162 y 1:0.1451 respectivamente. El pH del medio se

ajustó a 7. El preinóculo se preparó como se establece en el apartado 2.5.4 en medio líquido con una concentración de  $6 \text{ g L}^{-1}$  de azúcares reductores. Los matraces se inocularon con un volumen del preinóculo que permitiera obtener una absorbancia de 0.1 medida a 600 nm.

### 3.3.2 Evaluación de la influencia de la temperatura y la aireación sobre la producción de PHB

Se evaluó el efecto de la temperatura y del nivel de aireación sobre el crecimiento de la bacteria *Bacillus sp.* IBT42 y su producción de PHB, utilizando los hidrolizados obtenidos. Se utilizó el diseño de experimentos planteado en la sección 2.5.6. El crecimiento se cuantificó midiendo la concentración de proteína en el cultivo y se cuantificó el PHB producido.

En la Tabla 3.9 se presenta la cuantificación de proteína, se observa que en las condiciones del experimento 3, nivel bajo de aireación y nivel alto de temperatura, se presentó el mayor contenido proteínico, el cual representa crecimiento bacteriano, siendo de  $41.2 \text{ g L}^{-1}$  en un tiempo de fermentación de 18 h. Este resultado se pudo observar mejor en la Figura 3.6.

Tabla 3.9 Cuantificación de crecimiento bacteriológico.

Cuantificación de Proteína ( $\text{g L}^{-1}$ )				
Experimentación	Tiempo de fermentación (h)			
	0	18	24	36
1	3.22	9.40	10.50	11.20
2	4.44	5.55	14.50	11.50
3	2.78	41.20	20.00	20.00
4	4.64	19.70	21.00	22.30
5	5.20	14.65	16.45	20.70
6	3.20	12.30	19.65	21.35
7	2.80	13.55	19.55	19.05
8	3.1	13.78	18	20.9
9	2.9	14.04	19.6	21

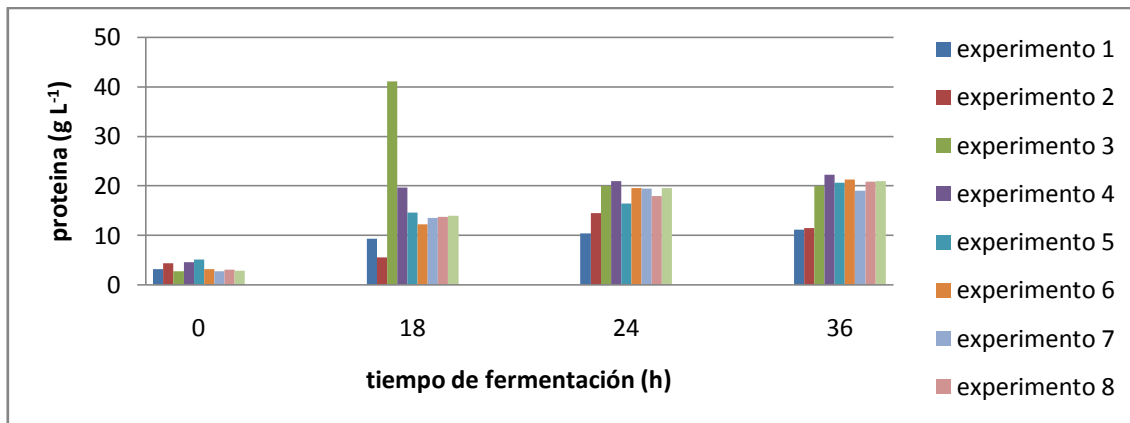


Figura 3.6 Gráfica de cuantificación de crecimiento bacteriológico

Comparando los resultados reportados por Akaraonye *et al.*, (2010) para una especie de *Escherichia coli* recombinante productora de PHB, con melazas como fuente de carbono obtuvo  $39.5 \text{ g L}^{-1}$  de crecimiento bacteriológico, el cual fue cuantificado por conteo celular. Considerando que su tiempo de fermentación fue de 80 h, se obtuvo un ahorro de tiempo del 77.5 % con el mejor resultado, como se puede observar en la Figura 3.6.

En 24 h Almeida *et al.*, (2010) reportaron un crecimiento bacteriológico de  $9.43 \text{ g L}^{-1}$  utilizando glucosa pura como fuente de carbono a 500 rpm para la especie *Escherichia coli* recombinante K24KP, por lo que el mejor resultado obtenido  $41 \text{ g L}^{-1}$  es 77% mayor con 6 h menos de fermentación.

Los resultados obtenidos para la producción de PHB se muestran en la Tabla 3.10, se observa que al igual que en la cuantificación de crecimiento, el mejor resultado fue obtenido en el experimento 3 y a las 18 h de fermentación con  $1.4 \text{ g/L}$  de PHB. Así se establece entonces que esta condición es adecuada tanto para el crecimiento de la bacteria como para la producción del polímero.

En la Figura 3.7 se observa mejor la tendencia que tiene la acumulación de PHB, la cual a las 18 h en el experimento 3 alcanza su máximo valor y al proseguir con la fermentación se pierde el 88% de acumulación. La misma tendencia se observó en el resto de los experimentos, aunque la acumulación de PHB tardó 33% más de tiempo en presentar valores significativos, es decir, que presentaron valores

altos hasta las 24 h de fermentación y una pérdida mayor al 70% de PHB ser observó a las 36 h de la fermentación.

