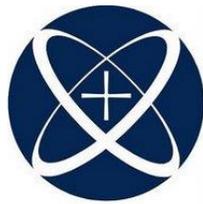


**Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente**  
**Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales**

**Desarrollo tecnológico y generación de riqueza sustentable**

**PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)**

**Programa de desarrollo tecnológico para la sustentabilidad ambiental, energética y alimentaria.**



**ITESO**  
Universidad Jesuita  
de Guadalajara

4D08 Desarrollo tecnológico para la sustentabilidad ambiental, energética y  
alimentaria.

**Procesos simultáneos de producción de enzimas hidrolíticas y remoción  
biológica de hemicelulosa bajo el concepto de biorrefinería.**

**PRESENTAN**

Programas educativos y Estudiantes

Lic. En Ingeniería en Biotecnología. José Alberto Herrera Barragán IB697873

Profesor PAP: Felipe Sánchez Carrillo

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre 2018

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional.....	1
Resumen .....	1
1. Introducción.....	3
1.1. Objetivos .....	3
1.2. Justificación .....	3
1.3. Contexto .....	4
2. Desarrollo .....	6
2.1 Índice de abreviaturas .....	6
2.2. Sustento teórico .....	6
2.3 Metodología .....	16
2.4. Planeación y seguimiento del proyecto .....	30
3 resultados del trabajo profesional .....	37
3.1 Caracterización de <i>Cellulomonas flavigena</i> PR-22 .....	37
3.2 Caracterización de sustrato .....	39
3.3 Determinación de pH y porcentaje de humedad favorecedor para el cultivo de <i>Cellulomonas</i> .....	40
3.4 Diseño de biorreactor estilo lecho percolador con aeración en contraflujo y recirculación de medio líquido (BLPR).....	41
3.1 Caracterización física de BLPR .....	52
3. Reflexión de aprendizajes, implicaciones éticas y aportes sociales del proyecto. ...	70
4.1 Aprendizajes profesionales .....	70
4.2 Aprendizajes sociales.....	70

4.2 Aprendizajes éticos.....	70
4.3 Aprendizajes personales.....	71
4. Conclusiones.....	71
6. Referencias .....	72
7. Anexos .....	76

### ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Enzimas características para la degradación de holocelulosa. ....	8
<b>Cuadro 2.</b> Resultados de efectividad en degradación de celulosa y lignina, producción de celulosa y relación C:N para distintos microorganismos.....	11
<b>Cuadro 3.</b> Combinación de distintos medios para evaluar agua.....	17
<b>Cuadro 4.</b> Concentración de compuestos Medio Mínimo Mineral .....	17
<b>Cuadro 5.</b> Diseño factorial 3 <sup>2</sup> por triplicado para determinar el efecto del pH y el %H en <i>C. flavigena</i> con BSS. ....	22
<b>Cuadro 6.</b> Preparación de muestras para actividad enzimática.....	27
<b>Cuadro 7.</b> D.O. de crecimiento de <i>C. flavigena</i> con distintos volúmenes de muestras de aguas. ....	37
<b>Cuadro 8.</b> Resultados de crecimiento microbiano evaluado a distintas concentraciones de CaCl <sub>2</sub> .....	38
<b>Cuadro 9.</b> Actividad CMCasa y crecimiento a distinto %de humedad y pH. ....	40
<b>Cuadro 10.</b> Dimensiones y relaciones geométricas del biorreactor.....	45

### ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 : Protocolo para cuantificación de $\alpha$ -, $\beta$ - y $\gamma$ -celulosa, lignina, ceniza y hemicelulosa (por diferencia) de material vegetal.....	77
Anexo 2. Protocolo para re-suspensión de <i>Cellulomonas flavigena</i> en sustrato sólido, determinación de crecimiento mediante microgoteo y actividad CMCasa.....	84
Anexo 3. Diseños 3D de BLPR hechos en AUTOCAD .....	86

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la composición de la biomasa lignocelulolítica. (Rose & Bennet, 1999)	9
Figura 2 Micrografía de escaneo de electrones <i>C. flavigena</i> 134. (Abt, y otros, 2010)	12
Figura 3 Secuencia de gen de RNAr 16s (Genebank X83799) de <i>C. flavigena</i> 134. (Abt, y otros, 2010)	13
Figura 4. Procedimiento realizado para hacer una tinción de Gram y observar al microscopio.	16
Figura 5. Procedimiento realizado para determinar el efecto del agua de proceso en el crecimiento de <i>C. flavigena</i> PR-22.	16
Figura 6 Procedimiento realizado para determinar la dureza del medio para <i>C. flavigena</i> .	17
Figura 7. Proceso para ajustar el pH del rastrojo de maíz.	19
Figura 8. Proceso para secar el rastrojo de maíz.	20
Figura 9. Proceso para preparar cultivo solido con rastrojo de maíz para <i>C. flavigena</i>	21
Figura 10. Diagrama de flujo para determinación hidráulica del BLPR de vidrio y de acero inoxidable.	23
Figura 11. Diagrama de flujo para caracterización térmica de BLPR de vidrio y de acero inoxidable.	23
Figura 12. Diagrama de flujo para caracterización de lavado de azúcares reductores en BLPR.	24
Figura 13. Diagrama de flujo para caracterización metabólica de <i>Cellulomonas flavigena</i> PR-22 en BLPA.	25
Figura 14. Diagrama de flujo para determinación de relación de CO <sub>2</sub> en gases exhaustos con biomasa producida.	26
Figura 15. Diagrama de flujo para determinación de actividades enzimáticas en cualquier muestra.	27
Figura 16. Diagrama de flujo para caracterización metabólica de <i>Cellulomonas flavigena</i> PR-22 en BLPR prototipo de vidrio.	28
Figura 17. Diagrama de flujo para caracterización metabólica de <i>Cellulomonas flavigena</i> PR-22 en BLPR prototipo de vidrio.	29

Figura 18. Imagen en microscopio de <i>C. flavigena</i> con lente 100x.....	37
Figura 19. Porcentaje de lignina en RM150, RM200, RM300 y olote. ....	39
Figura 20. Bocetos iniciales del biorreactor de lecho percolador, aeración a contraflujo y recirculación de medio. Esta versión inicial aun proponía un enchaquetado para control de temperatura. ....	42
Figura 21. Boceto mejorado de biorreactor de lecho permeable con recirculación, ya con el dimensionamiento final y la adición de tres entradas de aire a lo largo de la columna ....	43
Figura 22. Boceto final digitalizado con las dimensiones reales del reactor. ....	44
Figura 23. Boceto de la parte superior del BLPR .....	46
Figura 24. Entradas de aire en la columna y posición de termopares. ....	47
Figura 25. Bocetos de A) la estructura cónica y flujo del efluente de la columna y B) del reservorio donde ocurrirá el control del sistema y la etapa de crecimiento. ....	48
Figura 26. Boceto final digitalizado en SolidWorks. ....	49
Figura 27. Prototipo de BLPS de plástico en pruebas de agua con rastrojo de maíz.....	50
Figura 28. Medio líquido en reservorio tras 12 horas de lavado. ....	51
Figura 29. Prototipo de BLPS de vidrio y sus partes: a) reactor completo armado y con referencia de dimensión, b) pieza de distribución estilo regadera, c) las 3 entradas de aire a la columna, d) tapa, e) fondo cónico con coladera y f) referencia de dimensión junto a cada una de las partes.....	52
Figura 30. Diagrama de flujos dentro del sistema BLPR MBQ .....	53
Figura 31. Remoción de azúcares reductores en 50 g de RM200 .....	54
Figura 32. BLPR RBK instalado previo a recirculación de medio .....	54
Figura 33. Entradas de aire y sensores de temperatura a lo largo de la columna del BLPR	55
Figura 34. A) Caracterización térmica de BLPR RBK manteniendo controlada la temperatura del reservorio a 32°C en prueba de agua y B) en cultivo de <i>C. flavigena</i> . ....	55
Figura 35. Crecimiento, representado por proteína total, de <i>C. flavigena</i> PR-22 en los 3 BTAs SCHOTT DURAN utilizados.....	56
Figura 36. Modelo logístico de crecimiento para BTA. ....	57

Figura 37. A) Sistema de BTA utilizado para comprobación de CO <sub>2</sub> como representante de producción de biomasa en el cual se aprecia también B) el sistema de medición de K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> producido mediante a cambios el peso en la trampa de potasa, C) el BTA Schott DURAN empleado en el cultivo y D) la trampa de potasa.....	58
Figura 38. Modelo logístico de producción de K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> cultivo de <i>Cellulomonas flavigena</i> PR-22 para BTA.....	58
Figura 39. A) Crecimiento inhibido de <i>C. flavigena</i> en BLP RBK y B) azúcares reductores en el medio líquido.....	59
Figura 40. A) Reactor cilíndrico con termopares instalados, B) termopar tipo T, C) módulo de recepción de datos (4 entradas) y D) Resistencia sumergible de pecera. ....	60
Figura 41. Caracterización térmica de BLPR MBQ y efecto de aeración a 34°C. Gráfica obtenida directamente del software del registrador de datos Measurement Computing USB-5100 Series.....	60
Figura 42. Sistema de caracterización térmica para BLPR MBQ con implementación de aire húmedo y a temperatura de 34°C utilizando un frasco Schott Duran y una termobalanza con control Thermofisher.....	61
Figura 43. Biorreactor de lecho percolador con A) Matraz bola con sensor de CO <sub>2</sub> , B) trampa de algodón para absorber humedad del aire, C) reservorio, D) columna del lecho, E) bomba peristáltica y F) humidificador y calentador de aire.....	62
Figura 44. A) Vista del reservorio desde la parte superior y B) desde el perfil.....	62
Figura 45. Crecimiento de biomasa y reducción de azúcares reductores durante el transcurso del cultivo en BLPR MBQ. ....	63
Figura 46. Actividad enzimática en comparación con crecimiento de biomasa y referencia de actividad en BTA para A) FPasa en BLPR MBQ y B) OLTasa en BLPR MBQ. ....	64
Figura 47. Modelo matemático exponencial de crecimiento de <i>Cellulomonas flavigena</i> PR-22 y CO <sub>2</sub> a tiempo real.....	65
Figura 48. Composición del RM200 A) previo y B) post la incubación en MBQ.....	66
Figura 49. Concentración de proteína y turbidez en la suspensión de A) RM200 neutro y B) RM200 post 120 horas de incubación.....	66

Figura 50. Crecimiento y actividad enzimática de <i>C. flavigena</i> PR-22 en BLPR utilizando BGA como sustrato.....	67
Figura 51 Crecimiento celular reportado como proteína extracelular y modelo logístico MMF; concentración de azúcares reductores en el medio.....	68

## REPORTE PAP

### Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

*Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.*

*A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.*

### Resumen

A partir de la necesidad de satisfacer la demanda energética global, se han realizado esfuerzos en torno a la investigación en el ámbito del uso y aprovechamiento de residuos agroindustriales. La materia lignocelulósica es atractiva debido al alto contenido de carbohidratos que pueden ser utilizados para la producción de metabolitos de interés industrial, así como de biocombustibles de segunda generación. Sin embargo, es necesario remover selectivamente cada uno de los componentes a través de procesos termoquímicos y biológicos antes de ser aprovechados en procesos fermentativos. El uso de pretratamientos biológicos en sustrato sólido es de particular interés para nuestro grupo de trabajo debido a que se pueden obtener títulos enzimáticos altos con un mínimo consumo de agua. Para ello, el objetivo de este trabajo contempló el diseño y caracterización de un biorreactor de sustrato sólido (lecho percolador con recirculación) (BLPR) para la producción de enzimas hemicelulolíticas extracelulares por parte de

*Cellulomonas flavigena* PR-22. Se construyeron dos biorreactores BLPR, un prototipo constituido de borosilicato (al cual se le denominó BLPR “RBK”) y el otro fue construido de acero inoxidable 304 (al cual se denominó “MBQ”). La columna del BLPR tiene 25.5cm de alto (HT), 5.1cm de diámetro (DT) y VOP = 360.7cm<sup>3</sup>. Dentro del cuerpo del reactor, se encuentra dispuesto un sistema de sujeción de biomasa y un aspersor de medio de cultivo. Además, el reactor cuenta con cuatro entradas de aeración y temperatura controlada en distintos puntos del lecho. El BLPR se caracterizó térmica e hidráulicamente. Los parámetros de operación fueron establecidos de acuerdo con las condiciones adecuadas de crecimiento de *C. flavigena* PR-22 en material lignocelulósico (32°C, 75% H, 1.5 vvm, pH = 6 - 8), como diluyente se utilizó un medio mineral mínimo formado por sales grado industrial enriquecido con extracto de levadura (0.2%). Se utilizaron dos distintas biomásas: rastrojo de maíz (RM200) y bagazo de agave (BGA), ambas pretratadas por explosión de vapor. Con la operación del sistema utilizando RM200, se obtuvo una producción 2.2 veces mayor de hemicelulasas en comparación con un tanque agitado (BTA) durante la primera semana de cultivo. Con bagazo de agave se produjeron 2200 U/mL de actividad hemicelulasa en la primera semana de cultivo. En ambos casos, el crecimiento de *C. flavigena* PR-22 fue ajustado a un modelo cinético exponencial y se determinó una velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) de 0.00375 h<sup>-1</sup> en RM200 y de 0.08865 h<sup>-1</sup> en BGA. La recirculación del microorganismo y de las enzimas solubles en el medio líquido permite una constante hidrólisis de la holocelulosa del sustrato, lo cual permite el crecimiento microbiano, producción de enzimas y remoción de la fracción de hemicelulosa. Hasta el momento los resultados preliminares indican que es posible realizar la remoción biológica de la hemicelulosa (de sustratos pretratados) con la subsecuente producción y recuperación de enzimas de interés industrial.

## 1. Introducción

### 1.1. Objetivos

#### 1.1.1. *Objetivo General*

Diseñar, caracterizar y comparar un biorreactor en sustrato sólido a escala laboratorio con uno de tanque agitado para hidrólisis biológica de hemicelulosa y simultánea producción de enzimas hidrolíticas por *Cellulomonas flavigena* PR-22.

#### 1.1.2. *Específicos*

- Diseñar y construir un biorreactor en sustrato sólido que tome en cuenta las necesidades metabólicas de *Cellulomonas flavigena* PR-22
- Caracterizar la producción de enzimas xilanasas y celulasas en el sistema.
- Comparar los rendimientos de consumo de sustrato y producción de enzimas holocelulolíticas con un reactor de tanque agitado.

### 1.2. Justificación

De acuerdo con la orientación de estudios de un ingeniero en biotecnología del ITESO, uno de los objetivos principales es utilizar, de manera segura y responsable, agentes biológicos para el desarrollo de tecnología y procesos que beneficien a la sociedad y al ambiente. A partir de la necesidad de satisfacer la demanda energética global, la inestabilidad económica de los recursos fósiles no renovables, disminuir las emisiones de gas invernadero y priorizar la sustentabilidad del agua en la industria energética, se ha realizado una gran cantidad de investigación en el uso de los residuos lignocelulolíticos para la producción de bioenergía de segunda generación en los últimos años. El pretratamiento necesario para volver accesibles los biopolímeros de la biomasa lignocelulolítica incrementa considerablemente los costos y repercute en un cuello de botella para el desarrollo de esta energía renovable. El diseño de un biorreactor en sustrato sólido que hidrolice lignocelulosa como pretratamiento biológico y a su vez produzca enzimas de valor económico agregado puede favorecer una ingeniería circular en el proceso de biorefinamiento que vuelva redituable el uso de la bioenergía y que a su vez represente un ahorro considerable de agua de proceso.

### 1.3. Contexto

La bioenergía es, actualmente, la energía renovable con mayor uso, la cual equivale a aproximadamente el 10% del suministro energético global (International Energy Agency, 2017). Su estándar de emisión de gases de efecto invernadero oscila entre una reducción del 50 al 60% en comparación con los equivalentes a la gasolina. (Environmental Protection Agency, 2016). A pesar de esto, diversas publicaciones científicas han criticado el uso de biomasa para la producción de energía debido a la competencia que existe entre la explotación energética y la alimentaria. En la biorrefinería se convierten varios tipos de materia prima orgánica, principalmente cultivos alimenticios, en productos portadores de energía. Se estima que el uso de suelo empleado para el cultivo de biomasa de primera generación destinado para bioenergía (maíz y soya principalmente) podría alimentar al 30% de la población mundial. Sumado a esto, el agua de riego utilizada para este fin equivale al 3% del consumo global de agua. (Martinez-Hernandez & Samsatli, 2017).

Diversos estudios concluyen que para poder hacer sustentable el uso de la bioenergía se tiene que cambiar el rumbo de producción hacia materia prima orgánica de segunda generación, es decir, residuos agroindustriales. Los desechos de la industria agraria componen la mayor cantidad de biomasa disponible en el planeta según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés). De igual manera, la huella de uso de agua es nula puesto a que se recicla material deshecho y sin valor agregado. (Mathioudakis, Gerbens-Leenes, Meer, & Hoekstra, 2017) Nizami y compañía concluyen que la producción de biocombustibles de segunda generación en países de desarrollo puede habilitar una economía circular y favorecer, no solo la demanda energética del país, sino la creación de empleos, ahorro de tierras, suministro de comida y disminuir la emisión de gases invernadero. (Nizami, y otros, 2017) En México, se estima que se producen 75.73 millones de toneladas de residuos agroindustriales, de los cuales el 80% corresponde a cultivos primarios (rastreo de maíz, sorgo y trigo). Esta cantidad de biomasa tiene potencial para que diversas municipalidades de México produzcan individualmente 0.3 millones de m<sup>3</sup> de bioetanol al año. (Valdez-Vazquez, Acevedo-Benítez, & Hernández-Santiago, 2010)

La principal desventaja de los residuos agroindustriales es que su estructura química suele ser recalcitrante y limita los rendimientos de conversión energética. La lignocelulosa, su principal componente, es un biopolímero complejo cuya degradación no es sencilla, sin embargo, produce una gran cantidad de azúcares fermentables y asimilables para la producción de bioetanol y otros biocombustibles. Es por esto por lo que en los recientes años se ha dado prioridad a la investigación y desarrollo de tecnologías que permitan utilizar los residuos de la agricultura para la producción de bioenergía de segunda generación. (Chen, y otros, 2016)

Uno de los pasos primordiales en la conversión de residuos agroindustriales es la sacarificación de la celulosa y hemicelulosa en azúcares sencillos (mono y disacáridos), la cual normalmente se lleva a cabo mediante a una biorreacción enzimática utilizando diversas enzimas hidrolíticas, como lo son las endoglucanas, beta-glucanasas, xilanasas, etc. (Alvira, Tomás-Pejó, Ballesteros, & Negro, 2009) Estas proteínas se obtienen de diversos microorganismos, ya sean silvestres o genéticamente modificados, que sobre expresan fenotípicamente los genes codificadores de las mismas. Se utilizan distintos tipos de biorreactores, cuyo fin es proporcionar las condiciones adecuadas para que el microorganismo fije su ruta metabólica hacia la producción de las enzimas deseadas. El uso más común, tanto en industria como a nivel experimental, es el de biorreactores de sustrato sumergido debido a que el control de temperatura, pH, aeración, transporte y esterilización es más sencillo que en sustrato sólido. No obstante, los rendimientos y la concentración de producto suelen ser considerablemente mayores en sustrato sólido. Sumado a esto, la relación de agua de proceso y cantidad de producto es mucho menor que en un sustrato sumergido; este ahorro de agua se vuelve imperativo en la actualidad donde la demanda de agua incrementa mientras que la disponibilidad y accesibilidad (tanto física como económica) se vuelven un problema. (Mitchel, A., Verovic, & Krieger, 2006)

## 2. Desarrollo

### 2.1 Índice de abreviaturas

°C	Grados Celsius	C: N	Carbono-Nitrógeno
pH	Potencial de hidrógeno	pb	Pares de base
%H	Porcentaje de humedad	G+C	Guanina más citosina
Kg	Kilogramos	RNA	Ácido ribonucleico
NaOH	Hidróxido de sodio	CMC	Carboximetil celulosa
Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de calcio	BSL	Biorreactores con sustrato líquido
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico	BSS	Biorreactores con sustrato sólido
MPa	Millones de Pascales	RM150	Rastrojo de maíz pretratado a 150°C
O <sub>2</sub>	Oxígeno diatómico	RM200	Rastrojo de maíz pretratado a 200°C
MMM	Medio mínimo mineral	RM300	Rastrojo de maíz pretratado a 300°C
psi	Libra por pulgada cuadrada	OLT	Olote seco y molido
min	Minutos	BLPR MBQ	BLPR construido en acero inoxidable
s	segundos	BLPR RBK	BLPR construido en borosilicato
		BLPR	Biorreactor de lecho percolador recirculado.