Tabla 3.10 Cuantificación de producción de PHB ( $\mu\text{g/mL}$ )

Experimento	Tiempo de fermentación (h)			
	0	18	24	36
1	5.168	221.703	159.122	114.490
2	13.065	24.110	882.933	273.612
3	9.261	1438.846	169.794	99.936
4	7.111	305.630	174.646	143.112
5	6.491	400.230	960.553	164.943
6	4.837	303.205	1120.646	135.835
7	6.325	257.117	970.256	179.497
8	5.560	285.704	1070.246	205.385
9	6.908	298.874	899.578	300.178

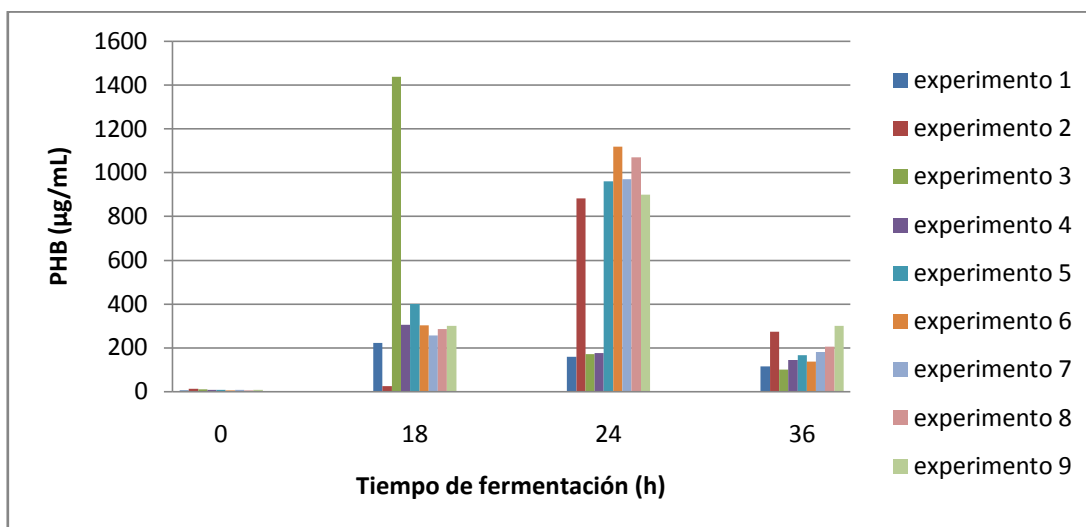


Figura 3.7 Gráfica de cuantificación de PHB

Comparando el mejor resultado presentado en la Tabla 3.10, es decir, el de 1.43 g L<sup>-1</sup> de acumulación de PHB a las 18 h de fermentación, con el obtenido por Vásquez (2013) quien reporta una acumulación de PHB de 2.31 g L<sup>-1</sup> a las 24 h de fermentación utilizando la misma bacteria *Bacillus sp.* IBT 42, se tiene un ahorro

del 33% de tiempo, obteniendo un 62 % de la producción reportada. Cabe resaltar que no tenía un control sobre la cantidad de biomasa a inocular, lo que puede causar variaciones en los resultados.

Estos resultados de acumulación de PHB comparados con los reportados por Adaya (2010) utilizando el mismo microorganismo y como fuente de carbono hidrolizados ácidos de caña, son PHB 5.33 veces menores al mejor resultado obtenido en este trabajo.

Sanjay y Sigh (2011) reportaron una acumulación de PHB del 1% del peso seco de la bacteria a las 48 h de fermentación en la bacteria *Bacillus cereus* EGU3. Comparando este resultado con el obtenido con la mejor condición de este trabajo ( $1.43 \text{ g L}^{-1} / 41.2 \text{ g L}^{-1} \cdot 100$ ) 3.4% del peso seco de la bacteria, se obtiene 2.4 % más de acumulación y se tiene un ahorro de 66% en tiempo de fermentación.

Los datos obtenidos del diseño fueron analizados estadísticamente en el programa NCSS versión 2007. La ecuación (3.10) representa el modelo obtenido con un ajuste del 80% al modelo lineal, considerando variables codificadas. La ecuación (3.11) representa un modelo obtenido con un ajuste del 99%.

$$\text{Proteína (g/L)} = 15.807 + 6.347 \cdot T - 11.152 \cdot A \quad (3.10)$$

$$\text{Proteína (g/L)} = 13.649 + 6.4125 \cdot T - 5.237556 \cdot T^2 - 11.4125 \cdot A - 4.4875 \cdot T \cdot A \quad (3.11)$$

Donde T es la temperatura y A es la aireación

La ecuación (3.12) representa el modelo obtenido con un ajuste del 69%, en el modelo se consideran variables codificadas y representa el efecto de la temperatura y la aireación sobre la producción de PHB.

$$\text{PHB (}\mu\text{g/mL)} = 460.1128 - 303.3857 \cdot T + 280.3145 \cdot A \quad (3.12)$$

El ajuste de la ecuación 3.12 no es adecuado para representar apropiadamente la manera en que la aireación y temperatura afectan la producción de PHB, debido al bajo ajuste de la ecuación a los datos. Para representar apropiadamente la

manera en que la aireación y temperatura afectan la producción de PHB se generó un modelo cuadrático dando como resultado un ajuste del 99.0% (Ec. 3.13).

$$\text{PHB } (\mu\text{g/mL}) = 314.650 + 332.702 * T + 182.922 * T^2 - 233.905 * A - 374.665 * T * A \quad (3.13)$$

Como era de esperarse, el crecimiento microbiológico tiene un mejor ajuste a un modelo cuadrático debido a que el crecimiento de las bacterias no se ajusta bien a un modelo lineal. De igual manera, se logra observar en las Ec. (3.10) y (3.11) que el efecto de la aireación es mayor al efecto de la temperatura, demostrando que a menor aireación se tiene un aumento en biomasa.

De manera contraria a lo que ocurre en la producción de biomasa, cuando se busca aumentar la cantidad de PHB, como se logra observar en las Ec. (3.12) y (3.13), la temperatura tiene un efecto mayor al efecto de la aireación, teniendo un coeficiente de 332.702 para temperatura y -233.906 para la aireación.

La cuantificación de proteína permitió estimar en cada experimento la cantidad de biomasa producida. Se realizó adicionalmente un cálculo de la producción específica (este cálculo se realiza dividiendo la cantidad de biopolímero producida entre la cantidad de biomasa producida multiplicándola por 100), (Tabla 3.11). De esta manera es posible identificar en que experimento existió la mayor producción por unidad de biomasa. Los resultados muestran que el experimento 3 tuvo la mayor producción específica, y que esta se ve favorecida en el nivel bajo de aireación y el nivel alto de temperatura. La producción específica determina la capacidad de producción de PHB de las bacterias que se desarrollaron en el medio. Una producción específica alta es favorable, ya que dicha relación significa que pocas bacterias producen una gran cantidad de PHB.

Tabla 3.11 Producción específica de PHB a las 18 h de fermentación

Experimento	Biomasa (g L <sup>-1</sup> )	Producción PHB (g L <sup>-1</sup> )	Producción específica PHB (%)
1	9.4	0.221	2.2
2	5.55	0.024	0.4
3	41.2	1.43	3.4
4	19.7	0.305	1.5
5	14.65	0.400	2.7
6	12.3	0.303	2.4
7	13.55	0.257	1.8
8	13.78	0.285	2.0
9	14.04	0.298	2.1

En la Tabla 3.11 se pueden observar la productividad específica, y aunque los rendimientos no son mayores al 5 % de PHB por bacteria, estos valores tienen un alto impacto debido a la gran cantidad de biomasa producida 41 g L<sup>-1</sup>. La mejor producción, es decir la del experimento 3 tiene una productividad de 0.079 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, (esta productividad se calcula dividiendo la cantidad de biopolímero entre el tiempo de fermentación) que es un rendimiento 2.4 veces menor al reportado por otras especies acumuladoras de PHB como lo es la *Alcaligenes sp.*, cuya productividad fue de 0.19 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de producción de PHB, de acuerdo a Tripathi *et al.*, (2013), aunque utilizó un reactor tipo Bach de 7.5 L con condiciones de aireación y temperatura controladas. De igual manera como fuente de carbono utilizó un reactivo puro lo que vuelve más caro el proceso.

Comparando la productividad de PHB los valores son muy cercanos a los reportados para las especies de *Bacillus* utilizadas por Sanjay y Sigh (2011) a excepción de la reportada para el *B. thuringiensis* EGU45, en el cual Sanjay y Sigh



reportaron una productividad del 11.3%. Pero esta fue obtenida a las 48 h de fermentación y con reactivo puro como fuente de carbono por lo que el proceso se vuelve más caro sin tener una producción significativamente mayor de PHB.

### 3.3.2.1 Cuantificación de azúcares de las fermentaciones para la producción de PHB

Se realizó la cuantificación de azúcares (Tabla 3.12) después de las 24 h de fermentación para determinar la existencia de azúcares por consumir en la solución. Tomando en cuenta que todas las muestras inician con  $6.72 \text{ g L}^{-1}$  de azúcares.

Tabla 3.12 Consumo de azúcares reductores del *Bacillus sp.* IBT42

Muestra	Azúcar ( $\text{g L}^{-1}$ ) restante	Azúcar ( $\text{g L}^{-1}$ ) consumido	Consumo de azúcar (%)
1	3.48	3.42	50.8
2	1.22	5.5	81.8
3	1.83	4.89	72.7
4	0.698	6.02	89.5
5	2.49	4.23	62.9
6	2.91	3.81	56.6
7	2.55	4.17	62.0
8	2.91	3.81	56.6
9	3.264	3.45	51.3

Se observó que los experimentos 2 y 4 presentan un consumo mayor de azúcar después de las 24 h de fermentación; sin embargo, son los que tienen un rendimiento menor en cuanto a crecimiento y producción de PHB, como se logra observar en la Tabla 3.12. Por el lado contrario, el experimento 3 el cual es el que tuvo la mayor producción de PHB y de crecimiento bacteriano tiene un consumo cercano al 70%, por lo que se puede concluir que no es falta de azúcar lo que limita su producción de PHB y el crecimiento, si no alguno de los demás componentes del medio de cultivo utilizado, como lo puede ser la fuente de

nitrógeno o fósforo, o simplemente las limitaciones biológicas del microorganismo son las que no permiten una mayor acumulación de PHB.

Almeida *et al.*, (2010) reportaron que en la bacteria *E. coli* utilizando glucosa estándar como fuente de carbono la obtención de energía es más eficiente cuando los niveles de aireación son mayores. Es por esto que se reflejan diferencias en el crecimiento bacteriano en las diferentes condiciones de aireación reportando que con agitación de 125 rpm obtuvieron 4.75 g L<sup>-1</sup> de biomasa, mientras que a 500 rpm se alcanzaron 9.62 g L<sup>-1</sup>. Comparando con el mejor resultado obtenido 41.2 g L<sup>-1</sup> de biomasa con una agitación orbital de 250 rpm, se obtuvo 4.2 veces más biomasa en este trabajo utilizando como fuente de carbono hidrolizados ácidos de bagazo de agave.

### **3.3.3 Evaluación del efecto con diferentes tipos de alimentación**

Para descartar algunas de las posibilidades del porque aun teniendo fuente de carbono para su crecimiento, la bacteria deja de crecer y producir PHB, se realizaron una serie de experimentos con diferentes tipos de alimentación a diferentes horas como se muestra en la Tabla 3.13.

Se evaluó una realimentación con diferentes concentraciones de nutrientes para observar el efecto que tiene sobre el crecimiento de la bacteria, así como el efecto sobre la producción de PHB, las realimentaciones se realizaron como se muestra en la Tabla 3.1.3.