### 2.2. Sustento teórico

#### 2.2.1 Biorrefinerías

La creciente preocupación por utilizar energía sustentable ha reforzado el uso de las biorrefinerías en la industria, las cuales se definen por su proceso de convertir biomasa vegetal, la materia prima renovable más abundante del mundo, en productos energéticos de valor agregado. La bioenergía se divide principalmente en dos clasificaciones: De primera y segunda generación. (Özdenkci, y otros, 2017) La biorrefinería de primera generación utiliza materia prima a base de cultivos comestibles, siendo maíz, soya y caña de azúcar los más comunes. Se caracteriza por utilizar procesos sencillos y económicos, sin embargo, se ha criticado este proceso por la huella de carbono y agua que representa el cultivo de la materia prima, además del índice de competencia alimentaria de los cultivos. (Martinez-Hernandez & Samsatli, 2017). Por otro lado, la biorrefinería de segunda generación utiliza residuos agroindustriales a base de materia lignocelulolítica. Los residuos agroindustriales tienen un índice de huella de agua nula, debido a que son desechos de agrarios de una industria distinta.

### 2.2.2 Biomasa Lignocelulolítica

En el concepto de biorrefinería se reconoce como biomasa a toda materia orgánica vegetal o animal que se produce en ambientes naturales o controlados y que puede, o no, ser industrialmente transformada en bioetanol u otros biocombustibles. La biomasa lignocelulolítica representa el 60% de la biomasa vegetal producida en el mundo (Vandamme, 2009). Se compone principalmente de 3 polímeros estructurales: celulosa en un 40-50%, hemicelulosa en 25-30% y lignina en 15-20%. A la combinación de carbohidratos totales (celulosa más hemicelulosa) se le conoce como holocelulosa. Tiene también algunas trazas de pectina, compuestos nitrogenados, y otros ingredientes inorgánicos. La composición exacta de la misma varía dependiendo de la especie. (Chen, y otros, 2016)

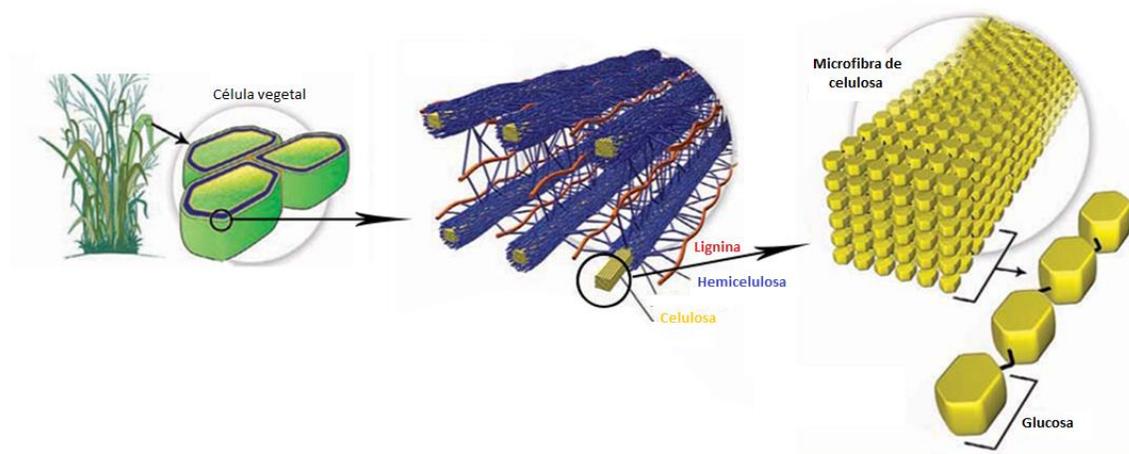
La celulosa es un polímero lineal de glucopiranosas ancladas por el enlace  $\beta$ -(1,4)-glucosídico y es el polímero más abundante del mundo. No es soluble en agua más que a altas temperaturas y en presencia de un catalizador (Knauf & Moniruzzman, 2004). Es muy estable debido a la cristalinidad que le proporciona su arreglo ordenado de cadenas poliméricas aglomeradas. Debido al gran tamaño y complejidad de este biopolímero, existen distintas enzimas necesarias para degradarlo hasta su componente monomérico: la glucosa. Estas enzimas hidrolasas se anclan al enlace glucosídico y lo cortan para reducir el tamaño de la cadena lineal. Las cuatro proteínas celulolíticas (también conocidas como celulasas) son las endoglucanasas, celobiohidrolasas I y II y las  $\beta$ -glucosidasas. A pesar de que su actividad hidrolítica es la misma, la posición en la que lo hacen dentro de la celulasas varía, como se puede observar en el *cuadro 1*.

**Cuadro 1.** Enzimas características para la degradación de holocelulosa.

	Tipo de enzima	E.C.	Estructura 3D	Sustrato	Actividad	Cepas productoras	Ref.
<b>Celulasas</b>	Endoglucanasas	3.2.1.4		Celulosa	Anclaje aleatorio a enlace $\beta$ -1,4-glucosídico.	<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus subtilis</i>	(Khademi, y otros, 2002) (Rose & Bennet, 1999)
	Celobiohidrolasas I	3.2.1.91		Celulosa	Anclaje al enlace $\beta$ -1,4 terminal del extremo <b>reductor</b> .	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Clostridium thermocellum</i>	(Mattinen, Linder, Drakenberg, & Annala, 1998)
	Celobiohidrolasas II	3.2.1.91		Celulosa	Anclaje al enlace $\beta$ -1,4 terminal del extremo <b>no-reductor</b>	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	(Schubot, y otros, 2004) (Pérez, Muñoz-Dorado, de la Rubia, & Martínez, 2002)
	$\beta$ -glucosidasas	3.2.1.21		Celobiosa	Hidroliza la celobiosa para producir 2 glucosas.	<i>Bacillus polymyxa</i> <i>Aspergillus niger</i>	(Sanz-Aparicio, Hermoso, Martínez-Ripoll, Lequerica, & Polaina, 1998)
<b>Hemicelulasas</b>	Xilanasas	3.2.1.8		Xilana	Hidroliza el enlace $\beta$ -1,4-xilana	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	(Lo Leggio, y otros, 2001)
	$\alpha$ -galactosidasas	3.2.1.22		Galactosidasa	Hidroliza enlaces $\beta$ -glucosídicos	<i>Escherichia Coli</i> K12	(Jacobson, Zhang, DuBose, & Matthews, 1994)
	Mananasas	3.2.1.78		Manano	Hidroliza los enlaces del manano	<i>Streptomyces sp.</i>	(Jin, y otros, 2016)
	Acetil xilana esterasa	3.1.1.72		Acetil Xilana	Remueve grupos acetilo de la xilana	<i>Thermotaga maritima</i>	(Levisson, y otros, 2012)

En contraste con la celulosa, la hemicelulosa es un polímero de distintos tipos de polisacáridos, incluyendo acomodos lineales o ramificados, los cuales interactúan mediante a enlaces en grupos acetil y metilo. Tiene un grado de polimerización muy bajo, por lo que es más fácil de degradar en distintos monosacáridos, principalmente pentosas como arabinosa, xilosa, galactosa, manosa, etc. (Knauf & Moniruzzman, 2004)

Finalmente, la lignina es un complejo completamente hidrofóbico a base de compuestos aromáticos interconectados. Este polímero polifenólico está formado por unidades fenilpropanos conectados por enlaces éster y conexiones carbono-carbono. Es completamente aleatorio en el sentido de que la estructura y repetición de unidades varía sin orden alguno. El alto grado de polimerización, orden y cristalinidad que tiene la lignocelulosa le otorga estabilidad a la pared celular vegetal y dificulta su degradación. (Chen, y otros, 2016)



**Figura 1.** Esquema de la composición de la biomasa lignocelulolítica. (Rose & Bennet, 1999)

### *2.2.3 Pretratamientos de biomasa lignocelulolítica*

Debido a lo recalcitrante que es la biomasa lignocelulolítica, es prácticamente imposible (o con rendimientos muy bajos) producir bioenergía con la materia cruda. En la última década se ha creado especial énfasis en la investigación y desarrollo de tecnologías para pretratar la biomasa y volverla viable para la producción de bioetanol, biocombustibles y otros productos de valor agregado. El proceso de pretratamiento altera la microestructura, macroestructura y composición química de la lignocelulosa para que sea más susceptible a degradación microbológica, sin embargo, a nivel industrial este paso representa una desventaja económica considerable. Se han evaluado distintos tipos de tecnologías con el fin de utilizar la menor cantidad de energía, agua y aditivos posible, así como elevar los

rendimientos para eventualmente reducir el costo de los bioenergéticos de segunda generación.

Existen cuatro métodos de pretratamiento principales y sus combinaciones. El tratamiento físico incluye normalmente procesos térmicos, de aplastado, molienda, microondas, ultrasonido y radiación eléctrica. Los principales objetivos del tratamiento físico son reducir la cristalinidad y grado de polimerización de la lignocelulosa para facilitar el acceso de las enzimas encargadas de la sacarificación, así como el tamaño de partícula para tener mayor área de contacto e hidrólisis. (Alvira, Tomás-Pejó, Ballesteros, & Negro, 2009) Una de las ramas de tratamiento físico que más potencial tiene para la producción de bioetanol es la extrusión, ya que combina altas temperaturas, mezclado y corte para romper y reducir las fibras de carbohidratos con altos rendimientos y ahorro energético.

El tratamiento químico es, actualmente, el más común, el cual tiene como base tratamientos ácidos, alcalinos y combinados. Para la hidrólisis alcalina se utiliza NaOH y/o  $\text{Ca(OH)}_2$  para solubilizar la lignina y sus precursores, sin embargo, no hidroliza eficientemente la hemicelulosa. Degradar la hemicelulosa durante el pretratamiento es deseado, ya que facilita la posterior sacarificación enzimática al reducir la variedad, cantidad o eficiencia de las enzimas requeridas. El tratamiento ácido utiliza principalmente  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y es muy eficaz para degradar cadenas poliméricas de pentosas y reducir el grado de polimerización de la materia. Se prefieren concentraciones diluidas de ácido debido a los subproductos tóxicos que derivan de la hemicelulosa, como lo es el furfural, y compuestos aromáticos de la lignina (Vandenbossche, y otros, 2014).

En cuanto a tratamientos fisicoquímicos, el más empleado es explosión de vapor. En este proceso hidrotérmico la biomasa se somete a vapor altamente presurizado durante un periodo de tiempo (desde segundos a varios minutos) y es súbitamente despresurizado creando una explosión de descompresión que rompe la estructura ordenada y cristalina de la lignocelulosa y, por consiguiente, reduce los grados de polimerización con rendimientos

muy altos. De igual manera, las altas temperaturas promueven la auto hidrólisis de carbohidratos debido a la formación de ácido acético a partir de los grupos acetilos presentes en la hemicelulosa y al comportamiento ácido que adquiere el agua. Este proceso, además de ser energética y económicamente viable, evade el uso adicional de agentes ácidos perjudiciales para el ambiente. En un estudio realizado por Zhao et. al, se optimizaron las condiciones de explosión de vapor para colonización microbiana utilizando rastrojo de maíz a 1.5MPa, 200°C, 10%H y 180s. Con estos parámetros logró reducir la cantidad de hemicelulosa en un 55% y redujo el grado de polimerización (Zhao, Li, Zheng, Wang, & Yu, 2018)

El pretratamiento biológico emplea microorganismos capaces de delignificar la biomasa y degradar la holocelulosa. Usualmente se utilizan distintas cepas de hongos, principalmente *Aspergillus niger* genéticamente modificado u otros hongos de podredumbre blanca (*Phanerochaete chrysosporium*, entre otros). En los tratamientos biológicos la relación carbono-nitrógeno se ve considerablemente reducida debido a la degradación de carbohidratos complejos (y por consiguiente emisión de CO<sub>2</sub>) y el aumento de masa proteica (Singh, y otros, 2007). El tratamiento de biomasa utilizando microorganismos ofrece grandes ventajas en comparación con los anteriores: bajo capital de inversión, baja demanda energética, no requiere químicos añadidos, limita la producción de subproductos tóxicos y se trabaja a condiciones ambientales. No obstante, el principal inconveniente es la lenta tasa de hidrólisis, ya que una biorreacción de este tipo puede extenderse hasta semanas. (Vandenbossche, y otros, 2014)

**Cuadro 2.** Resultados de efectividad en degradación de celulosa y lignina, producción de celulosa y relación C: N para distintos microorganismos.

Cepa	Relación C: N	Celulasa FPU g <sup>-1</sup>	Celulosa %	Lignina %
<i>Cellulomonas cartae</i>	60.2	0.18	25.4	5.50
<i>Cellulomonas uda</i>	51.7	0.20	21.8	5.50
<i>Bacillus macerans</i>	54.8	0.16	30.4	5.50
<i>Zymomonas mobilis</i>	55.2	0.12	26.8	8.00
<i>Trichoderma reesei</i>	57.4	0.11	34.5	5.00
<i>Trichoderma viride</i>	60.4	0.09	41.3	8.00
<i>Aspergillus terreus</i>	41.7	0.24	19.9	1.00
<i>Aspergillus awamori</i>	60.0	0.12	22.9	4.00

Control	107.9	0.02	44.4	12.0
FPU: Unidad de actividad de papel filtro. (Singh, y otros, 2007)				

#### 2.2.4 *Cellulomonas flavigena* PR22

No solo se utilizan hongos para la degradación de biomasa, también existen bacterias con la maquinaria enzimática necesaria para desarrollarse y crecer en lignocelulosa mientras degrada sus carbohidratos estructurales. El género de *Cellulomonas sp.* ha sido evaluado por Singh y compañía para la degradación de lignina y celulosa, así como la producción de celulasas, en bagazo de caña de azúcar como pretratamiento biológico (cuadro 2). *Cellulomonas* es una actinobacteria gram positiva que forma colonias blancas o amarillentas de aproximadamente 5mm de diámetro en agar glucosa con extracto de levadura y tiene una de morfología bacilo a microscopio. (Stackerbrandt & Kandler, 1979) A pesar de ser característicamente inmóvil, Thayer reporta un promedio de dos flagelos por cada célula vista bajo microscopía de electrones (Thayer, 1984). Crece en un ambiente estrictamente aerobio con una temperatura óptima de 32°C y pH7.



**Figura 2** Micrografía de escaneo de electrones *C. flavigena* 134. (Abt, y otros, 2010)

El genoma de *C. flavigena* se compone de 4´123,179pb en un solo cromosoma circular y con un contenido de 74.3% G+C. De los 3788 genes predichos, 3735 codifican para proteína, 53 para RNAs y 57 para pseudogenes. Su secuencia de identificación 16S, con código Genbank X83799, tiene 1500pb. (Birte, y otros, 2010)

```

1  ggctgctta acacatgcaa gtcgaacggt gaaggtcagc ttgctgacc gatcagtggc
61  gaacgggtga gtaacacgtg agcaacctac ccttcactct gggataagcc ttggaacga
121 ggtctaatac cggatacagc acgcacgggc atctgtagcg tctggaaga tttatcggtg
181 ggggatgggc tcgcgcccta tcagcttgtt ggtggggtaa tggcctacca aggcgacgac
241 gggtagccgg cctgagaggg cgaccggcca cactgggact gagacacggc ccagactcct
301 acgggagcca gcagtgggga atattgcaca atgggcccga gcctgatgca gcgacggcgc
361 gtgcgggatg acggccttcg ggttgtaaac cgctttcagc agggagaag cgagagtgc
421 ggtacctgca gaagaagcgc cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggc
481 gcaaacgctt tccggaatta ttgggtgtaa agagctcgtg ggcggttgt cgcgtctgct
541 gtgaaaacct caggctcaac ctggggcctg cagtgggtac gggcagacta gagtgcggta
601 ggggtgactg gaattcctgg tgtagcgggt gaatgcgcag atacaggag gaacaccgat
661 ggcgaaggca ggtcactggg ccgcaactga cgctgaggag cgaagcatg gggagcgaac
721 aggattagat accctggtag tccatgccgc aaacgttggg cactagggtg ggggtccatt
781 ccacggattc cgtgcccgag caaacgcatt aagtgcctcg cctggggagt acggccgcaa
841 ggctaaaact caaagaatt gacgggggccc cgcaaacg gcggagcatg cggattaatt
901 cgatgcaacg cgaagaacct taccaaggct tgacatacac cggaaactg cagagatgtg
961 cccccgcaa ggtcgggtga cagggtggtc atggttctg tcagctcgtg tctgagatg
1021 ttgggttaag tcccgcgaac agcgcaacc tcgtcccagc ttgccagcgg gttatgccgg
1081 ggactcatgg gagactgccg ggtcaactc ggaggaagg ggggatgacg tcaaatcgc
1141 atgcccctta tgtcttgggc ttcacgcatg ctacaatggc cggtaacaag ggctgcgata
1201 ccgcgagggt gagcgaatcc caaaaagccg gtctcagttc ggattggggt ctgcaactcg
1261 accccatgaa gtcggagtcg ctagtatcgc cagatcagca acgctcgggt gaatacgttc
1321 ccggcccttg tacacaccgc ccgtcaagtc atgaaagtc gtaacaccg aagccgatgg
1381 cccaaccgca aggggggagt cgtcgaaggt gggactggcg atagggacta agtcgtaaca
1441 aggtagccgt cgtcgaaggt gggactggcg atagggacta agtcgtaaca aggtagccgt

```

**Figura 3** Secuencia de gen de RNAr 16s (Genbank X83799) de *C. flavigena* 134. (Abt, y otros, 2010)

*Cellulomonas flavigena* es destacada por su capacidad de degradar celulosa y hemicelulosa, por lo que su mayor uso ha sido en la generación de bioenergía de segunda generación, ya sea degradando holocelulosa o bien produciendo enzimas para utilizar posteriormente en la sacarificación. *C. flavigena* PR22 es una mutante hiperproductora de CMCasa (enzima degradadora de CMC) y xilanasas que ha sido ensayada para procesos de sacarificación de bagazo de caña con pretratamiento alcalino. En biorreactores estilo columna de burbuja con sustrato sumergido, se reporta una alta productividad enzimática volumétrica equivalente a 638.54 U/L h y 40.3U/L h para xilanasas y CMCasa, respectivamente. (Rojas-Rejón, y otros, 2016). No obstante, es muy limitada la investigación de *Cellulomonas* en biorreactores de sustrato sólido.