Donde: C= alimentación de fuente de carbono, Cn= alimentación de fuente de Carbono con fuente de Nitrógeno, Cp= alimentación de fuente de Carbono con fuente de Fosforo, Cnp= alimentación de fuente de Carbono con fuente de Fosforo y Nitrógeno, cada alimentación se realizó por duplicado.

Tabla 3.13 Consumo de azúcar con diferentes tipos de alimentación

Muestra	g L <sup>-1</sup> de azúcar restante		
	18 h	26 h	42 h
<b>C1</b>	0.841	1.389	2.099
<b>C2</b>	0.821	1.51	1.815
<b>Cn1</b>	0.476	1.145	1.551
<b>Cn2</b>	0.821	1.105	1.592
<b>Cp1</b>	0.618	0.882	1.470
<b>Cp2</b>	0.557	1.024	1.551
<b>Cnp1</b>	0.557	0.821	1.511
<b>Cnp2</b>	0.456	1.085	1.308

La Tabla 3.13 representa los consumos con diferentes tipos de alimentación, el mayor consumo se presenta con la alimentación de Cnp2 a las 18 h dejando solamente 0.456 g L<sup>-1</sup> de azúcar, es decir el 6.78% de azúcar alimentado.

Como se observa en la Figura 3.8 la alimentación con un mejor consumo fue la de fuente de Cnp2, con un consumo del 93.22% a las 18 h de fermentación y, el peor consumo fue la alimentación con solo fuente de Carbono. El cual a las 18 h tuvo un consumo del 87.5 %, aunque este valor fue disminuyendo con el tiempo, ya que a las 42 h de fermentación se consumió el 79% de azúcares disponibles. Esto se puede deberse a que la bacteria necesita de los otros componentes y no solamente de la fuente de Carbono para su reproducción.

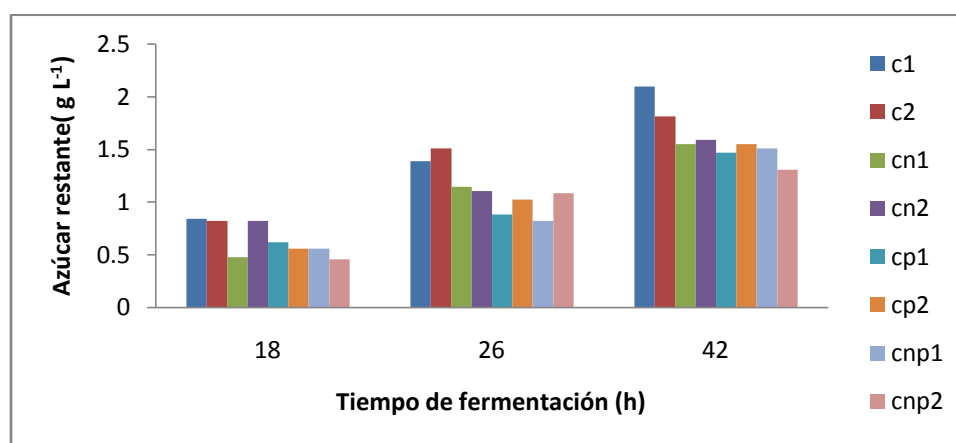


Figura 3.8 Grafica de cuantificación de azúcares restantes

Se puede observar en la Tabla 3.14 y en la Figura 3.9 que existe un aumento del 17.2 % en el crecimiento microbiano a las 42 horas de la fermentación con una alimentación de Carbono-Nitrógeno, comparándolo con el mejor valor encontrado en la Tabla 3.9. Este aumento tiene como inconveniente que aumenta el tiempo de fermentación en un 233%, lo cual no es rentable. También se observa que al realimentar, la cantidad de biomasa se mantiene en un punto casi estable entre 35 y 42 g L<sup>-1</sup>, a diferencia de lo que se observa cuando no existe una realimentación, donde la biomasa disminuye drásticamente como se observa en la Figura 3.6.

Koller *et al.*, (2005) utilizando desperdicios agrícolas como fuente de carbono y realizando realimentaciones de glucosa a las 50 y 75 h de fermentación, observaron el mismo comportamiento obtenido en este trabajo, el cual consiste en que realizando realimentaciones no aumenta la cantidad de biomasa de manera significativa, aunque la cantidad de biomasa cuantificada por Koller fue de 6 g L<sup>-1</sup>, mientras que la mejor observada en la Tabla 3.14 es de 49.73 g L<sup>-1</sup> a las 48 h de fermentación siendo este valor 8.33 veces mayor.

Tabla 3.14 Biomasa producida con diferentes tipos de alimentación

<b>Cuantificación de proteína (g/L)</b>			
<b>muestra</b>	<b>18h</b>	<b>26h</b>	<b>42h</b>
<b>C1</b>	36.539	40.939	37.739
<b>C2</b>	29.739	26.939	40.739
<b>Cn1</b>	38.939	41.339	46.539
<b>Cn2</b>	25.339	39.739	49.739
<b>Cp1</b>	31.739	38.139	33.339
<b>Cp2</b>	36.539	35.939	32.139
<b>Cnp1</b>	36.139	37.939	39.139
<b>Cnp2</b>	39.739	41.739	40.339