### *2.2.5 Biorreactores en sustrato sólido*

Un biorreactor es cualquier sistema controlado que permita el desarrollo de una biorreacción, ya sea metabólica o enzimática. Tanto en la industria como a nivel laboratorio y piloto, el uso más común de los biorreactores es con cultivos de sustrato líquido (BSL), donde el microorganismo crece suspendido en un medio de cultivo líquido con todos los nutrientes disueltos o igualmente suspendidos en partículas diminutas. En estos sistemas, el control de temperatura, pH y viabilidad de O<sub>2</sub> es relativamente sencillo, el esfuerzo cortante es limitado o puede ser reducido (sobre todo en tanques agitados) y la alimentación de nutrientes puede ser modificada (en lote, continuo o semicontinuo) para alterar el estado metabólico de las células. Sumado a esto, el modelamiento y escalamiento de los bioprocesos está muy estudiado e inclusive existe software con herramientas para llevarlo a cabo con mayor facilidad. (Krishna, 2005)

Los biorreactores en sustrato sólido (BSS) se caracterizan por crecer en materia sólida con un grado elevado de humedad y espacio gaseoso entre cada partícula. La gran mayoría de los cultivos utilizados en BSS son estricta o facultativamente aerobios. En contraste con los BSL, los BSS pueden llegar a ser estresantes para el microorganismo. Al estar en contacto directo con aire, la biomasa corre el riesgo de secarse, la transferencia de energía y masa en interacción gaseoso/sólido dificulta la homogeneidad de temperatura y la accesibilidad de oxígeno. De igual manera, suelen crearse grandes gradientes de concentración de nutrientes entre todas las partículas del reactor y el esfuerzo cortante de las partículas sólidas en movimiento es considerablemente mayor que en sustrato sumergido. (Mitchel, A., Verovic, & Krieger, 2006)

A pesar de esto, existen escenarios donde un BSS es favorecedor. Cuando un metabolito se produce únicamente bajo estas condiciones (o con un mayor rendimiento que en BSL) o bien cuando no se pueden mantener todas las condiciones de esterilidad adecuadas (los sustratos sólidos son menos propensos a contaminación que los líquidos) es recomendable utilizar BSS. Otro aspecto importante que considerar es que, al tener una alta producción y

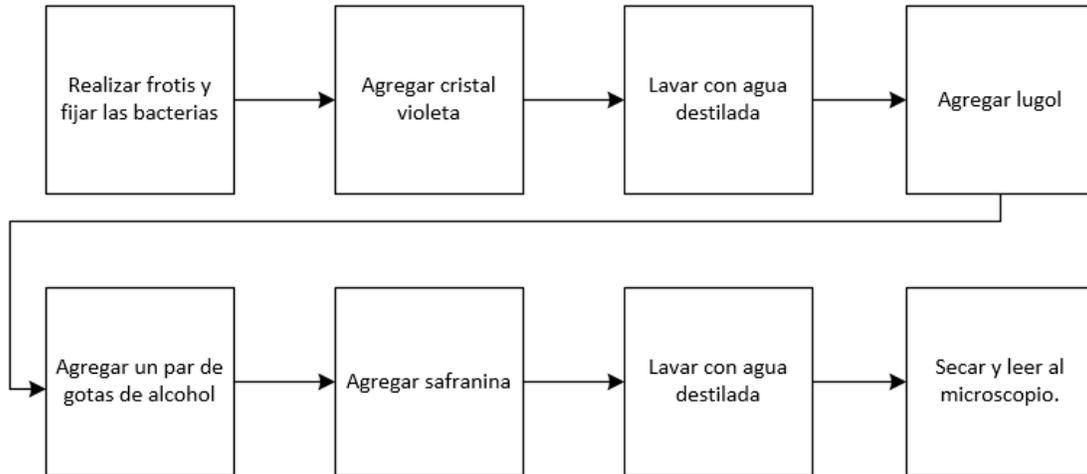
diminuto volumen de agua, las concentraciones y rendimientos de producto finales suelen ser muy altos, lo cual simplifica el proceso de purificación downstream consiguiente. (Mitchel, A., Verovic, & Krieger, 2006)

Los modelos de BSS varían dependiendo del microorganismo empleado y el producto deseado. El modelo más sencillo de BSS es el de charolas, en el cual se extiende una capa de sustrato sobre una bandeja y coloca dentro de un espacio controlado. Existen también modelos de tambores rotatorios con constante adición de agua y aire cuyo movimiento permite tener una mayor homogeneidad en el cultivo y poder reproducir los resultados eficientemente. Existen también columnas empacadas, lechos permeables, entre muchos otros. A pesar de haber una gran cantidad de propuestas distintas, el principal cuello de botella sigue siendo la reproducibilidad y el escalamiento exitoso. Mantener el control en cuanto a gradientes de temperatura representa un reto importante para la industria, ya que el calor metabólico producido por el microorganismo no aumenta en proporción con el dimensionamiento o escalamiento de un diseño de biorreactor. Para mantener las temperaturas óptimas de crecimiento, es necesario estar removiendo constantemente energía calórica. (Krishna, 2005)

## 2.3 Metodología

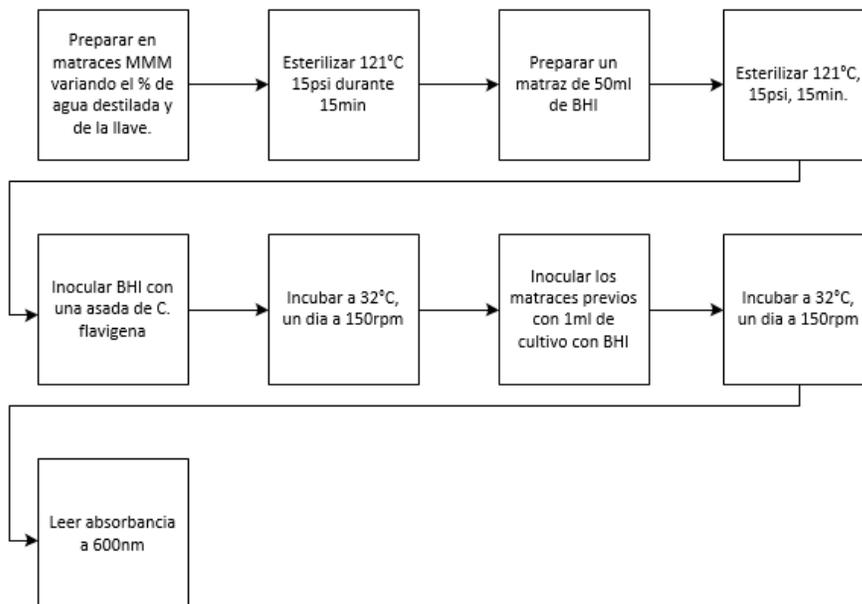
### 2.3.1 Caracterización de *Cellulomonas flavigena* PR-22 BSL

#### 2.3.1.1 Tinción de Gram



**Figura 4.** Procedimiento realizado para hacer una tinción de Gram y observar al microscopio.

#### 2.3.1.2 Determinación de agua para cultivo



**Figura 5.** Procedimiento realizado para determinar el efecto del agua de proceso en el crecimiento de *C. flavigena* PR-22

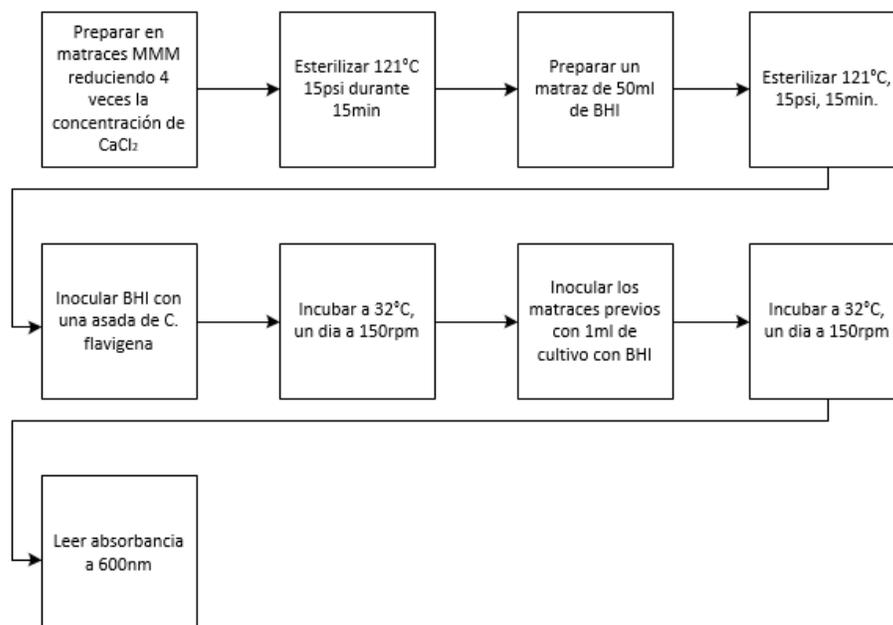
**Cuadro 3.** Combinación de distintos medios para evaluar agua.

Buffer fosfato (mL)	Glucosa 100 g L <sup>-1</sup> (mL)	Agua de la llave (mL)	Agua destilada (mL)
2	2	0.0	16
2	2	4.0	12
2	2	8.0	8.0
2	2	12	4.0
2	2	16	0.0

**Cuadro 4..** Concentración de compuestos Medio Mínimo Mineral

Compuesto	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5
NaCl	5.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.5
CaCl <sub>2</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub>	0.1
Extracto de levadura	0.6

### 2.3.1.3 Determinación de dureza para cultivo



**Figura 6** Procedimiento realizado para determinar la dureza del medio para *C. flavigena*.

### 2.3.2 Caracterización de sustratos

Un aspecto esencial del rendimiento de un pretratamiento para las biorrefinerías es conocer la composición química de la biomasa utilizada. Tanto el bagazo de agave como el rastrojo de maíz utilizados fueron pretratados por explosión de vapor en el Laboratorio de Futuros en Bioenergía del CINVESTAV. Langridge determinó que el bagazo de agave tuvo un aumento en la proporción de glucanos tras el pretratamiento termofísico; su composición holocelulolítica cambio de 16% xilanos y 37% glucanos previos al tratamiento a 46.2% glucanos y 3.41% xilanos, esta última es la que se utilizó como sustrato en para el crecimiento de *C. flavigena*. Para el rastrojo de maíz y olote se determinó el porcentaje de lignina soluble de Karson.

#### 2.3.2.1 Determinación de porcentaje de humedad.

Se colocó 1gr de muestra RM200 en una termobalanza a 100°C.

#### 2.3.2.2 Porcentaje de lignina en muestras de rastrojo y olote

Se desarrolló un protocolo basado en el preestablecido por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable, adaptado a las condiciones y equipos disponibles en los laboratorios de química, alimentos y biotecnología del ITESO; se puede observar en el anexo 1.

2.3.3 Preparación de rastrojo de maíz para crecimiento de *C. flavigena* PR-22 en sustrato sólido.

2.3.3.1 Neutralización de rastrojo de RM200

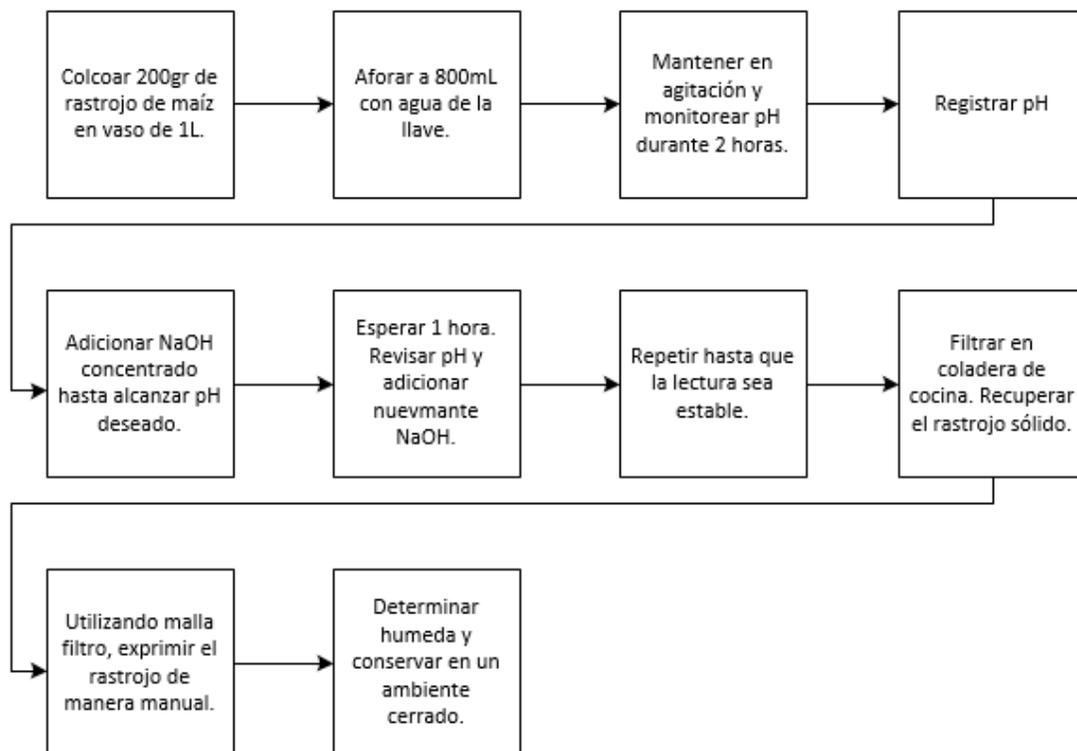
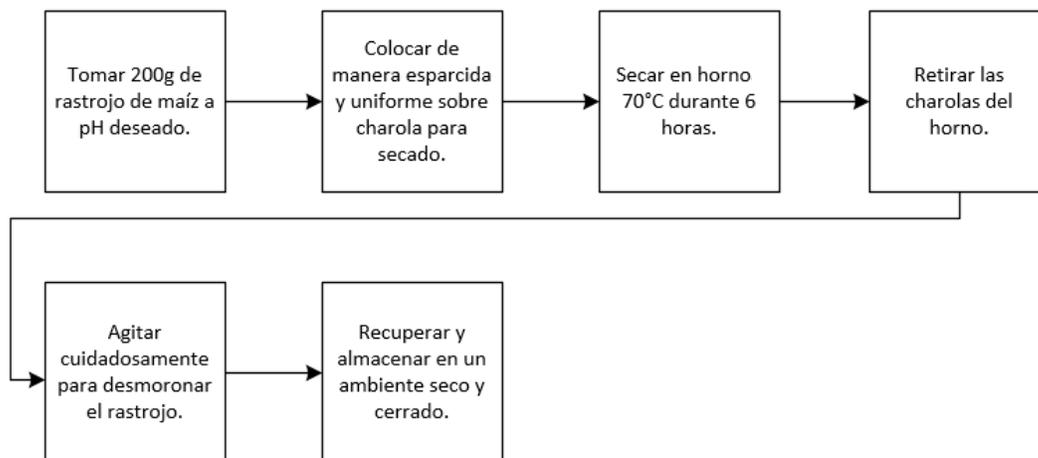


Figura 7. Proceso para ajustar el pH del rastrojo de maíz.

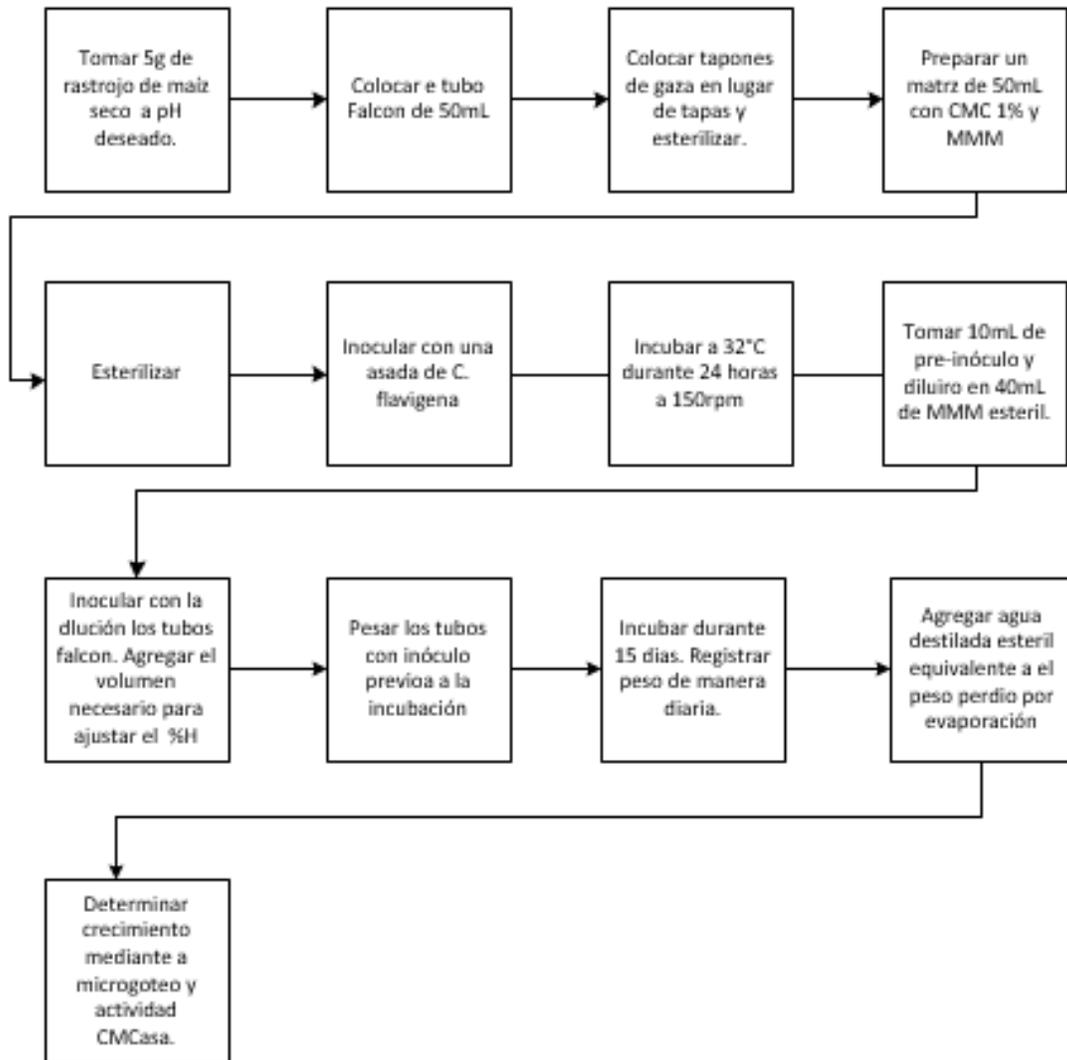
### 2.3.3.2 Secado de rastrojo de maíz



**Figura 8.** Proceso para secar el rastrojo de maíz.

### 2.3.4. Determinación de crecimiento de *C. flavigena* PR-22 en BSS con RM200

#### 2.3.4.1 Preparación de medio de cultivo sólido y diseño de experimento.



**Figura 9.** Proceso para preparar cultivo solido con rastrojo de maíz para *C. flavigena*

**Cuadro 5.** Diseño factorial 3<sup>2</sup> por triplicado para determinar el efecto del pH y el %H en *C. flavigena* con BSS.

Muestra	pH	%Humedad
1	6	75
2	6	80
3	6	90
4	7	75
5	7	80
6	7	90
7	8	75
8	8	80
9	8	90

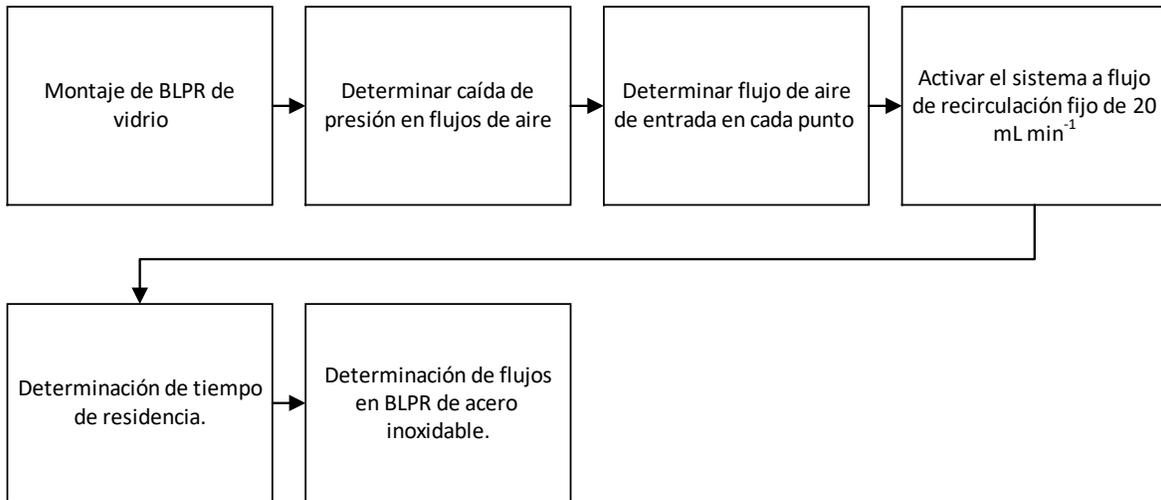
#### 2.3.4.2. Determinación de crecimiento mediante a micro colonias y actividad CMCasa

Se diseñó un protocolo a base de resuspensión de biomasa utilizando Tween80 0.1% y recuperación de extracto enzimático mediante a centrifugación y filtración. *Anexo 2.*

#### 2.3.5 Caracterización física del BLPR

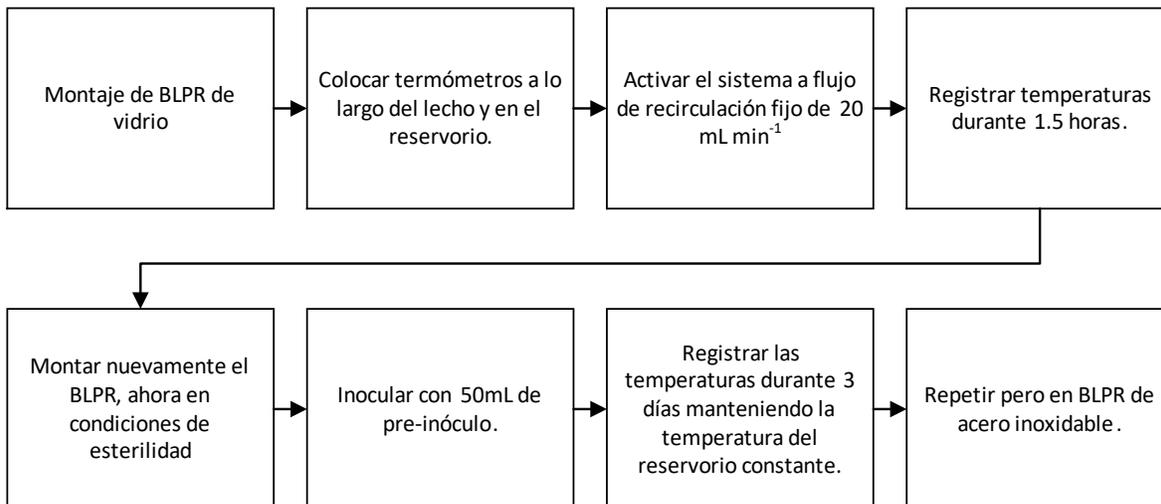
Con el fin de controlar las condiciones de cultivo y poder realizar balances de materia, es imperativo conocer las propiedades físicas cualquier biorreactor. En el caso del BLPR, se tomaron como aspectos fundamentales los flujos másicos y volumétricos, el balance energético y las condiciones cambiantes del medio de cultivo, el procedimiento para esto se describe en las figuras 10, 11 y 12, respectivamente.

### 2.3.5.1 Flujos



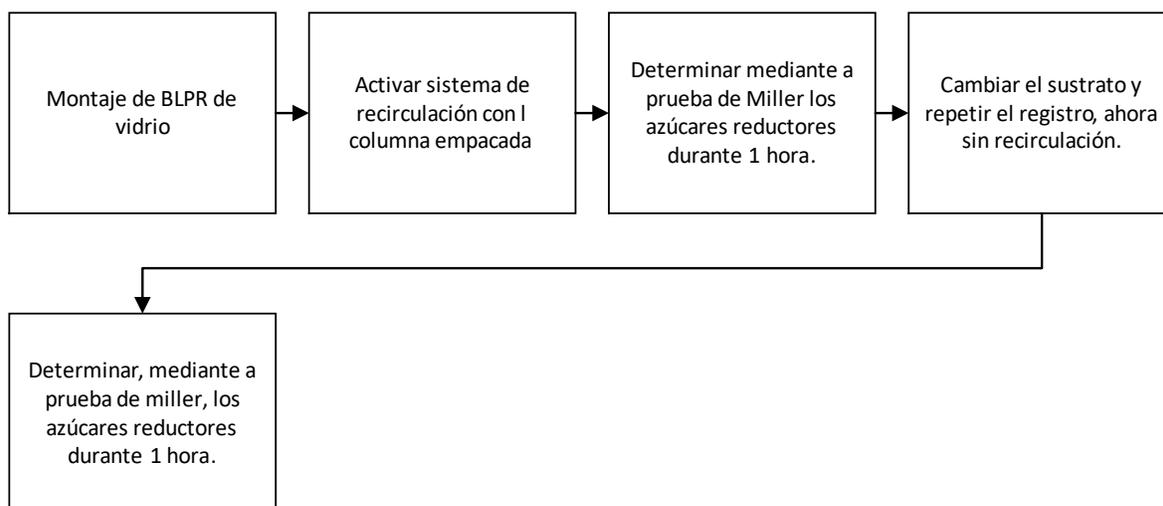
**Figura 10.** Diagrama de flujo para determinación hidráulica del BLPR de vidrio y de acero inoxidable.

### 2.3.5.2 Características térmicas



**Figura 11.** Diagrama de flujo para caracterización térmica de BLPR de vidrio y de acero inoxidable.

### 2.3.5.3 Lavado de azúcares reductores

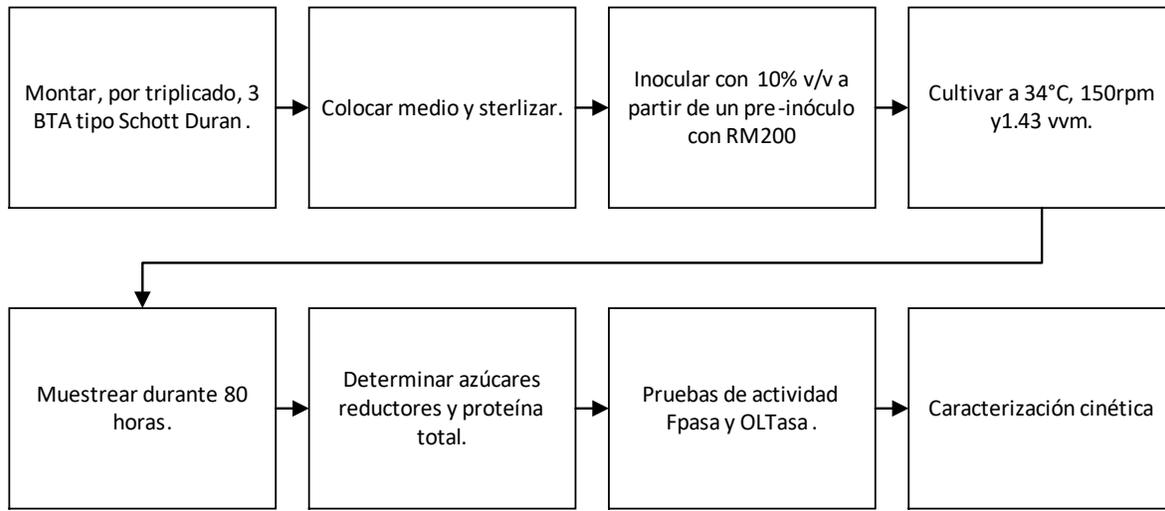


**Figura 12.** Diagrama de flujo para caracterización de lavado de azúcares reductores en BLPR.

### 2.3.6 Caracterización metabólica de *C. flavigena* PR22 en BTA

#### 2.3.6.1 Cultivo en BTA

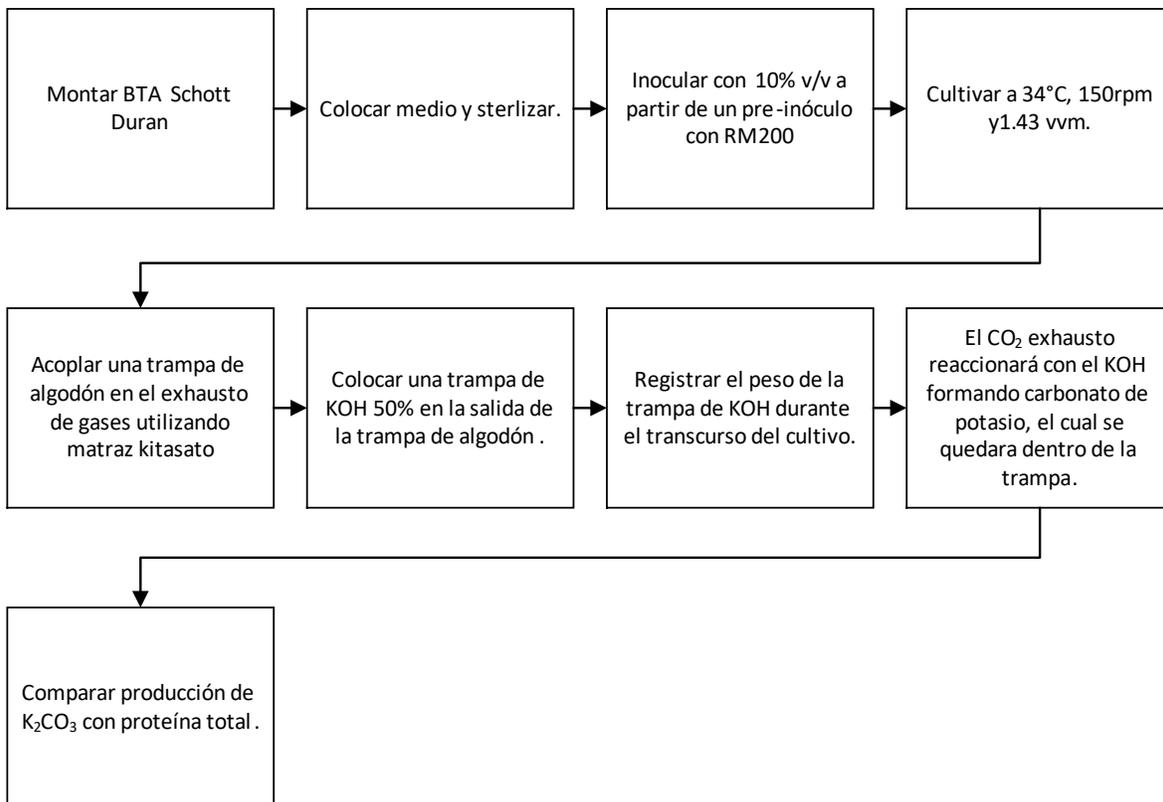
Con la finalidad de comparar los rendimientos de producción de holocelulolasas en el BLPR, se realizaron cultivos en biorreactores de tanque agitado para tener un punto de referencia. Se utilizaron frascos Schott de 1L con agitadores termomagnéticos. En la figura 13 se muestra el procedimiento utilizado.



**Figura 13.** Diagrama de flujo para caracterización metabólica de *Cellulomonas flavigena* PR-22 en BTA.

### 2.3.6.2 Determinación de CO<sub>2</sub> como indicador de crecimiento

Debido a la complejidad que representa cuantificar biomasa en biorreactores de sustrato sólido se planteó utilizar métodos de respirometría. Mediante a balances de carbono en biorreacciones aerobias, se puede relacionar el dióxido de carbono emitido por los microorganismos con el crecimiento celular. Se utilizo una trampa de hidróxido de potasio para reaccionar el dióxido de carbono y producir carbonato de potasio, el cual se calculaba mediante a gravimetría y relacionaba con la respiración celular; este procedimiento se puede observar en la figura 14.

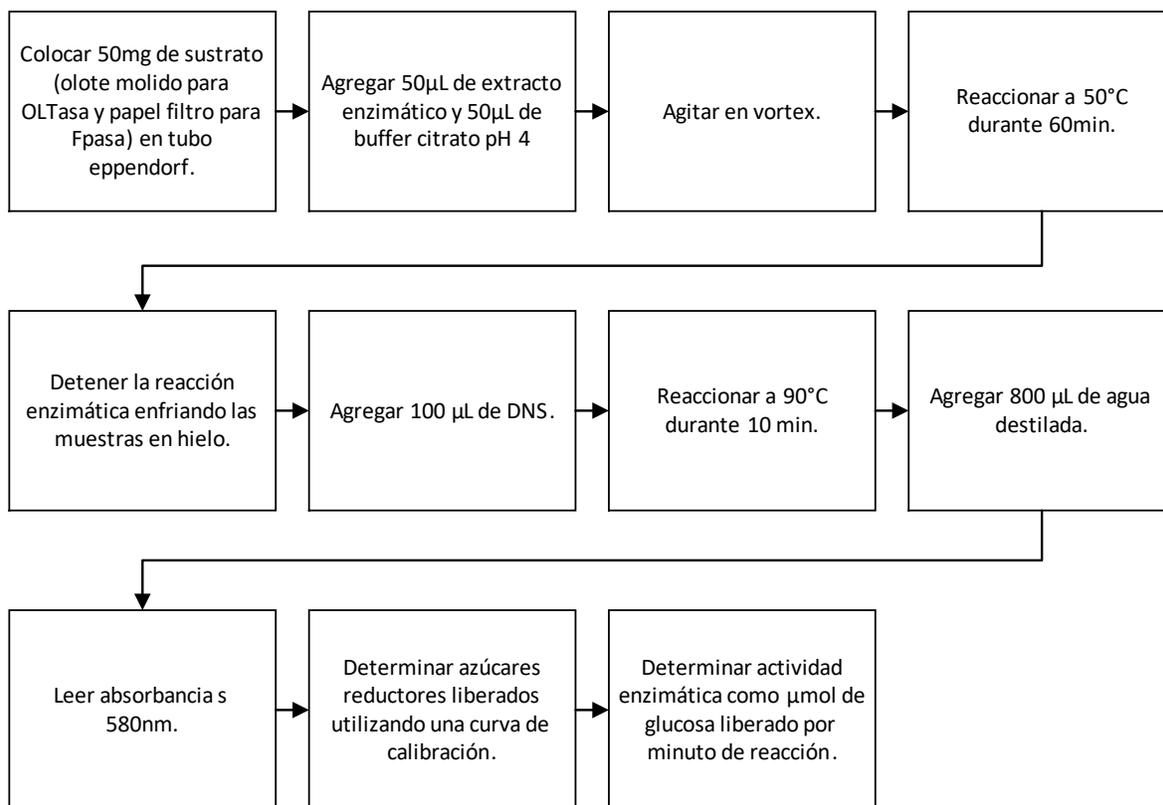


**Figura 14.** Diagrama de flujo para determinación de relación de CO<sub>2</sub> en gases exhaustos con biomasa producida.

### 2.3.6.3 Determinación de actividades enzimáticas.

En una primera instancia no se disponía de xilano para realizar pruebas representativas de actividad xilanasa, por lo cual se utilizó el olote como sustrato para dicha prueba, ya que tiene una alta cantidad del polisacárido estructural. Posteriormente, se consiguió xilano

puro (extraído de la haya) para una medición más acertada. Para determinar la actividad celulasa se utilizó papel filtro como sustrato. La metodología fue la misma para todas las pruebas, alternando únicamente el material inicial; se describe detalladamente en la figura 15.



**Figura 15.** Diagrama de flujo para determinación de actividades enzimáticas en cualquier muestra.

**Cuadro 6.** Preparación de muestras para actividad enzimática

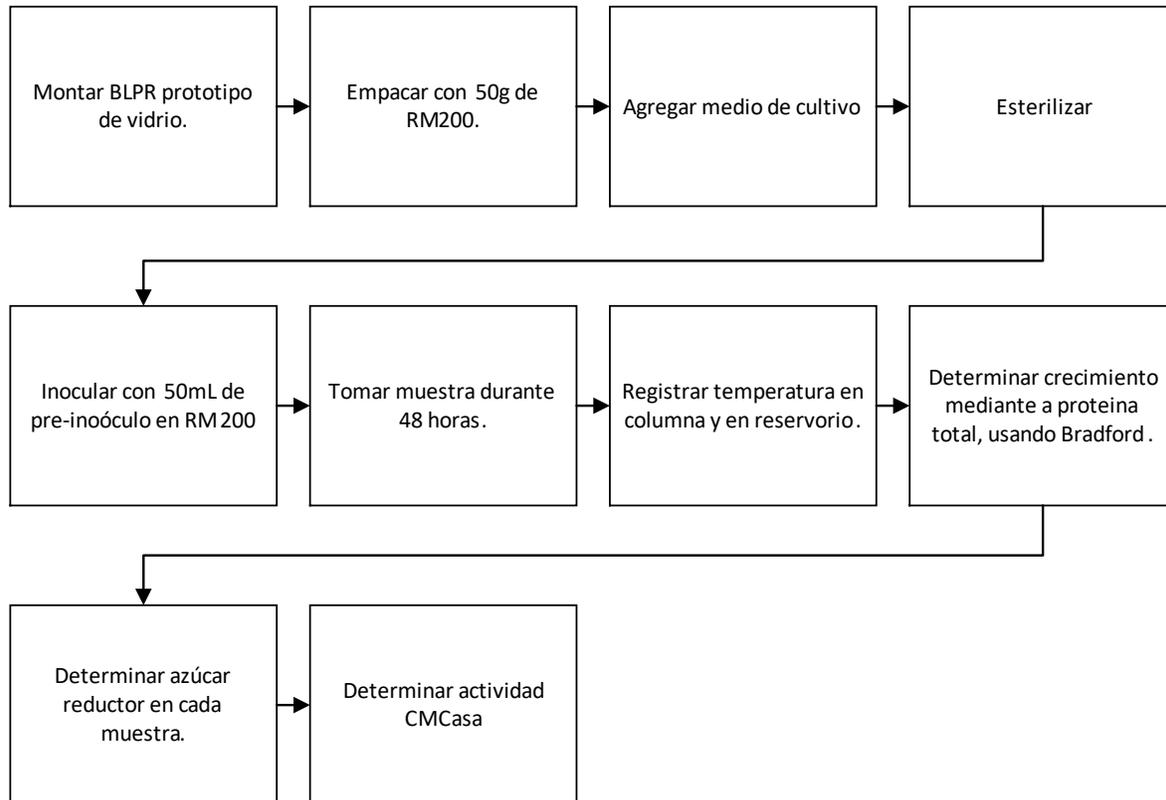
	Buffer fosfato-citrato (µL)	Extracto enzimático (µL)	Sustrato 1g L <sup>-1</sup> (µL)
Blanco de reactivos	200	-	-
Blanco de sustrato	40	-	160
Blanco enzimático	180	20	-
Muestra	20	20	160

### 2.3.7 Caracterización metabólica de *C. flavigena* PR-22 en BLPR

El crecimiento y producción de enzimas holocelulolíticas por parte de *C. flavigena* PR-22 fue caracterizado en el biorreactor de lecho percolador prototipo de vidrio (figura 11) y en el final de acero inoxidable (figura 12). Para una descripción más detallada del montaje,

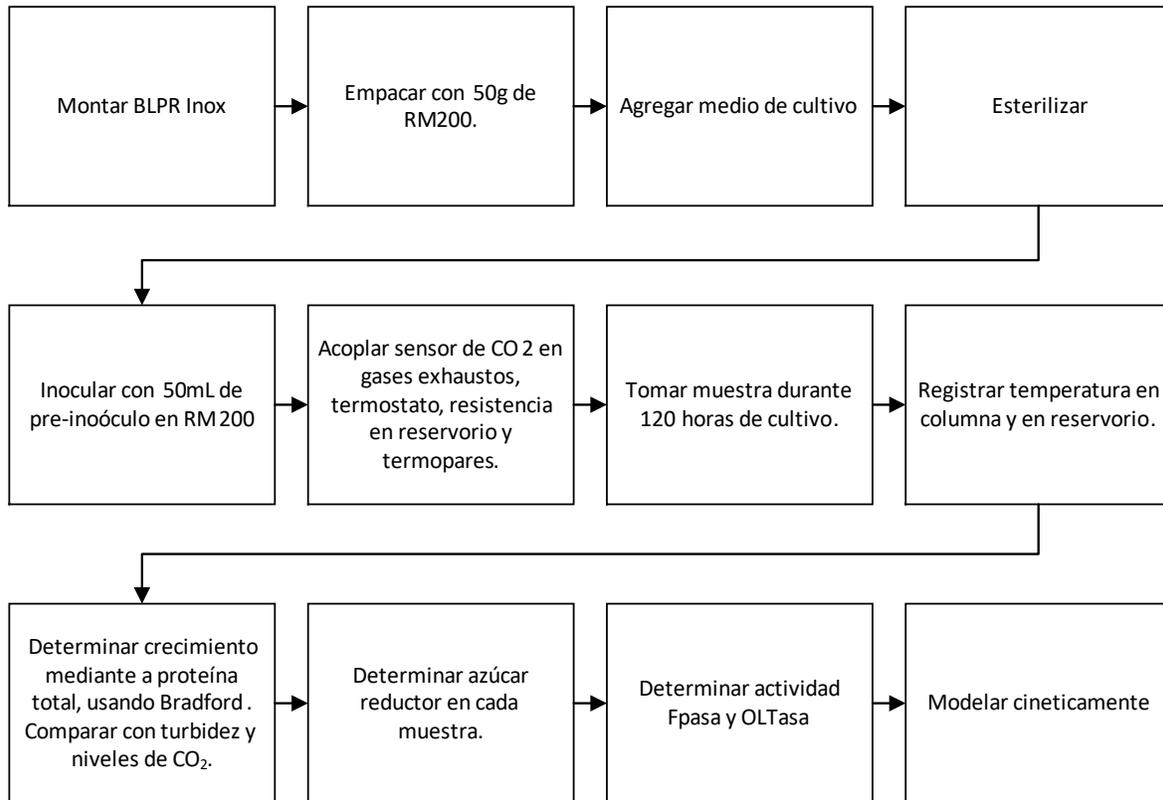
esterilización, manejo y cuidado del BLPR se puede consultar el documento anexo “Manual de Usuario: Biorreactor de Lecho Percolador”.