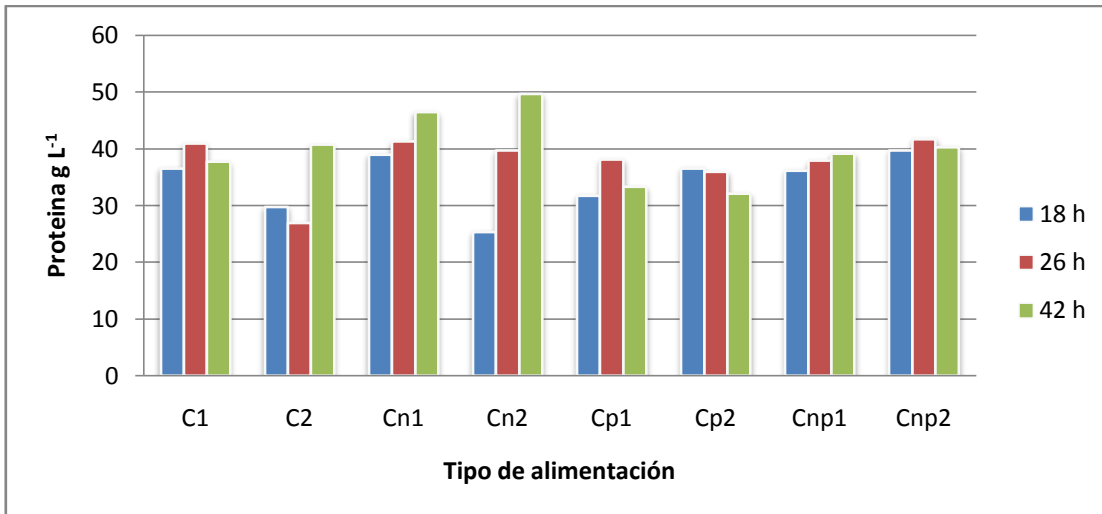


Figura 3.9 Cuantificación de crecimiento microbiológico con diferentes tipos de alimentación

A partir de la Tabla 3.15 y la Figura 3.10 se puede observar una reducción en la producción de PHB. En la alimentación con solo fuente de carbono disminuyó un 93% entre las 18 h y las 48 h de fermentación. Esto se puede deber a que al aumentar las cantidades de los nutrientes se pierde el estado de estrés en el que se debe encontrar la bacteria para producir PHB, por lo tanto utiliza los nutrientes para su reproducción. Esto explicaría el porqué aumenta la cantidad de biomasa, como se observa en la Tabla 3.14 donde en C2 hay un aumento del 37% en biomasa pero la cantidad de PHB producida disminuye conforme se hacen las alimentaciones.

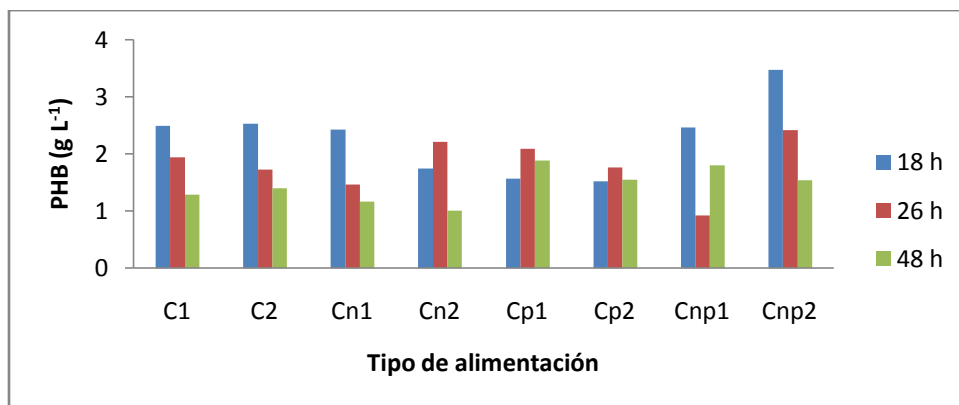


Figura 3.10 Cuantificación de producción de PHB con diferentes tipos de alimentación

Liu *et al.*, (2011) hicieron una comparativa con diferentes tipos de alimentación Cnp, Cn y Cp y C para determinar el efecto del Fosforo y Nitrógeno en la acumulación de PHB, utilizando un lodo activado como bacterias acumuladoras y acetato de sodio como fuente de Carbono, reportando una mejor acumulación con solo fuente de Carbono como alimentación dando  $0.500 \text{ g L}^{-1}$  de PHB a 4 h de fermentación. El mejor resultado observado en la Tabla 3.15 y Figura 3.10 es a las 18 h con la alimentación de Cnp2, obteniendo  $3.47 \text{ g L}^{-1}$  que es 6.8 veces mayor al reportado por Liu *et al.*, (2011), aunque el tiempo de fermentación es 4.5 veces mayor.

Kulpreecha *et al.*, (2009) utilizaron 3 diferentes alimentaciones para cultivar *Bacillus megaterium* BA-019, con melaza, melaza + urea, y melaza + urea + minerales, encontrando que con la alimentación de melaza + urea + minerales, se obtuvo una acumulación de PHB del 20 %, pero sólo un crecimiento bacteriano de  $9.75 \text{ g L}^{-1}$ , es decir, obtuvieron  $1.95 \text{ g L}^{-1}$  de PHB, mientras que como se observa en la Tabla 3.15 el mejor resultado obtenido a las 18 h de fermentación es de  $3.47 \text{ g L}^{-1}$ . El cual es un valor 1.77 veces mayor.