### 2.3.7.1 Cultivo en BLPR prototipo de vidrio



**Figura 16.** Diagrama de flujo para caracterización metabólica de *Cellulomonas flavigena* PR-22 en BLPR prototipo de vidrio.

### 2.3.7.2 Cultivo en BLPR de acero inoxidable



**Figura 17.** Diagrama de flujo para caracterización metabólica de *Cellulomonas flavigena* PR-22 en BLPR prototipo de vidrio.

### 2.3.8 Diseño de biorreactor en sustrato sólido y construcción de prototipo.

El diseño de reactor consistió en varias etapas:

- I. Revisión bibliográfica extensa.
- II. Lluvia de ideas y discusión.
- III. Diseño de varias propuestas que cumplieran con los requisitos deseados para el crecimiento de *C. flavigena* y la hidrólisis del sustrato.
- IV. Revisión y asesoramiento con profesionales y académicos.
- V. Selección, dimensionamiento y diseño 2D.
- VI. Diseño en 3D con SolidWorks.
- VII. Elaboración de prototipo temporal con material de laboratorio.
- VIII. Pruebas de agua.
- IX. Elaboración de prototipo de vidrio.

## 2.4. Planeación y seguimiento del proyecto

### 2.4.1 Descripción del proyecto

El proyecto comenzó con la necesidad de mejorar el pretratamiento de rastrojo de maíz para la producción de bioetanol desarrollado en el CINVESTAV. Se nos concedieron muestras de rastrojo de maíz pretratado con explosión de vapor en tres distintas temperaturas: 150°C, 200°C y 300°C. A pesar de que el tratamiento redujo considerablemente el grado de polimerización de la lignocelulosa, la concentración de hemicelulosa seguía siendo elevada para los estándares deseados. Se optó por desarrollar un pretratamiento biológico adicional a la explosión de vapor, utilizando *Cellulomonas flavigena* PR-22 como agente biológico catalítico. Esta bacteria, al ser hiperproductora de xilanasas y CMCasas, sería capaz de hidrolizar considerablemente la hemicelulosa del rastrojo de maíz y de cualquier sustrato holocelulolítica.

Previendo las complicaciones de crecer esta bacteria en rastrojo de maíz y tomando en cuenta el gasto de agua que representan los BSL, se diseñó y fabricó, en trabajos anteriores, un biorreactor en sustrato sólido capaz de proporcionar las condiciones adecuadas de crecimiento para *C. flavigena*. Este trabajo se enfocó en caracterizar los parámetros físicos

del biorreactor, así como el crecimiento de la bacteria y producción de enzimas holocelulolíticas.

El primer paso fue evaluar el crecimiento de *C. flavigena* y caracterizar sus condiciones de cultivo. Se hizo un cultivo inicial de la bacteria con un medio nutritivo y se observó al microscopio con una tinción de Gram. Al comprobar que las características morfológicas y estructurales de la pared celular coincidían con los reportados en la literatura para *C. flavigena*, se decidió empezar a formular un medio de cultivo propio. Tras una investigación bibliográfica se propuso utilizar el medio mínimo mineral presentado en el *cuadro 4* y utilizar CMC como fuente de carbono inicial. Tras varios intentos fallidos de crecimiento bajo estas condiciones, se decidió probar el efecto del agua en el crecimiento, variando la proporción de agua de la llave y agua destilada en el cultivo. El resultado indicó que el efecto del agua no era estadísticamente significativo, por lo que se optó por usar agua de la llave para abaratar costos.

A continuación, se realizó un nuevo experimento para mejorar el medio mínimo mineral. La misma cepa reportaba mejores rendimientos en otro laboratorio con exactamente las mismas condiciones, por lo que se dedujo que un elemento en el agua era el responsable de la inhibición. Se probó modificando la dureza de agua variando las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  en el medio. A bajas o nulas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  se encontró mayor crecimiento celular (reportado como DO 600nm), por lo que se eliminó esta sal del MMM y se obtuvieron muchos mejores resultados.

Previo a sustituir el CMC, se hicieron pruebas preliminares del sustrato. El rastrojo de maíz pretratado a 200°C fue el que reportó menor cantidad de lignina en tres ensayos distintos. De igual manera, *C. flavigena* tuvo mejores rendimientos actividad enzimática en presencia de RM200, en comparación con RM150 y RM300, por lo que se escogió este sustrato para los cultivos sólidos.

Se realizó un diseño de experimento factorial para determinar el efecto del pH (6,7 y 8) y del %H (75, 80 y 90) en un cultivo sólido. Se inoculó *C. flavigena* en tubos cónicos de 50 mL e incubaron las muestras a 32°C durante 15 días, a los cuales se les justaba el agua de manera diaria para mantener porcentaje de humedad deseado. Los resultados demostraron que ni el pH ni el porcentaje de humedad son estadísticamente significativos para la formación de colonias con la técnica de microgota, sin embargo, hay una considerable mejora en la actividad CMCasa cuando el %H es 75%.

Se prepararon los cultivos para realizar una cinética de crecimiento y producción de CMCasas, sin embargo, esta no obtuvo ningún crecimiento ni producción de enzima. Para esta corrida se utilizaron tapones de gaza y algodón más apretados, lo cual limitaba de oxígeno al microorganismo e inhibía su crecimiento.

El diseño del biorreactor empezó desde el inicio del PAP e iba modificándose según observábamos los datos que se nos iban presentando. De manera semanal se discutían las características de este y se acortaban las propuestas hasta establecer un modelo final: Un biorreactor de lecho permeable con recirculación de medio líquido. Se realizó un modelo 3D en SolidWorks para construirlo en acero inoxidable y se cotizó en la empresa Aquainox. Debido a retrasos en la entrega de este se construyó un prototipo momentáneo utilizando material de laboratorio (tubos falcon de 50mL, entre otros) y mangueras de acuario. Se realizaron pruebas de agua y se corrigieron las fugas. El sistema funcionaba como lo planeado, sin embargo, en el momento de la última esterilización para inocular se venció el material de plástico que conectaba las mangueras de aeración en la columna, lo cual provocó una serie de fugas. Se retiró, limpió y guardó el reactor antes de poder analizar crecimiento celular del inóculo. Posteriormente se construyó un reactor de vidrio con las condiciones y características propuestas.

Utilizando las condiciones favorecedoras para el crecimiento de *C. flavigena* PR-22 en RM200 como sustrato sólido, se hicieron pruebas de producción de enzimas

holocelulolíticas en biorreactores de tanque agitado y en el biorreactor de lecho percolador diseñado previamente. Se utilizó un prototipo de vidrio para establecer los parámetros adecuados previo a la inoculación del BLPR a base de acero inoxidable. Se mejoraron distintos parámetros del BLPR (incluidos accionadores de temperatura, registradores de datos, métodos de medición de crecimiento, entre otros) y se caracterizó el cultivo de *C. flavigena* en el sistema propuesto.

El primer paso fue evaluar las condiciones físicas del biorreactor realizando pruebas de agua, tanto en el prototipo de vidrio como en acero inoxidable. Se registraron los cambios de temperatura en la columna de del lecho de crecimiento. La dificultad para mantener la temperatura óptima de crecimiento (32°C) y la pérdida de agua registrada dieron pie a la implementación de precalentamiento y humidificación del aire de entrada en el lecho. Se determino el crecimiento bacteriano como el aumento de proteína total en el reservorio líquido y se establecieron parámetros cinéticos.

A continuación, se implementó el uso de una trampa de KOH en los gases exhaustos de un cultivo en BTA para probar la relación entre la producción de CO<sub>2</sub> y el crecimiento bacteriano. Al ser estadísticamente valida la relación entre ambos elementos, se optó por implementar esta medición a tiempo real en el BLPR. Se realizaron dos cultivos distintos en BLPR, uno en el prototipo de vidrio y otro en acero inoxidable. Ambos cultivos duraron aproximadamente 120 horas, durante las cuales se tomaron muestras y se determinó el crecimiento mediante a proteína total y la actividad holocelulolítica.

Se realizaron una serie de modificaciones y correcciones mecánicas del biorreactor: Corrección de fugas, fabricación de un nuevo empaque para el reservorio, soldado de entradas tipo tornillo para los termopares y la resistencia junto con tornillos barrenados con o-ring para garantizar el sellado. Habiendo caracterizado exitosamente el BLPR y el comportamiento metabólico de *C. flavigena* se cambió de sustrato a bagazo de agave

igualmente pretratado por explosión de vapor y se realizaron nuevas corridas experimentales siguiendo el mismo procedimiento.

## 2.4.2. Plan de Trabajo

### 2.4.2.1 Actividades

#### 2.4.2.1.1 Técnicas

- Consulta bibliográfica
- Establecimiento de problemática y objetivos.
- Desarrollo de idea e hipótesis
- Calendarización de actividades
- Diseño de biorreactor, dimensionamiento, instrumentación y caracterización.
- Análisis de resultados

#### 2.4.2.1.2 Operacionales

- Mantenimiento y conservación de la *Cellulomonas flavigena* PR-22.
- Caracterización cepa: Tinción de Gram, agua para cultivo y eliminación de  $\text{CaCl}_2$
- Caracterización de sustrato: %H, pH, cantidad de lignina y actividad enzimática.
- Caracterización de *C. flavigena* en sustrato sólido y determinación de efecto de pH y %H.
- Cinética de crecimiento en sustrato sólido, descartada por falta de oxigenación.
- Construcción de prototipo de biorreactor en plástico.
- Construcción de prototipo de biorreactor en vidrio.
- Caracterización física de BLPR
- Caracterización metabólica de BTA.
- Caracterización metabólica en BLPR prototipo de vidrio.
- Implementación de sensores de  $\text{CO}_2$  y de control de temperatura en reservorio
- Caracterización metabólica de BLPR
- Análisis de pruebas y resultados.

### 2.4.2.2 Recursos necesarios

#### 2.4.2.2.1 Materiales

- |                             |                       |
|-----------------------------|-----------------------|
| ▪ Tubos facón (50ml y 15ml) | ▪ Manguera de acuario |
| ▪ Tubo eppendorf.           | ▪ Cinta Aislante      |
| ▪ Puntas de micropipeta     | ▪ Parafilm            |
| ▪ Pipetas estériles         | ▪ Cajas de Petri      |
| ▪ Mangueras Masterflex      |                       |

#### 2.4.2.2.2 Reactivos

- |            |                           |
|------------|---------------------------|
| ▪ DNS      | ▪ HCl                     |
| ▪ Bradford | ▪ $\text{H}_2\text{SO}_4$ |

- Agua destilada
- Buffer Ftalato
- Tween80

#### 2.4.2.2.3 Equipos

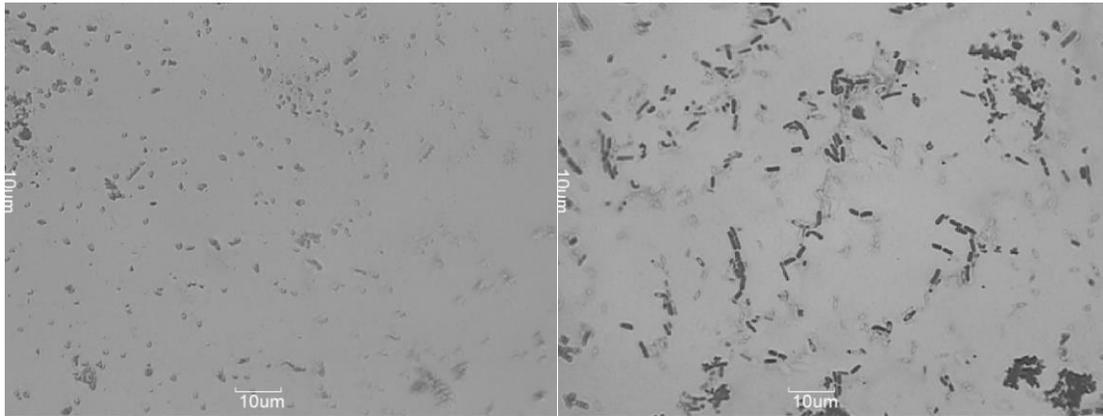
- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Mecheros
- Microscopio
- Bomba peristáltica
- Compresores de aire
- Incubadoras estáticas
- Incubadoras agitadas
- Espectrofotómetros
- Micropipeta (100-1000 $\mu$ L)
- Resistencia tubular sumergible
- Termostato
- Termopares tipo NK y J

### 3 Resultados del trabajo profesional

#### 3.1 Caracterización de *Cellulomonas flavigena* PR-22 (En conjunto con Diego López Salas)

##### 3.1.1 Tinción de Gram

El primer paso en la caracterización de cualquier microorganismo es el análisis de su morfología. *Cellulomonas* presenta una estructura de bacilo y se tiñe Gram positivo, por lo que se realizó una tinción y se observó al microscopio.



**Figura 18.** Imagen en microscopio de *C. flavigena* con lente 100x

En la *figura 18* no se puede apreciar correctamente, pero los resultados concuerdan con las características descritas por Birte, se aprecia una morfología alargada y mayoritariamente conglomeraciones. (Birte, y otros, 2010)

##### 3.1.2 Selección de agua para cultivo

En vista de las problemáticas obtenidas para crecer correctamente la cepa, se hizo un diseño de experimentos para evaluar que agua tenía el mayor efecto sobre el crecimiento de la bacteria. Se realizó por triplicado y se creció a distinta composición volumétrica.

**Cuadro 7.** D.O. de crecimiento de *C. flavigena* con distintos volúmenes de muestras de aguas.

Agua de la llave (ml)	Agua destilada (ml)	D.O. 600nm
0	16	0.80±0.00
4	12	0.55±0.26
8	8.0	0.72±0.40
12	4.0	0.79±0.13
16	0.0	0.62±0.19

Se realizó un ANOVA de una vía en el software Minitab, el cual demostró ( $\alpha=0.05$ , valor P: 0.608 y valor F: 0.7) que no hay diferencia significativa en el uso o combinación de ambas aguas. Por lo tanto, se puede utilizar agua de la llave para crecer el cultivo. Esto es importante debido a que abarata los costos si plantea escalar el proceso a nivel industrial, donde el gasto económico de usar agua destilada es importante.

### 3.1.2 Evaluación en la dureza del agua

Se decidió evaluar el efecto de la dureza del agua sobre el crecimiento de *Cellulomonas* debido a que en estudios previos el agua que se utilizó para trabajar esta cepa tiene una dureza de 1800 $\mu$ S mientras que el ITESO se reduce por más de la mitad con 570 $\mu$ S. Se encontró que la dureza del agua es dependiente de las sales de calcio, las cuales agregan un grado de turbidez al agua, lo cual se puede reflejar en falsos positivos en el momento de leer DO por métodos de espectrofotometría. Se probó el crecimiento de *Cellulomonas* variando la cantidad de CaCl<sub>2</sub> añadida al MMM, como se puede observar en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Resultados de crecimiento microbiano evaluado a distintas concentraciones de CaCl<sub>2</sub>

# Muestra	[CaCl <sub>2</sub> ] (g/L)	Promedio DO 600nm
0	0.1	0.14
1	0.05	0.32
2	0.2	0.15
3	1	0.05
4	0	0.19

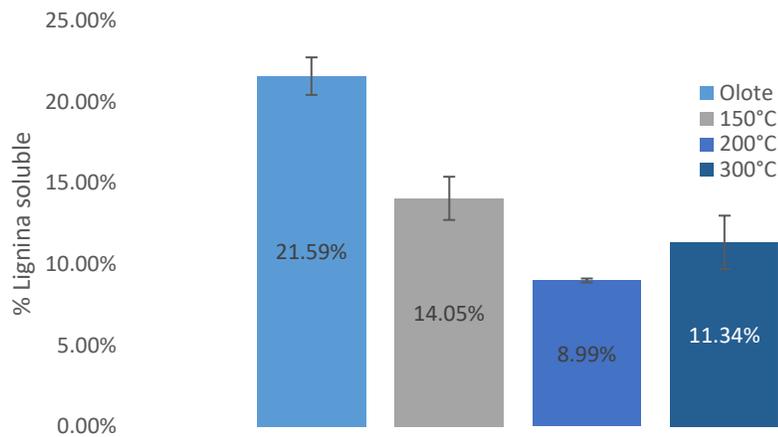
Un nuevo ANOVA ( $\alpha=0.05$ , valor P: 0.189 y valor F: 1.89) comprobó que no hay diferencia significativa en la concentración de esta sal, por lo cual se puede prescindir de ella en el medio mínimo minera utilizando el agua de la llave del ITESO. Esto nuevamente abarata costos de producción, ya que se evita agregar otro aditivo, además de que ya no existen interferencias de lectura en espectrofotometría.

### 3.2 Caracterización de sustrato

#### 3.2.1 Determinación de %H y lignina en el sustrato.

El porcentaje de humedad se obtuvo colocando una muestra de 1g en una termobalanza que, por medio de gravimetría, reporta la diferencia de peso entre la muestra original y una ya seca. RM200 tiene 74% de humedad.

El pretratamiento por explosión de vapor degrada en gran medida la lignina presente en la biomasa, sin embargo, se ha reportado que el grado de hidrólisis de carbohidratos es mayor que el de la lignina, por lo que en el porcentaje másico final llega a conservar (e inclusive incrementar). Debido a esto, se decidió cuantificar la composición de lignina soluble en las tres muestras de rastrojo y una de olote seco y molido. Se utilizó un protocolo a base de hidrólisis ácida de los carbohidratos y de la solubilización de la lignina.