Tabla 3.15 Cuantificación de PHB con diferentes tipos de alimentación

Experimento	PHB ( $\text{g L}^{-1}$ )		
	18 h	26 h	48 h
<b>C1</b>	2.491	1.946	1.289
<b>C2</b>	2.535	1.725	1.405
<b>Cn1</b>	2.431	1.471	1.168
<b>Cn2</b>	1.747	2.216	1.008
<b>Cp1</b>	1.565	2.094	1.890
<b>Cp2</b>	1.527	1.764	1.549
<b>Cnp1</b>	2.464	0.920	1.802
<b>Cnp2</b>	3.473	2.420	1.543

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

- Los contenidos de hemicelulosa, celulosa y lignina tienen una variación significativa en las diferentes muestras, la hemicelulosa muestra una variación de hasta 10 %. Esto se puede deber a que no existe un control de calidad para la recolección de la muestra y de igual manera no se lleva a cabo una limpieza de ésta, lo que podría afectar los diferentes porcentajes de la composición del material lignocelulósico, aunque no se observaron pruebas de que afecten los resultados de la hidrólisis ácida.
- El tipo de ácido utilizado para realizar la hidrólisis afecta de manera muy significativa el contenido de azúcar obtenido. Hidrolizando con HCl se convierte cerca del 98% del contenido de hemicelulosa presente en el bagazo de *A. angustifolia* en azúcares. El ácido comúnmente ocupado es el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, con el cual se obtuvo un rendimiento del 81.48% del valor obtenido con HCl, en tanto que el H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solamente presentó un rendimiento del 59.29%.
- Las relaciones sólido líquido superiores a 1:18 utilizadas en este proyecto, no tienen un efecto positivo en la obtención de azúcares, por lo que no se recomienda aumentar esta relación ya que el aumento en el consumo de ácido hace el proceso más caro.
- Aunque no se llegaron a cerrar las 3 graficas de contornos para obtener así óptimos de las 3 variables probadas, debido a la alta conversión de hemicelulosa en azúcares cerca del 98%, se concluyó que los valores obtenidos podían considerarse como óptimos.
- En la mejor condición probada se obtuvieron 16 g L<sup>-1</sup>, que es la concentración a la que se utiliza la fuente de carbono para realizar las fermentaciones de la bacteria *Bacillus sp.*, por lo que se ahorra el tiempo para poner la fuente de carbono a la concentración deseada.



- La cantidad de inhibidores en los hidrolizados ácidos no llegó a concentraciones altas, el mayor valor observado fue de  $0.725 \text{ g L}^{-1}$  de ácido acético, el cual no es suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano. Al no encontrar rastros de HMF y furfural se concluye que no existe degradación de azúcares en las condiciones de trabajo empleadas.
- Al utilizar los hidrolizados para cultivar *Bacillus sp.* IBT42 y producir PHB se alcanzaron rendimientos de  $41 \text{ g L}^{-1}$  en obtención de biomasa. Esto es un beneficio debido al tiempo de fermentación corto (18 h). De igual manera se observó que al realizar las realimentaciones, la biomasa se mantiene en un rango de entre  $35$  a  $43 \text{ g L}^{-1}$ , obteniendo así una biomasa constante durante tiempo de fermentación largos.
- Se observó que la variable de temperatura tiene un efecto mayor en la acumulación de PHB, mientras que la variable de aireación afecta en mayor proporción el crecimiento microbiano. Tanto la acumulación de PHB como el crecimiento microbiano tienen un mejor ajuste a un sistema cuadrático, por lo que se puede llegar a optimizar realizando un diseño de experimentos.
- El ANOVA indica que ambas variables afectan de manera significativa la producción de PHB y la biomasa, ya que a baja aireación y alta temperatura la biomasa duplica su cantidad en comparación a trabajar con otras condiciones, por lo que a las condiciones trabajadas se concluye que la bacteria no está en estado de estrés, lo que resulta en un bajo rendimiento de PHB.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda analizar el efecto de agitación en la hidrólisis ácida, ya que Jiménez *et al.*, (2012) reportaron que al agregar efecto de agitación (250 rpm) en la hidrólisis ácida disminuye en un 50% la temperatura y tiempo de operación reduciendo así costos.
- Se recomienda buscar una alternativa para utilizar el residuo sólido generado en la hidrólisis ácida, que es aproximadamente el 30% del peso del bagazo total seco, debido a que a las condiciones a las que se realiza la hidrólisis no afectan la celulosa pues esta tiene una alta resistencia a las temperaturas.
- Analizar el efecto de almacenamiento de la materia prima debido a que se observaron diferencias significativas entre una materia prima recién obtenida y una con un tiempo de almacenamiento superior a los 5 meses.
- Realizar la fermentación para la obtención de PHB en 2 etapas, una con condiciones específicas para incrementar el crecimiento microbiano, aireación baja y temperatura de 37 °C, y otra etapa con diferentes condiciones de aireación y temperatura que propicien la producción de PHB.
- Buscar si existe un factor biológico de la bacteria o por inhibidores del medio de cultivo que impiden que la bacteria tenga un crecimiento continuo. De igual manera buscar condiciones a las cuales se pueda realizar una experimentación de manera continua y no por lotes.
- Definir la ruta metabólica de la bacteria *Bacillus sp* IBT 42 para tener un mejor entendimiento de cómo produce PHB y los factores que limitan su acumulación de PHB.

# **ANEXOS**

## ANEXO A

### Determinación de azúcares y ácido acético por HPLC

#### Tratamiento de las muestras:

Centrifugar la muestra de hidrolizado por 10 min a 5000 rpm, separar el líquido sobrenadante y agregar por cada mL de líquido sobrenadante 125  $\mu$ L de óxido de bario y 125  $\mu$ L de sulfato de zinc, para precipitar las impurezas. Colocar la mezcla en tubos eppendorf, dejar reposar 10 min y posteriormente centrifugar durante 10 min a 10 000 rpm. Analizar las muestras en el HPLC para cuantificar xilosa, glucosa y ácido acético.

Se utilizó un HPLC marca Waters modelo 2414, con columna Shodex SH1011 y detector índice de refracción a 50 °C, empleando como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una concentración de 5 mM con un flujo de 0.6 mL/min a 55°C.

---

---

## ANEXO B

### CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MÉTODO DE M. LOWRY

#### Reactivo 1

Mezclar 1 mL de la solución A, con 1 mL de la solución B y 98 mL de la solución C.

**Solución A:** Disolver 40 g de NaOH en 300 mL de agua destilada, y 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 400 mL de agua destilada, mezclar y aforar a 1 L.