**Figura 19.** Porcentaje de lignina en RM150, RM200, RM300 y olote.

El rastrojo de maíz pretratado con explosión de vapor a 200°C fue el que obtuvo una menor cantidad de lignina, por lo que se asume es el que menos inhibirá la reacción.

### 3.3 Determinación de pH y porcentaje de humedad favorecedor para el cultivo de *Cellulomonas*

Con el fin de establecer los valores indicados para cultivar *Cellulomonas* en biorreactor de sustrato sólido, se realizó un experimento factorial variando el pH y el porcentaje de agua en pequeños biorreactores (tubos falcon) de sustrato sólido. Cada día se pesaban los tubos falcon con el fin de reponer el peso perdido por evaporación con agua estéril. Se realizó una curva de calibración de DNS para poder cuantificar los azúcares reductores y, por ende, la actividad enzimática.

**Cuadro 9.** Actividad CMCase y crecimiento a distinto %de humedad y pH.

Muestra #	pH	Humedad %	Colonias #	DO 600nm	[Glucosa] g L	U ( $\mu\text{molGlucosa min}^{-1}$ )	U g <sup>-1</sup>
1	6	75	3.0 ± 1.4	0.323	0.407	226.0	45.2
2	6	80	2.0 ± 0.0	0.110	0.139	77.00	15.4
3	6	90	0.0 ± 0.0	0.195	0.246	136.5	27.3
4	7	75	3.0 ± 1.4	0.295	0.372	206.5	41.3
5	7	80	1.0 ± 1.4	0.100	0.126	70.00	14.0
6	7	90	0.0 ± 0.0	0.24	0.303	168.0	33.6
7	8	75	3.0 ± 0.0	0.345	0.435	241.4	48.3
8	8	80	1.5 ± 0.7	0.355	0.448	248.4	49.7
9	8	90	0.0 ± 0.0	0.205	0.258	143.5	28.7

Se hizo el análisis de un diseño de experimentos factorial y se demostró, que tanto el pH como el %H carecen de un efecto significativo en la producción de CMCase. En contraste, el porcentaje de humedad impacta claramente, siendo a 75%H el que mayor crecimiento de microcolonias.

### 3.4 Diseño de biorreactor estilo lecho percolador con aeración en contraflujo y recirculación de medio líquido (BLPR)

Desde que se estableció el objetivo de diseñar y construir un biorreactor en sustrato sólido para *Cellulomonas* se establecieron algunos detalles importantes que sirvieron de punto de partida para la idea final:

- *Cellulomonas* es una bacteria estrictamente aerobia, por lo que tiene que haber contacto constante y permanente de aire.
- *Cellulomonas* no tiene mecanismos de adhesión a sustratos sólidos, por lo que en presencia de agua se trasladaría en la misma.
- Las enzimas degradadoras de carbohidratos complejos son extracelulares y solubles, por lo que se solubilizarán y moverán en presencia de algún líquido.
- La bacteria no crece eficientemente en ambientes secos, por lo que, sumado a la constante adición de aire, se tendrá que estar humidificando el medio.
- Siempre existe un gradiente de temperaturas y concentración de nutrientes en biorreactores de sustrato sólido, por lo que se necesitará idear un sistema de homogeneización.
- Reducir gasto energético y uso de agua es primordial.

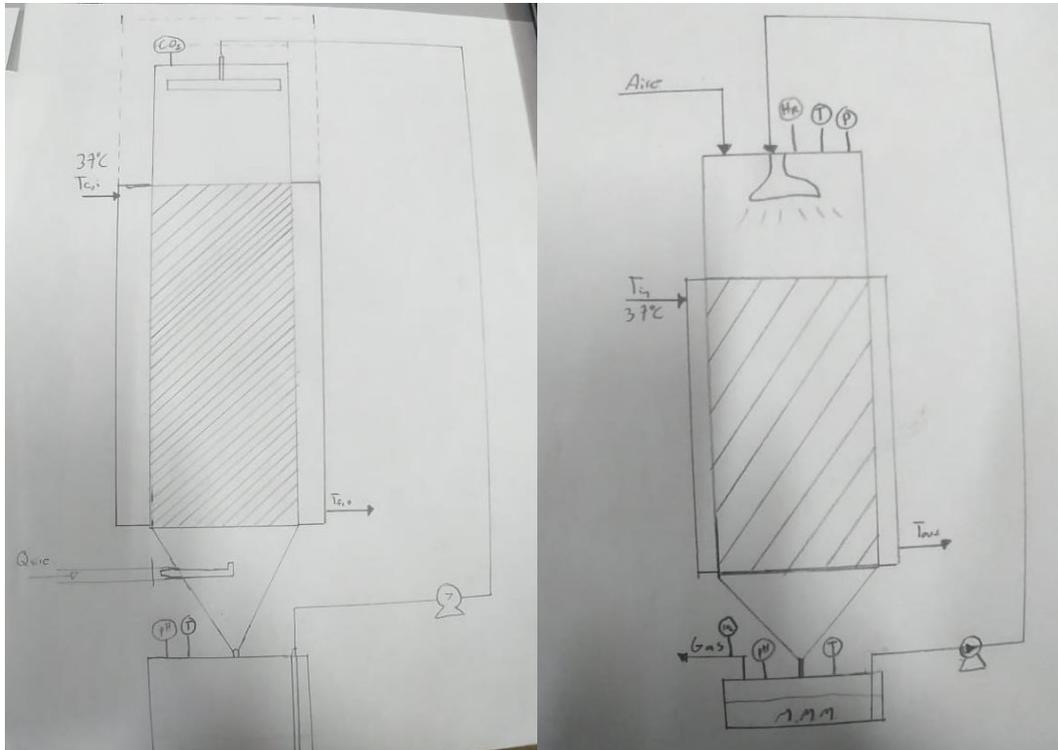
#### 3.4.1 Primeras propuestas

Se idearon distintos modelos de biorreactor antes de llegar al diseño final. Se planteó la idea de utilizar un tambor rotatorio parcialmente sumergible. Este modelo fue descartado ya que involucraba utilizar rotores de torque elevado para mover el reactor, lo cual representa un gasto importante de energía y existen patentes de modelos muy similares. La siguiente opción fue usar un lecho empacado con una entrada de aire inferior y aspersion de agua, con un enchaquetado para mantener la temperatura ideal. Este modelo se abandonó por las dificultades de escalamiento que conlleva: El enchaquetado permite mantener la homogeneidad térmica en el reactor a nivel laboratorio, sin embargo, el escalamiento de este diseño se complica, ya que al incrementar el diámetro de la columna se crea un gradiente de temperatura del exterior al punto central de la misma.

#### 3.4.2 Columna de lecho percolador.

Se escogió finalmente un modelo de lecho percolador en columna. Es similar al modelo de lecho empacado, sin embargo, el control de temperatura y homogeneidad de los nutrientes

se lleva a cabo mediante la constante dispersión de medio de cultivo desde la parte superior de la columna. El sustrato no está comprimido, por lo que existen canales para que el medio pueda descender y llegar a la mayor parte del reactor. No obstante, se consideró el hecho de que tanto *Cellulomonas* como las enzimas hidrolíticas deseadas no se iban a fijar en el sustrato como matriz sólida, sino seguir el camino del medio líquido hasta salir por debajo de la columna.

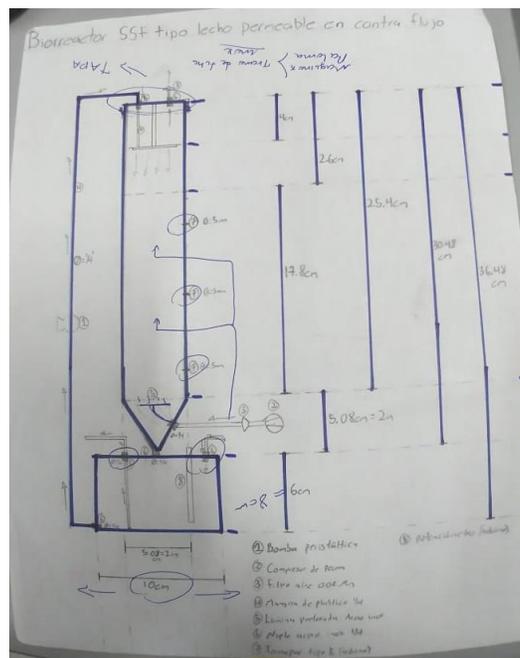


**Figura 20.** Bocetos iniciales del biorreactor de lecho percolador, aeración a contraflujo y recirculación de medio. Esta versión inicial aun proponía un enchaquetado para control de temperatura.

Se diseñó un reservorio de medio mínimo mineral conectado al fondo de a columna, de manera que el efluente rico en biomasa y enzimas se recupere en su totalidad. Este mismo medio es el que alimentara, mediante a una bomba peristáltica, el suministro de líquido en la parte superior de la columna. De esta manera, se conserva un volumen fijo de medio líquido que recirculará constantemente a través del sistema, recuperando biomasa y enzima extracelular. El producto final será un medio líquido altamente concentrado de

biomasa y proteína, así como un sustrato degradado por la misma actividad enzimática del sistema.

Una de las problemáticas más importantes de los cultivos en sustrato sólido es la remoción de energía térmica, producto del mismo metabolismo de los microorganismos. Se propuso agregar tres entradas de aire a temperatura ambiente lo largo de la columna con el fin de remover un poco de calor y de suministrar oxígeno *Cellulomonas*.



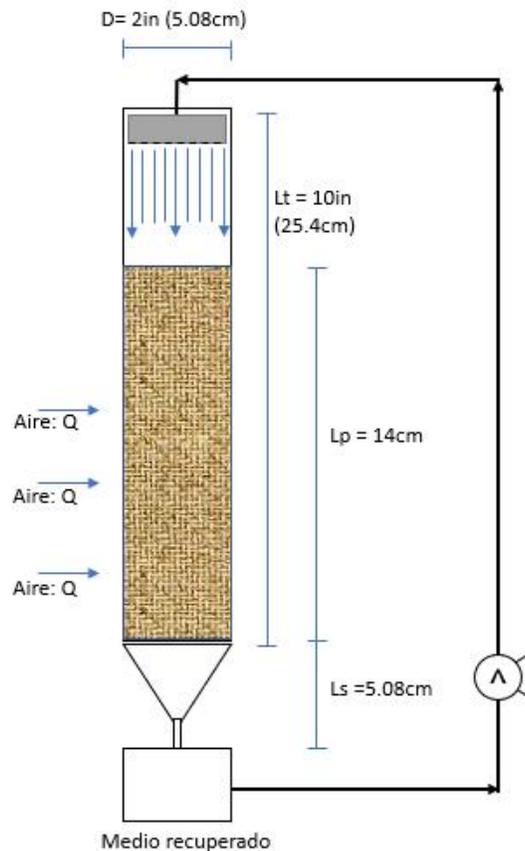
**Figura 21.** Boceto mejorado de biorreactor de lecho permeable con recirculación, ya con el dimensionamiento final y la adición de tres entradas de aire a lo largo de la columna

### 3.4.3 Diseño final BLPR

A continuación, se presentarán todas las características del biorreactor, así como sus distintas piezas. Está diseñado para ser construido con acero inoxidable 304 en su totalidad. Los flujos de efluente, recirculación y entrada de aire serán llevados a cabo en manguera esterilizable MasterFlex. Toda entrada y salida de aire tendrá un filtro Millipore para evitar contaminación.

#### 3.4.3.1 Dimensionamiento

El BLPR fue considerado para trabajar eficientemente en escala laboratorio y poder caracterizar sus rendimientos, balances de energía y de materia. Sin embargo, las dimensiones geométricas fueron estratégicamente seleccionadas para su posible escalamiento a nivel piloto o pre-piloto.



**Figura 22.** Boceto final digitalizado con las dimensiones reales del reactor.

El volumen de operación se estableció por default al 70% de la capacidad volumétrica del cilindro. Esto con el fin de controlar mejor las condiciones operativas del sistema y tener espacio para los sensores y entradas de la parte superior.

**Cuadro 10.** Dimensiones y relaciones geométricas del biorreactor

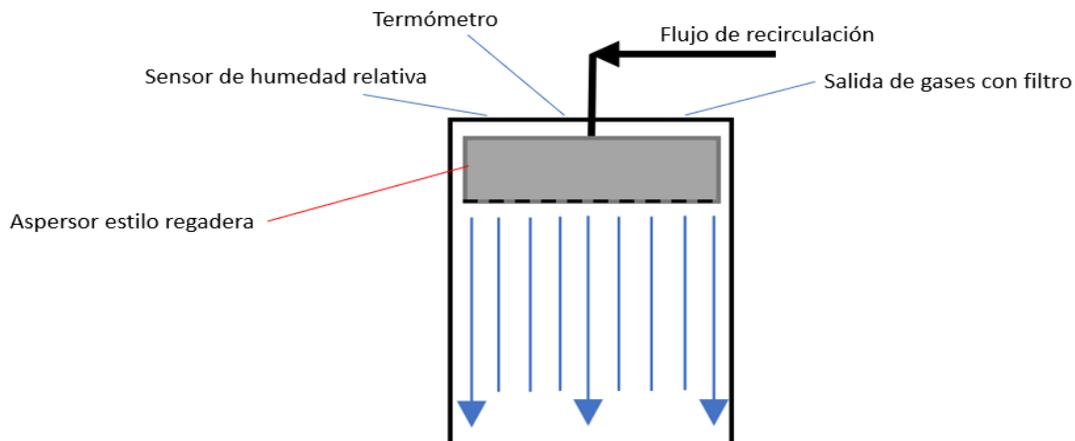
Longitud total del cilindro	Lt	25.5 cm
Longitud de operación	Lp (0.7 Lt)	17.8 cm
Longitud del cilindro	Ls (0.2 Lt)	5.1 cm
Diámetro interior de cilindro	D (0.2 Lt)	5.1 cm
Volumen total	Vt	514 cm <sup>3</sup>
Volumen de operación	Vp	360.7 cm <sup>3</sup>

El rastrojo de maíz seco tiene una densidad muy baja y no se va a compactar en un inicio (se harán pruebas a futuro para eficientizar este detalle) por lo que se espera que la cantidad másica para ocupar el espacio operacional sea mínima. En el prototipo de plástico (3.3.3.7) construido con las mismas relaciones geométricas, se agregaron 9.23 g de RM200 seco para las pruebas de agua.

El reactor consta de dos etapas principales: etapa de producción enzimática y etapa de crecimiento. Previo a la inoculación y en esterilidad se hará un lavado de 12 horas del sustrato sólido con recirculación del medio mínimo mineral, lo cual liberará los azúcares reductores del sustrato y los concentrará en el fondo. Se inoculará el reactor desde el reservorio, por lo que *Cellulomonas* utilizará los oligosacáridos y monosacáridos disueltos para crecer en el mismo. Durante la estancia de la biomasa en la columna, la falta de azúcares asimilables y presencia de celulosa y hemicelulosa provocarán un estrés metabólico en la bacteria, la cual producirá enzimas celulolíticas y xilanasas. Estas enzimas se diluirán en el medio líquido y concentrarán en el reservorio. La constante actividad hidrolítica de las mismas degradará parcialmente los carbohidratos complejos, produciendo azúcares sencillos que mantendrán activa la etapa de crecimiento en el reservorio.

### 3.4.3.2 Aspersión y control superior

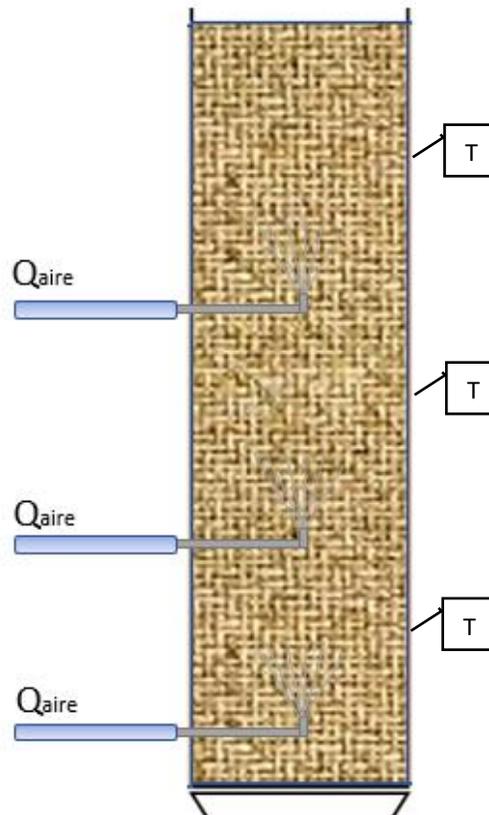
La parte superior de la columna tiene una tapa hermética con distintas entradas y sensores. La tapa es enroscable a la columna, esto con el fin de utilizar el espacio para empacar con sustrato y hacer limpieza. Esta pieza es fundamental para el funcionamiento y control del BLPR; la entrada de medio líquido proveniente del reservorio ocurre a través de esta y se distribuye a lo largo de toda el área interna de la columna mediante a goteo estilo regadera, con el fin de homogeneizar desde el principio la distribución de nutrientes y temperatura. Incluye también 3 sensores esenciales para la recuperación de datos y el control. Un termómetro para monitorear la temperatura ambiente dentro del espacio gaseoso de la columna, un sensor de humedad relativa para poder estimar a tiempo real el porcentaje de agua del sustrato sólido (se harán pruebas de correlaciones entre la humedad en el aire y en la matriz sólida). Tendrá también un exhausto de gases para liberar presión acoplado con un sensor de CO<sub>2</sub> para poder hacer balances de materia y estimar el crecimiento celular a tiempo real.



**Figura 23.** Boceto de la parte superior del BLPR

### 3.4.3.3 Flujo de aire a lo largo de la columna y sensores de temperatura

*Cellulomonas* es estrictamente aerobia, por lo que es necesario mantener altas concentraciones de oxígeno en el sistema en todo momento. Originalmente, se propuso una sola entrada de aire estéril en la parte inferior de la columna, sin embargo, se añadieron los otros puntos para evitar que se formen canales de aire y que sea más homogénea la disponibilidad de aire a través del sustrato.



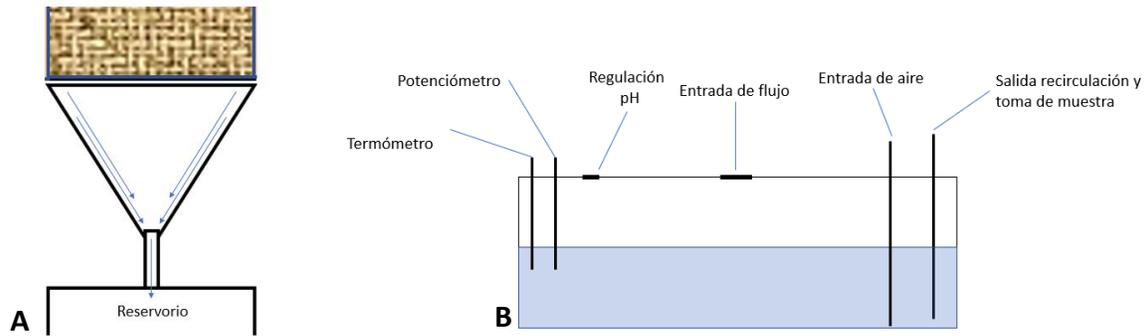
**Figura 24.** Entradas de aire en la columna y posición de termopares.

La entrada de aire se extiende hasta el punto central del área interna del cilindro, esto con el fin de que no se formen canaletas de aire a través del borde de la columna. El aire entra a 20-22°C según la temperatura ambiente del laboratorio en la que se trabaja, por lo que se espera que remueva energía metabólica a ayude a controlar la temperatura de operación.