**Solución B:** Disolver 20 g de tartrato de sodio y potasio en 500 mL de agua destilada, aforar a 1L.

**Solución C:** Disolver 10 g de  $\text{CuSO}_4$  en 500 mL de agua destilada y aforar a 1L.

Nota: El reactivo 1 se prepara minutos antes de su uso, ya que se descompone con la luz.

#### Reactivo 2

Folin-Ciocalteau /  $\text{H}_2\text{O}$  (Relación 1:2 en v / v)

#### Procedimiento:

1. Tomar 1 mL del cultivo problema y centrifugarlo hasta obtener el paquete celular (centrifugar 15 min a 10000 rpm).
2. Lavar las células con  $\text{MgSO}_4$  10 mM y resuspender las células en 1 mL o en un volumen adecuado.
3. Tomar una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  y llevarlo a 1mL con agua destilada.
4. Agregar 1 mL del reactivo 1, reposar 10 min.
5. Agregar 100  $\mu\text{L}$  del reactivo 2.
6. Reposar 30 min.

7. Centrifugar 2 min a 13 000 rpm en una centrifugadora
8. Leer la absorbancia a 625 nm en un espectrofotómetro, dejando previamente calentar el lente durante 10 min.

Para la curva de calibración se preparan soluciones a las concentraciones de 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 mg/mL de albúmina bovina, además de un blanco de agua destilada, aplicando a 200  $\mu$ L de cada solución (por duplicado), el mismo tratamiento que a las muestras, finalmente se realiza una gráfica de concentración contra absorbancia.

## ANEXO C

### **Cuantificación de azúcares reductores mediante el método de DNS**

El hidrolizado ácido se filtró para la cuantificación de los azúcares reductores totales se utilizó el método de DNS de Miller, para ello se preparó el reactivo DNS, disolviendo 0.8 g. de NaOH en agua destilada, adicionando 15 g. de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado y 0.5 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico). Esta mezcla se aforó a 50mL con agua destilada y se almacenó en un frasco ámbar. La concentración de azúcares reductores se determinó utilizando una curva de calibración de absorbancia en función de concentración. Para obtener esta curva se prepararon soluciones de 200-1000 mg L<sup>-1</sup>, utilizando glucosa como estándar. A estas soluciones se les aplicó el método DNS y se leyó la absorbancia de cada una de ellas en un espectrofotómetro a una longitud de onda 540 nm. Una vez construida la curva patrón se aplicó el método DNS a cada una de las muestras, para lo cual se mezclaron 0.5 mL de cada muestra con 0.5 mL del reactivo DNS, se colocaron a ebullición por 5 min en Baño María e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. Se reconstruyeron las muestras con 5 mL de agua destilada, se agitaron, se dejaron en reposo por 15 min, y se determinó su absorbancia a 540 nm. El mismo tratamiento se realizó para el blanco con agua destilada. Leyendo la absorbancia de cada una de las muestras en la curva patrón se determinó la concentración de azúcares reductores.

---

---

## ANEXO D

### Cuantificación de azúcares reductores mediante el método de Fehling

#### Fundamento:

Todos los monosacáridos y los disacáridos con enlace mono-carbonilo, cuando se encuentran en solución a pH alcalino, tienen la capacidad de reducir otros compuestos. Esta capacidad reside en las características del grupo carbonilo (C anomérico en formas cicladas) libre. Esta propiedad, y por tanto, la presencia de un azúcar reductor, se ponen de manifiesto mediante la reacción de Fehling.

#### Reactivos:

- Fehling A:  $\text{CuSO}_4$  disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$
- Fehling B: NaOH y tartrato Na-K disueltos en agua
- Azul de metileno al 1%

#### Procedimiento:

1. En un matraz de 250 mL agregar 5 mL De solución Fehling A y 5 mL de sol. Fehling B
2. Diluir hasta alcanzar un volumen de 50 mL de solución
3. Llevar a ebullición en una parilla eléctrica, agregar 2 gotas de azul de metileno al 1%.
4. En cuanto llegue a ebullición titular con la muestra problema.
5. Cuantificar la cantidad volumétrica gastada hasta el vire a rojo ladrillo de la solución Fehling.
6. Realizar por duplicado para cada muestra problema.



## ANEXO E

### Preparación del medio Luria Bertani (LB)

El Caldo luria (Luria Bertani LB) o caldo LB contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos.

Ingredientes:

Cloruro de sodio 5.0 g L<sup>-1</sup>

Extracto de levadura 5.0 g L<sup>-1</sup>

Peptona de caseína 10.0 g L<sup>-1</sup>

pH 7.2 ± 0.2.

Preparación:

Rehidratar 20 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución. Distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Conservar en refrigeración de 2° a 8°C

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adaya, L. (2010). Aislamiento de bacterias capaces de producir Polihidroxicanoatos utilizando hidrolizados de bagazo de caña como sustrato. Tesis de Licenciatura. División de ciencias biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana.

Almeida, A., A.M. Giordano, P.I. Nickel, M.J. Pettinari. 2010. Effects of aeration on the synthesis of poly (3-hidroxybutyrate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology. **76**(6): 2036-2040.

Amada, A, A. (2008). Polyhydroxyalkanoates: from basic research and molecular biology to application. IUM Engineering Journal, **9** (1); 37:73.

Annarita, P., Paola D.D., Gennaro, R.A., Barbara N.2011. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. Hindawi publishing corporation archaea. Article ID 693253, 13 páginas.

Cerrone, F. 2011. Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alpeorajo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno. Tesis de doctorado. Universidad de Granada. España.

Chandler, C., N. Villalobos, E. González, E. Arenas, Z. Mármol, J. Ríos, C. Aiello. 2012. Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. Multiciencias 12 (3):245-253.