### 3.4.3.4 Efluente inferior, reservorio y control.

En área inferior de la columna habrá una barrera permeable de acero inoxidable, la cual dejará pasar el medio líquido manteniendo el sustrato sólido empacado. Enroscado a la

columna habrá una pieza cónica que concentrará todo el medio líquido saliente en el punto inferior. Por fuerza de gravedad, el flujo de salida será transportado al reservorio mediante a mangueras conectadas entre ambas piezas.

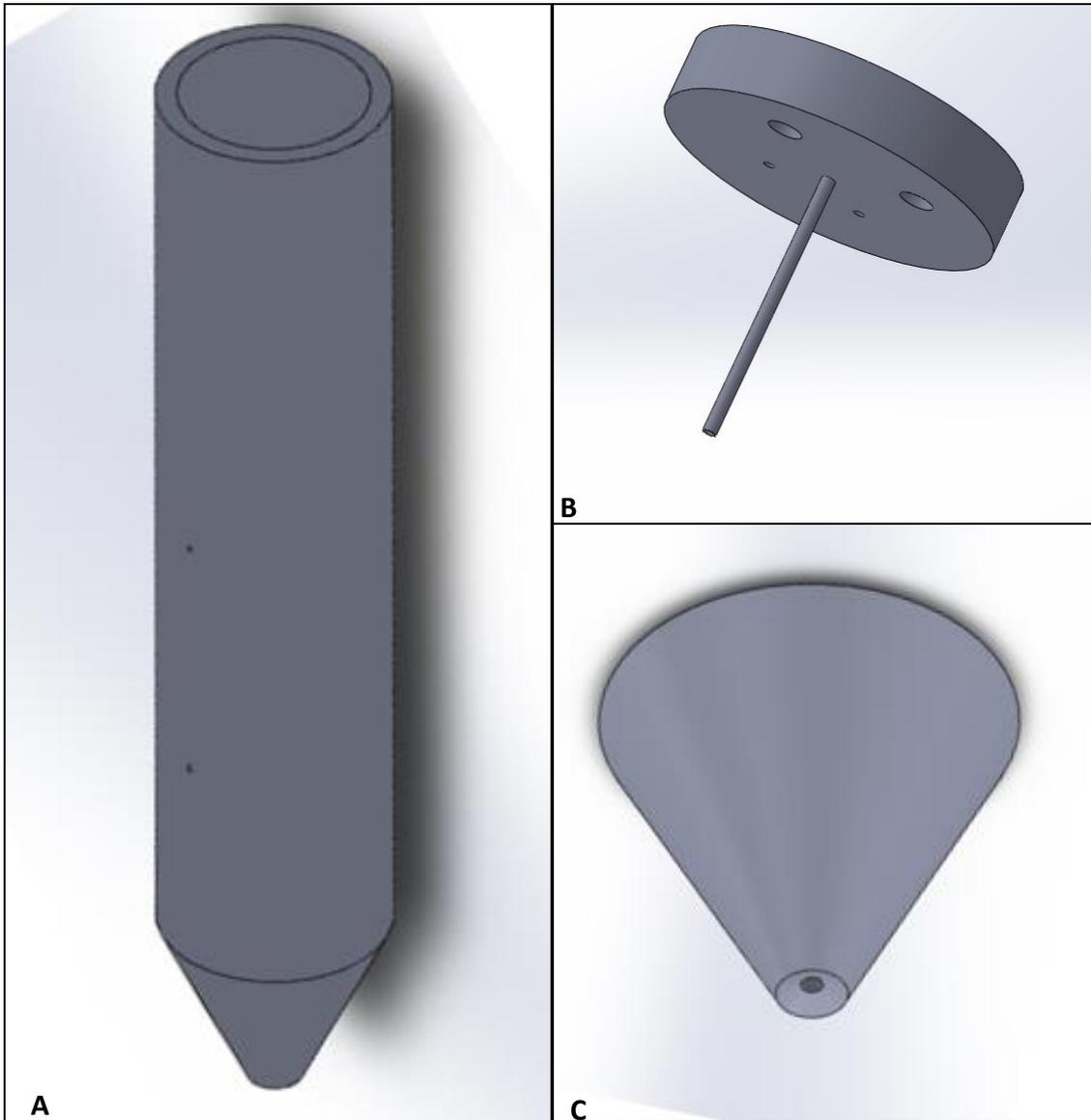


**Figura 25.** Bocetos de A) la estructura cónica y flujo del efluente de la columna y B) del reservorio donde ocurrirá el control del sistema y la etapa de crecimiento.

El reservorio tiene entradas para control de pH (NaOH, por la naturaleza ácida del sustrato), influjo de recirculación y aire. Tendrá únicamente 3 puertos de salida: de recirculación, toma de muestra y exhausto de gases. En cuanto a equipo, tendrá un potenciómetro, un termómetro y un sensor de CO<sub>2</sub> acoplado al exhausto de gases. La temperatura del sistema será controlada desde el reservorio. En principio, la temperatura únicamente se calentará mediante a una resistencia sumergible o bien colocando toda la estructura del reservorio en un baño maría controlado. El control de pH se hará mediante a adición de NaOH suministrado por una bomba peristáltica acoplada a un Arduino con un programa de control PID desarrollado en Simulink.

### 3.3.3.6 Diseño 3D en SolidWorks

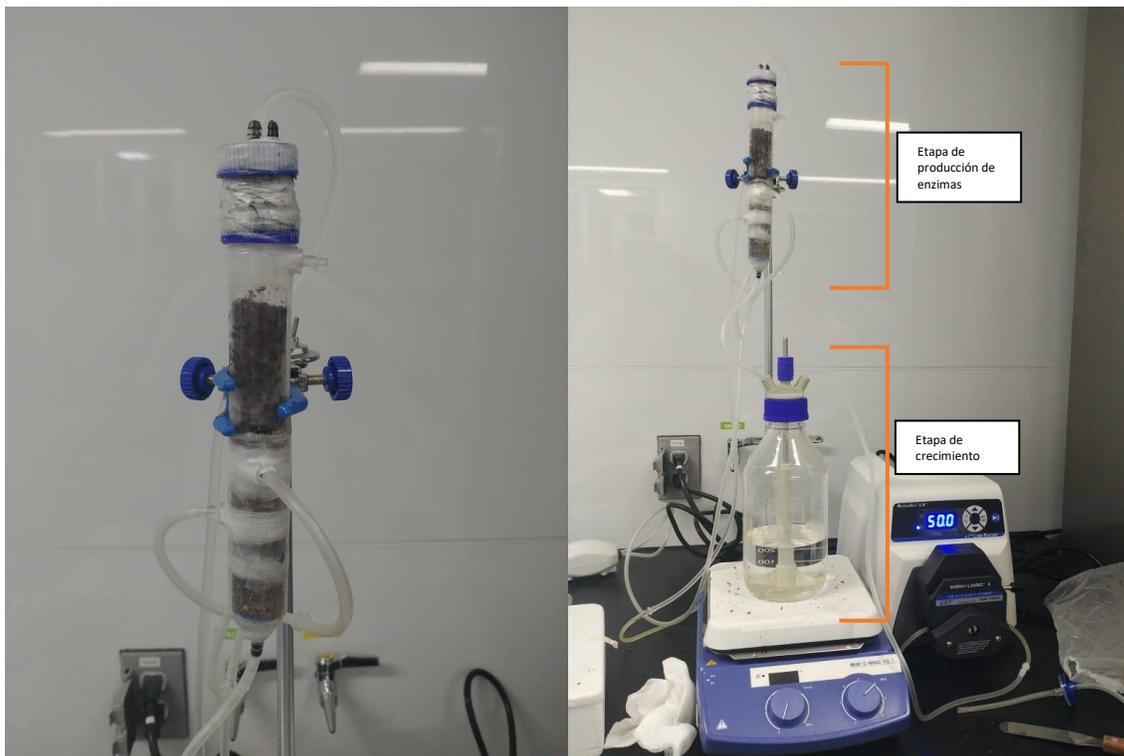
Para construir el reactor en acero inoxidable y tener una mejor idea del producto final, se hizo una representación con las dimensiones y relaciones geométricas finales. En la *figura 26* se presentan las tres piezas más importantes del BLPR, sin embargo, el resto de las imágenes está disponible en el anexo 3.



**Figura 26.** Boceto final digitalizado en SolidWorks de A) El cilindro destapado con las entradas de aire, B) la tapa enroscable de la columna y C) El cono enroscable para salida del efluente.

### 3.4.3.7 Prototipo inicial

Debido al prolongado tiempo de construcción que conlleva el acero inoxidable con las dimensiones y detalles especificados, se realizó un prototipo de plástico esterilizable utilizando material de laboratorio. Todas las piezas principales (tapa, columna y fondo cónico) fueron construidas a partir de tubos falcon de 50mL cortados y unidos entre sí. Se procuró que los tubos tuvieran la relación geométrica del diseño, por lo que únicamente se ajustó la altura. Se utilizaron válvulas de acople y válvulas T para agregar las entradas de aire, recirculación y la salida de medio. Por indisponibilidad, se utilizaron mangueras de silicón de acuario para mover todos los fluidos en lugar de MasterFlex esterilizables. Se interconectaron dos compresores de pecera para agregar el aire a un flujo constante. Para el reservorio se utilizó un frasco Schott de 2L con una tapa de 4 entradas, a las cuales se le agregaron: entrada y salida de medio recirculado, entrada de aire y exhausto de gases. Se agregaron 500ml de medio líquido.



**Figura 27.** Prototipo de BLPS de plástico en pruebas de agua con rastrojo de maíz; se muestran A) las entradas de aire en la columna y B) el sistema completo con calefacción en plancha térmica y recirculación de medio utilizando bomba peristáltica a 50ml/min. Se destaca la etapa de producción de enzimas en columna y la etapa de crecimiento.

Previo a este estudio, no se consideraba tener exhausto de gases en el reservorio, sin embargo, al ver como se formaba un gradiente de presión que inhabilitaba el flujo el efluente de la columna se decidió agregarlo. Se colocaron 9.2g de RM200, lo cual fue suficiente para ocupar todo el volumen operacional sin empacar el sustrato. El frasco utilizado para reservorio incluía propelas con movimiento magnético, por lo que se aprovecharon para eficientizar el transporte térmico en el medio líquido.



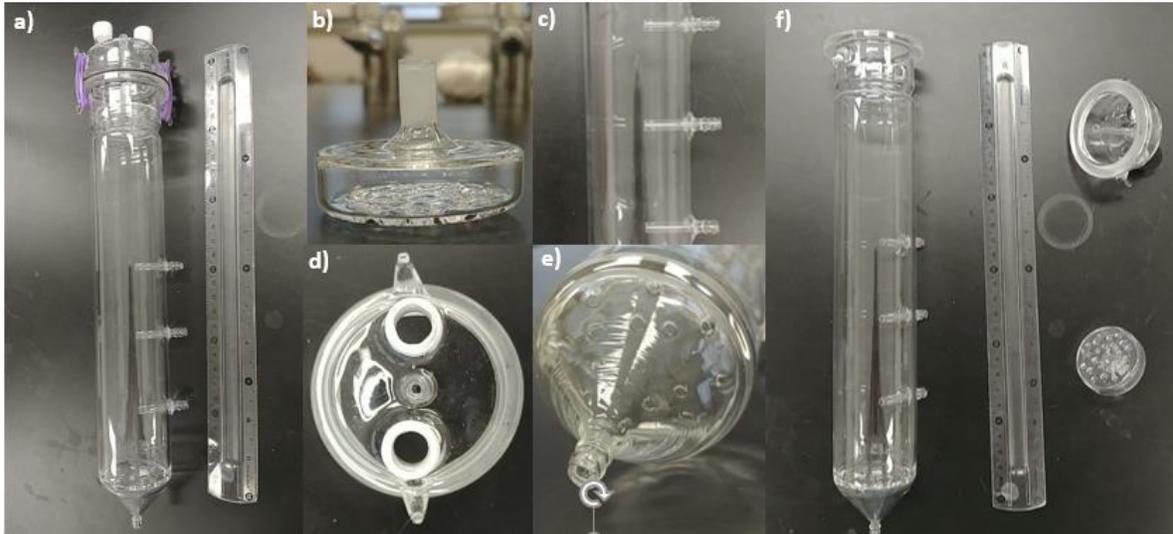
**Figura 28.** Medio líquido en reservorio tras 12 horas de lavado.

Se dejó que trabajar el sistema durante 12 horas, tras lo cual el sustrato quedó completamente lavado, es decir, los componentes solubles del mismo se concentraron en el reservorio. Se realizó una cuantificación de azúcares reductores del medio líquido lavado y se encontraron 0.6g/L de glucosa. Esto beneficia la etapa de crecimiento de *Cellulomonas flavigena* PR-22 en el modelo propuesto.

Tras realizar pruebas de agua y corregir fugas existentes, se comprobó que los materiales a utilizar (tubos, mangueras, válvulas, etc.) aguantaran 121°C y 15 psi para esterilizar. Los materiales se metieron por separado en autoclave y (a pesar de ligeras malformaciones en las válvulas T de pecera) todo seguía íntegro y funcional. No obstante, cuando se montó el sistema y se esterilizó entero en autoclave, se obstruyeron parcialmente las válvulas y eso originó una serie de fugas pasadas unas cuantas horas tras inocular el sistema (el pre-inoculo se preparó un día anterior con MMM y CMC como fuente de carbono). Debido a las fugas, se tuvo que detener el cultivo; por cuestiones de tiempo no se ha podido inocular el prototipo.

### 3.4.3.8 Biorreactor BLPR de vidrio

Con el fin de evaluar con mayor rapidez el biorreactor propuesto, se mandó a hacer un prototipo de vidrio con exactamente las mismas dimensiones y características al de acero inoxidable.



**Figura 29.** Prototipo de BLPS de vidrio y sus partes: a) reactor completo armado y con referencia de dimensión, b) pieza de distribución estilo regadera, c) las 3 entradas de aire a la columna, d) tapa, e) fondo cónico con coladera y f) referencia de dimensión junto a cada una de las partes.

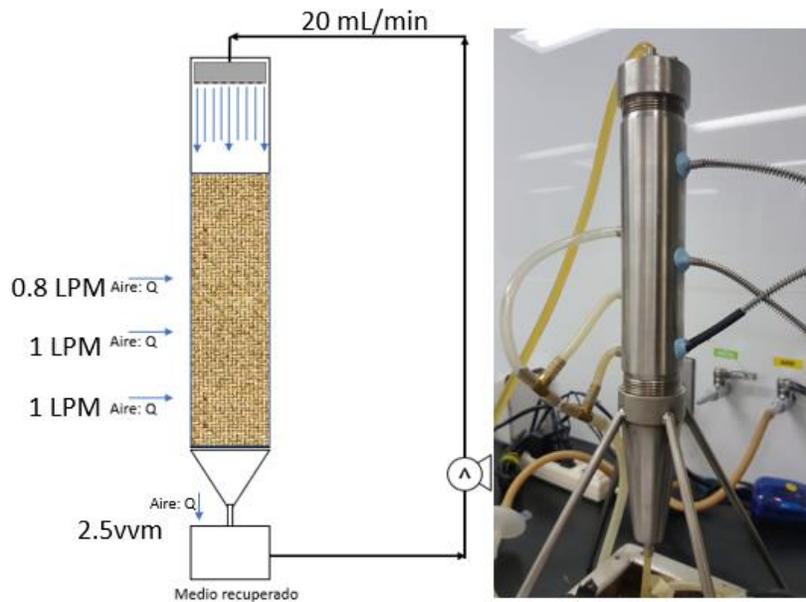
### 3.1 Caracterización física de BLPR

Previo al cultivo de *Cellulomonas flavigena* PR-22 fue necesario realizar distintas pruebas de agua para definir los parámetros específicos de operación con los que se probará el sistema de biorreactor propuesto. Estas pruebas fueron realizadas sin inóculo a ambiente expuesto, tanto para el BLPR de borosilicato (RBK) como de acero inoxidable 304 (MBQ).

#### 3.1.1 Caracterización de flujos

Se determinó el flujo de aeración a utilizar en los distintos puntos de la columna de percolación. Se optó por tomar una única fuente de aire filtrado con membrana Millipore y distribuir el flujo mediante a mangueras y válvulas tipo “T” a través de los 3 puntos de aeración de la columna, a los cuales se enumeró a partir de la entrada inferior hasta la superior. Se determinó 1 L/min como flujo en la entrada, la cual se mantenía constante en la segunda entrada, pero, debido a una caída de presión provocada por la extensión de las

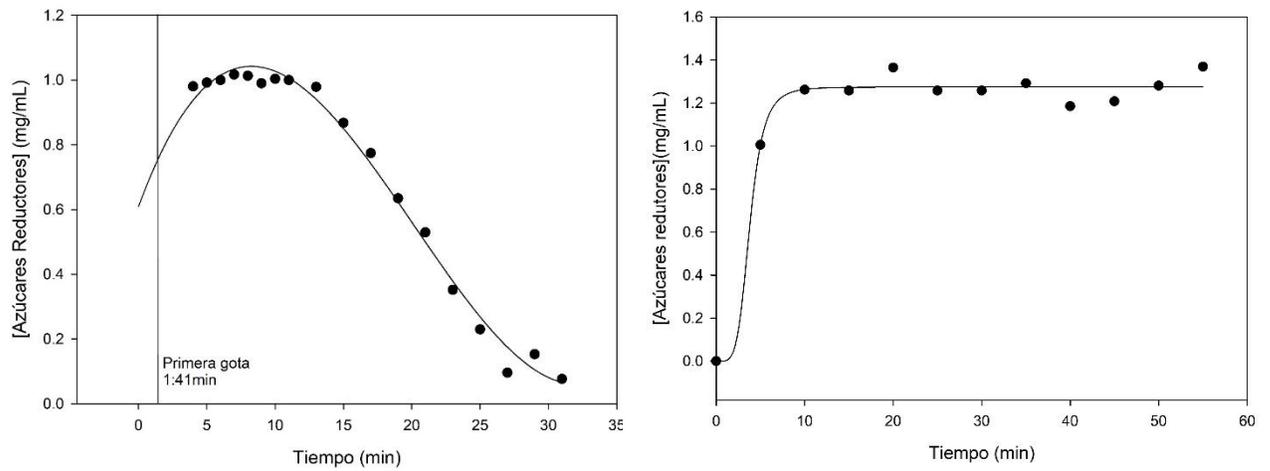
mangueras y por las válvulas, la tercera entrada tenía una disminución del 20% del flujo. Para pruebas iniciales, el flujo de recirculación se mantuvo constante a  $20 \text{ mL min}^{-1}$ . En el reservorio se implementó un flujo de aire de  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$  utilizando un compresor de pecera y filtros Millipore.