Chen ,G, Q. 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. The Royal Society of Chemistry, crit. Rev. **38**:2434-2446.

Cortínez, V.V. 2010. Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Tesis de magister en ciencias de ingeniería. Universidad de Chile. Chile.

Cuervo, L., J.L. Folch, R.E. Quiroz. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. Biotecnología. **13** (3):11-25

Espinosa, F.J. 2013. Obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación a partir del excedente orgánico del banano variedad *Musa paradisiaca*. Tesis de licenciatura. Universidad central del Ecuador. Ecuador.

García-Mendoza, A., F. Chiang. 2003. The confusión of *Agave vivípara* L. and *A. angustifolia* Haw., two distinct taxa. *Brittonia***55** (1): 82-87

González, G.Y., J.C. Meza, R.O. González y L.A. Córdova. 2013. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambiental.* **29** (1): 77-115.

Hendriks A.T.W.M., Zeeman, G.. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology.* **100**:10-18.

Jiménez, I, D., Abreu, C, A., López-López, V, E., Tellez, J, A., Graciada, R, J, N. 2012. Obtención de azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida de *Beta vulgaris* L. *Rev. Int. Contam.Ambie.***28**(2):151-158.

Joao, M,B,T., Cavalhero, M., Catarina, M, D., Christian Grandfils, M, M, R. 2009. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry.* 44:509-515.

Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., Varila, P. 2005. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and susplus materials.*Biomacromolecules.***6**:561-565.

Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., Thongchul, N. 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by anew isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of bioscience and bioengineering.***107** (3): 240-245.

Larsson, S., E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi y N. Nilvebrandt. 2000. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and MicrobialTechnology.***24**:151-159.

Law J.H., Slepecky R. A. 1961. Assay of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. J Bacteriol **82**: 33–36.

Liu, Z., Wang, Y., He, N., Huang, J., Zhu, K., Shao, W., Wang, H., Yuan, W., Li, Q. 2011. Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by excess activated sludge and microbial community analysis.

Martínez-Gutierrez, G., A. Iñiguez-Covarrubias, G., Ortiz-Hernandez, Y. D., Lopez-Cruz, J. Y., Bautista-Cruz, M. A. 2013. Tiempos de apilado del bagazo del maguey mezcalero y su efecto en las propiedades del compost para sustrato de tomate. Rev. Int. Contam. Ambie. **29** (3): 209-216.

Mantilla, T.M. 2012. Hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar y paja de trigo con una posterior fermentación alcohólica para obtención de etanol. Tesis de licenciatura. Universidad central del Ecuador. Ecuador.

Mohammad, J., Karimi. K. 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. Bioresources. **2** (3): 472-499.

Naranjo, J. 2010. Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.

Rivera-Mackintosh, L. B., Nevarez-Moorillón, V. N. 2009. Fuentes de carbon económicas para la producción de bioplásticos bacterianos. Tecnociencia Chihuahua. **3** (2): 58-63.

Rodríguez-Garay, B., J.A. Lomelí-Sención, E. Tapia-Campos, A. Gutiérrez-Mora, J. García-Galindo, J.M. Rodríguez-Domínguez, D. Urbina-López, I. Vicente-Ramírez. 2009. Morphological and molecular diversity of *Agave tequilina* Weber var. Azul and *Agave angustifolia* Haw. var. Linenño. Industrial crops and products. **29**:220-228.

Rodman, T.H., M. Helder, A.R. Robert, J. Peter, L. John R. F. 2011. Application of Polyethylene Glycol to Promote Cellular Biocompatibility of Polyhydroxybutyrate Films. International Journal of Polymer Science. ID del artículo 473045. 9 páginas.

- Rubín, E, M. (2008). Genomics of cellulose Biofuels. *Nature* **4**:841-845.
- Ruiz, G, A., Ramírez, de Lara, M, C., Antolín, G, G. 2011. Efecto de hidroximetilfurfural sobre el crecimiento de hongos en pan de molde. *Cienciasagronómicas*.**18**: 27-31.
- Sanjay, K, S., Sigh, M. 2011. Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing a of *Bacillus spp.* From glucose in two stage system. *Indian j Microbiol.* **51**(4):418-423.
- Shi, H., Kyuwa, K., Takasu, M., Shimizu, K. 2001. Temperature-induced expression of *phb* genes in *Escherichia coli* and the effect of temperature patterns on the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of bioscience and bioengineering.* 91 (1):21-26.
- Silva, L, F., Taciro, M, K., Michelin Ramos M, E., Carter, J. M., Pradella, J. G. Gomez C. J. (2004). Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 245–254.
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *BioresourceTechnology.* **83**:1-11.
- Tomas, M.E. 2010. Bioetanol de Paja de Trigo: Estrategias de Integración de las Etapas del Proceso. Tesis de doctorado. Universidad complutense de Madrid. España.
- Tripathi, A. D., SrivastavaS. K., SinghR. P. 2013. Statical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes sp.* *Biomass and Bioenergy,* **55**:242-250.
- Vázquez, E.N. 2013. Determinación de las variables que afectan el proceso de obtención del biopolímero polihidroxibutirato (PHB) a partir de residuos de agave, empleando la bacteria *Bacillus sp.* IBT42. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Vera, G. A. M., P.A. Santiago, M.G. López. 2009. Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. Rev. Fitotec. Mex**32** (4): 273-279.

Verlinden, R. A. J., Hill, D, J., Kenward, M, A., Williams, C, D., Radecka, I. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Applied Microbiology. 102: 1437-1499.

Wolf, O., M. Crank, F.M. Weidemann, J. Schleich, B. Hüsing, G. Angerer. 2005. Technoeconomic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe. Technical Report EUR 22103.

Zaldivar, J., Martinez, A., Ingram, L. 1999. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering.**65**(1):24-33.