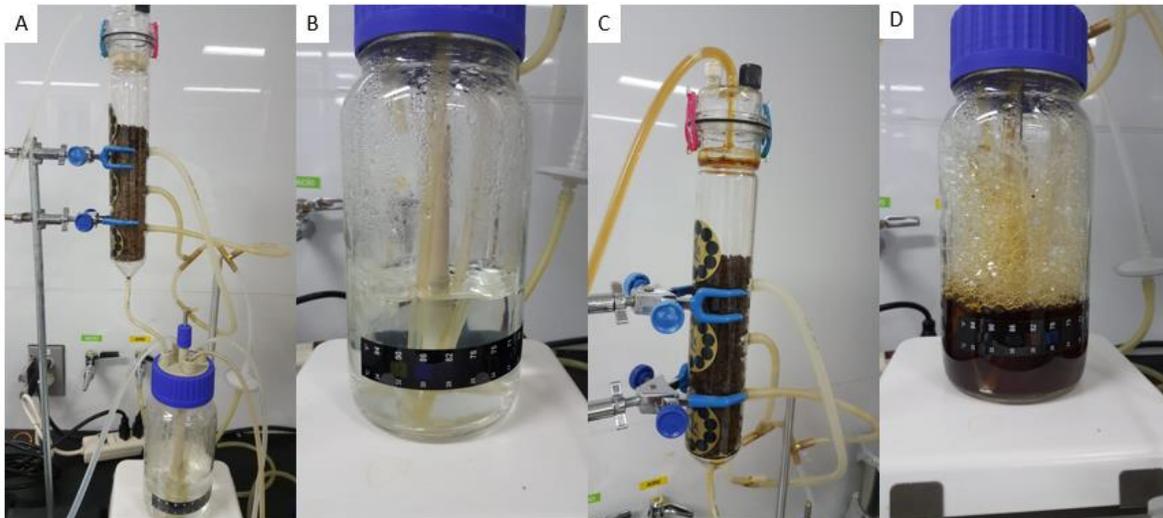
**Figura 30.** Diagrama de flujos dentro del sistema BLPR MBQ

### 3.1.2 Remoción de azúcares reductores del medio

El RM200 utilizado está pretratado por explosión de vapor a  $200^\circ\text{C}$ , lo cual provoca una desfibrilación de la lignocelulosa y degradación parcial de algunos compuestos. Debido a esto, el sustrato tiene un pH de 3-4 y tiene una gran cantidad de azúcares reductores solubles. Teóricamente, *C. flavigena* produciría enzimas que degradarían la holocelulosa en sacáridos solubles fermentables (muchos de ellos mono o disacáridos con extremo extremo reductores, como lo son la glucosa y xilosa), por lo tanto, es importante identificar que azúcares están presentes en el sustrato y cuáles provienen de reacciones hidrolíticas. Se hicieron dos lavados de sustrato en BLPR RBK, uno con recirculación de medio para establecer el tiempo de estabilización y concentración de estos en el sistema real, y otro con lavado de agua nueva.



**Figura 31.** A) Remoción de azúcares reductores en 50 g de RM200 con 1 L de agua destilada y B) cuantificación de azúcares reductores durante recirculación de 500 mL de agua destilada en 50 g de RM200, ambos en BLPR RBK.

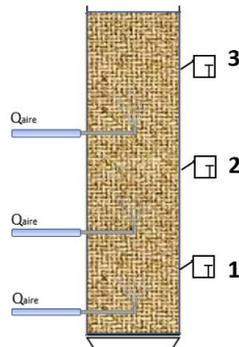


**Figura 32.** A) BLPR RBK instalado previo a recirculación de medio con B) nula cantidad de color y azúcares reductores en el reservorio y C) tras 10 min de recirculación con D) reservorio cargado de azúcares reductores.

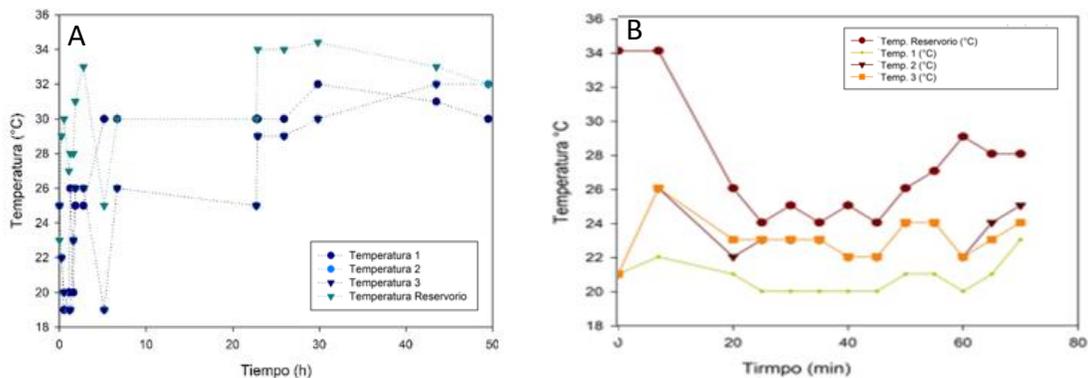
### 3.1.2 Caracterización térmica en RBK

Uno de los principales cuellos de botella en la implementación de biorreactores en sustrato sólido a nivel industrial es el gradiente de temperaturas que se forma dentro del reactor. Los fenómenos de transferencia de masa y energía juegan un papel fundamental en la homogeneización de un biorreactor; con sustratos sólidos los principales fenómenos de

transferencia son de índole gas-sólido. En el caso del BLPR propuesto, hay una constante recirculación de medio líquido controlado a 32°C y adición de aire en distintos puntos de la columna, lo cual afecta la temperatura en la columna tanto de manera integral como por etapas. Se registro la temperatura en tres etapas de la columna manteniendo las condiciones de operación mencionadas.



**Figura 33.** Entradas de aire y sensores de temperatura a lo largo de la columna del BLPR



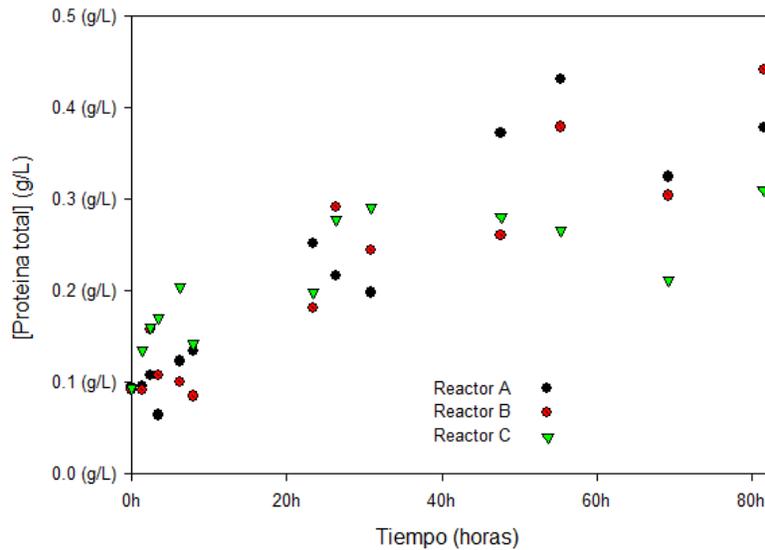
**Figura 34.** A) Caracterización térmica de BLPR RBK manteniendo controlada la temperatura del reservorio a 32°C en prueba de agua y B) en cultivo de *C. flavigena*.

La temperatura, tanto en pruebas de agua como en cultivo con *C. flavigena*, muestra un gradiente de temperatura a lo largo de la columna, llegando a alcanzar diferencias de hasta 2 °C entre el punto 3 y el punto 1, como se pudo observar en la figura 34. De igual manera, las temperaturas en las columnas nunca tuvieron las temperaturas deseadas (32-35°), esto se les atribuyó a los flujos de aeración en las columnas, los cuales se mantenían a temperatura ambiente (25°C).

### 3.1.2 Caracterización metabólica de *C. flavigena* PR-22 en BLPR BTA

#### 3.1.2.1 Crecimiento y modelado cinético

Con el fin de tener una referencia de comparación para el sistema BLPR propuesto, se realizó, por triplicado, un cultivo de *C. flavigena* PR-22 en biorreactores de tanque agitado estilo Schott DURAN. El cultivo se mantuvo a pH 7, 32°C, 150RPM y 2.14vvm. El medio de cultivo fue el medio mínimo mineral descrito en el cuadro 2 con 10% (v/v) de buffer fosfato pH7 y 1% (m/v) de RM200 previamente neutralizado mediante a constante adición de NaOH a una suspensión 1% (m/v) de RM200 hasta mantener neutralidad constante. El cultivo duró 80 horas, durante las cuales se tomaron muestras por triplicado y se cuantificó proteína total como representante de biomasa y la actividad CMCasa, FPasa y OLTasa.



**Figura 35.** Crecimiento, representado por proteína total, de *C. flavigena* PR-22 en los 3 BTAs SCHOTT DURAN utilizados.

Debido a la imposibilidad de cuantificar el consumo de sustrato, fue imposible modelar un modelo cinético derivado del propuesto por Jaques Monod o alguna de sus derivaciones. Se hizo un modelado matemático logístico:

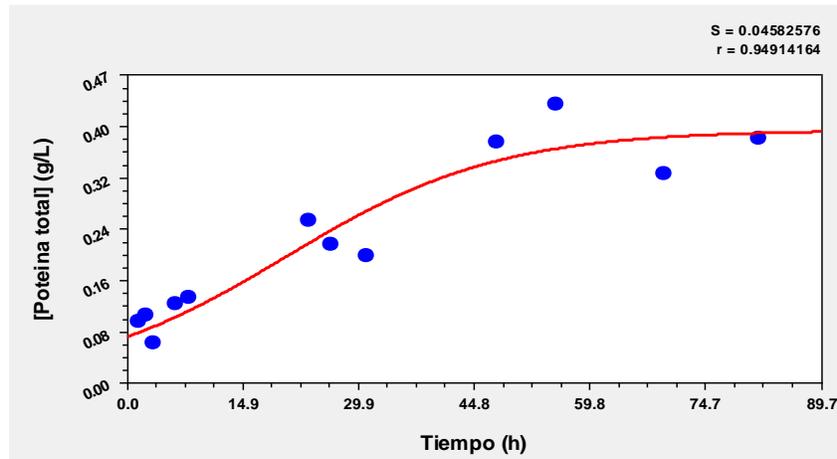
$$[Proteína\ total] \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{x_{max}}{(1 + B e^{-\mu_{max} t})} \dots \text{Ecuación 1}$$

donde

$$B = \frac{x_{max} - x_0}{x_0}$$

.....Ecuación 2

Se determino una velocidad especifica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) promedio de  $0.066h^{-1}$  y biomasa máxima ( $X_{max}$ ) de  $0.3908 g L^{-1}$  de proteína total y una correlación de  $R^2=0.935$ .



**Figura 36.** Modelo logístico de crecimiento para BTA.

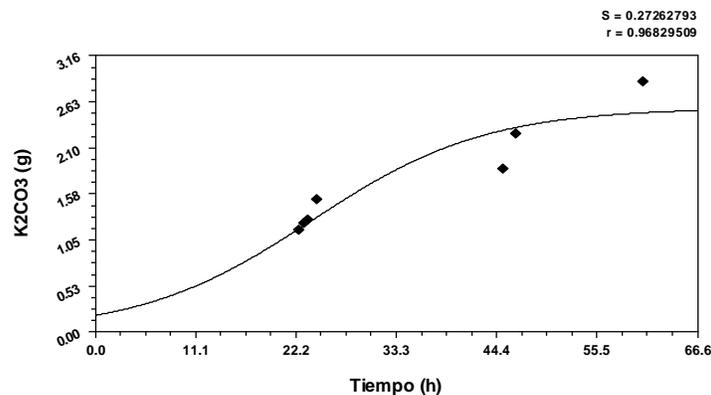
### 3.1.2.1 Correlación entre crecimiento y producción de $CO_2$

*Cellulomonas flavigena*, por ser una bacteria estrictamente aerobia, produce  $CO_2$  como metabolito primario, por lo cual se puede relacionar directamente con el crecimiento microbiano. Debido a esto, se realizó un nuevo cultivo en BTA (utilizando las mismas condiciones descritas previamente) donde el exhausto de aire fue acoplado a una trampa de potasa (KOH) al 50% con el fin de reaccionar el  $CO_2$  y producir carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ), el cual se solubilizará en la trampa de potasa, por consiguiente, el peso de la trampa aumentará en función de la cantidad de  $CO_2$  que se le agregue. Graficando el cambio de peso en la trampa en función del tiempo, se puede tener una idea del  $CO_2$  producido por el microorganismo.



**Figura 37.** A) Sistema de BTA utilizado para comprobación de  $\text{CO}_2$  como representante de producción de biomasa en el cual se aprecia también B) el sistema de medición de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  producido mediante a cambios el peso en la trampa de potasa, C) el BTA Schott DURAN empleado en el cultivo y D) la trampa de potasa.

Se registraron los cambios de peso y se reportaron como  $\text{K}_2\text{CO}_3$  producido. Estos datos se graficaron en función del tiempo de cultivo y se utilizó el mismo modelo logístico de BTA con los nuevos datos. Se obtuvo una correlación del 97% y una  $\mu_{\text{max}}$  de  $0.1\text{h}^{-1}$ . Debido a esto, se puede proponer medición en línea de  $\text{CO}_2$  para determinar biomasa en un cultivo de *C. flavigena*, sin embargo, hace falta experimentación con mayor cantidad de datos y variables para poder afirmarlo estadísticamente.

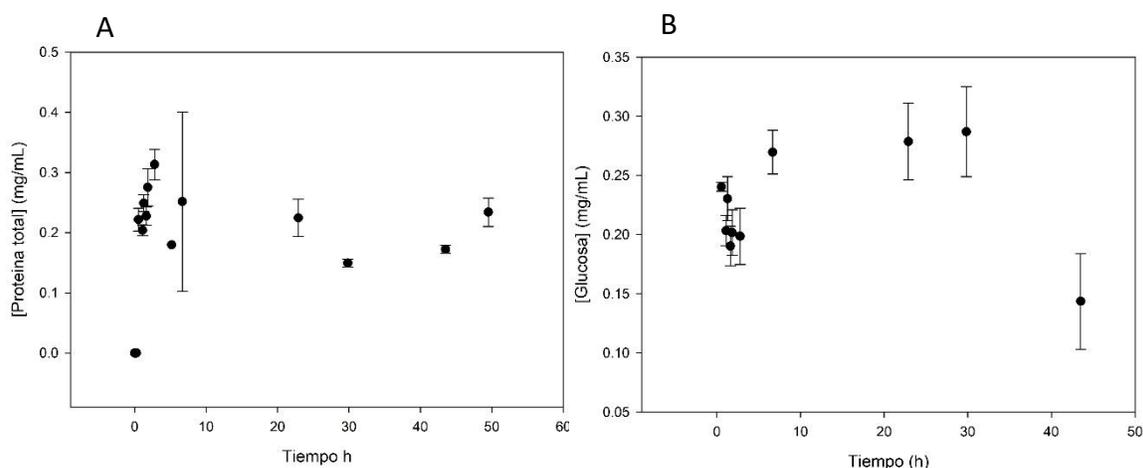


**Figura 38.** Modelo logístico de producción de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  cultivo de *Cellulomonas flavigena* PR-22 para BTA.

### 3.1.3 Crecimiento de *C. flavigena* PR-22 en BLPR RBK

Se utilizó el biorreactor de lecho percolador con recirculación a base de vidrio RBK para probar el crecimiento de *C. flavigena* en el sistema propuesto. Se utilizó un frasco Schott DURAN como reservorio y una termobalanza Thermofisher para controlar la temperatura

del medio líquido. Durante 80h se muestreó directamente del medio líquido y se cuantificó proteína total para estimar crecimiento microbiano y azúcares reductores en el medio. Se utilizaron 50g de RM200 sin neutralizar como sustrato sólido y 500mL de MMM con 10% buffer fosfato pH7. Hubo crecimiento, pero fue muy limitado, además de que fue oscilatorio durante el cultivo. Al final del cultivo se obtuvo un pH de 4.2 en el medio líquido, el cual se obtuvo con la constante acidificación proveniente del RM200. El ambiente ácido inhibió el crecimiento de *C. flavigena*. Se optó por neutralizar directamente el RM200.

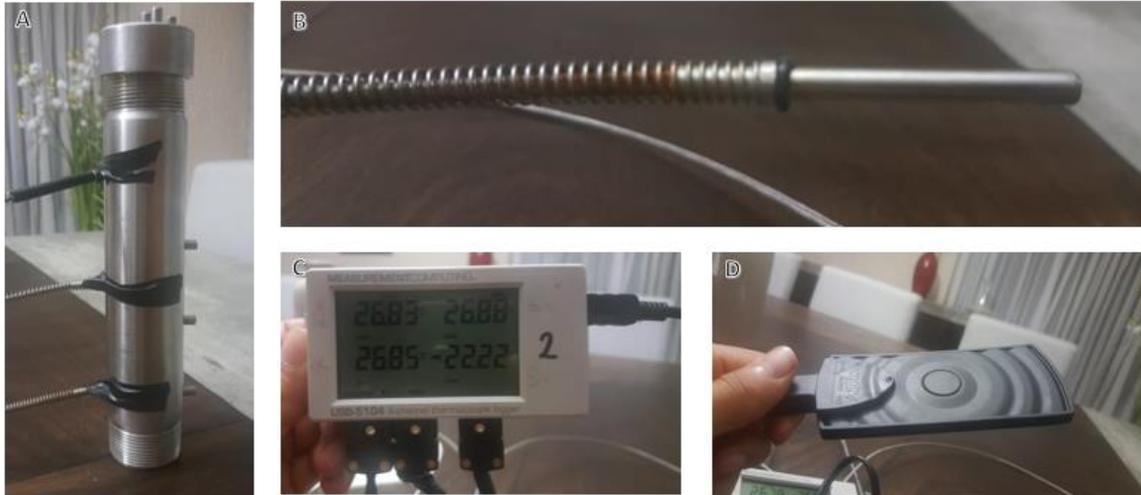


**Figura 39.** A) Crecimiento inhibido de *C. flavigena* en BLP RBK y B) azúcares reductores en el medio líquido.

### 3.1.4 Crecimiento de *C. flavigena* PR-22 en BLPR MBQ

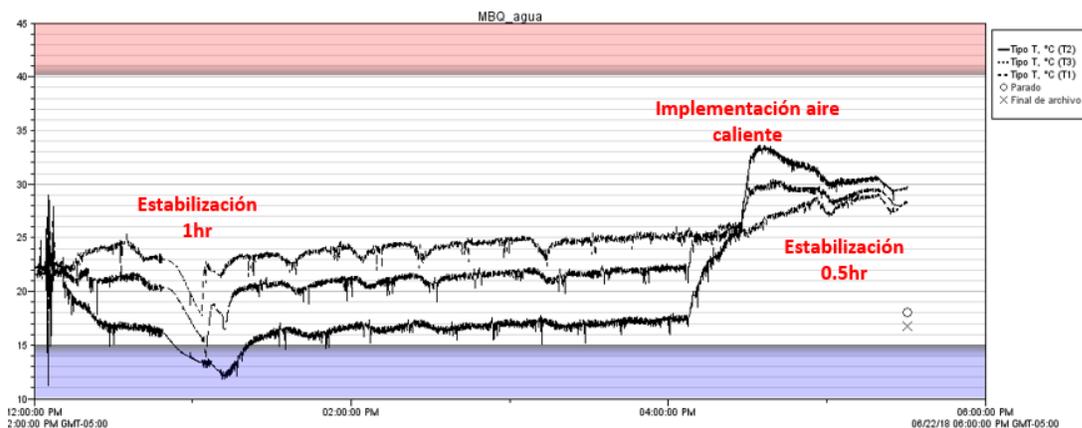
#### 3.1.4.1 Caracterización térmica de MBQ

A pesar de tener las mismas dimensiones y características que RBK la caracterización térmica del BLPR MBQ era necesaria previa a una incubación. Se realizó el mismo procedimiento empleado para RBK; sin embargo, se utilizaron distintos sistemas de control y medición. Como se puede observar en la figura 40 se utilizaron termopares tipo J acoplados a un registrador de datos de temperatura; de igual manera, se empleó una resistencia de pecera acoplada a un termostato para el control de temperatura a 32°C.



**Figura 40.** A) Reactor cilíndrico con termopares instalados, B) termopar tipo T, C) módulo de recepción de datos (4 entradas) y D) Resistencia sumergible de pecera.

A pesar de pruebas preliminares donde agua corriente se mantenía a 32°C, la resistencia de pecera empleada no logró llegar a este nivel; sumado a esto, se estaba perdiendo agua en el reservorio a una razón de aproximadamente 60 mL por hora. Se tardó una hora en estabilizarse la temperatura. A partir de la cuarta hora de prueba, se decidió por humidificar el aire de entrada para evitar la pérdida de agua por medio de arrastre y calentarlo a 34°C. Con estas condiciones se pudo mantener a temperatura más cercana al rango deseado y se estabilizó en media hora el comportamiento térmico. Tras este experimento se cambió la resistencia de pecera por una tubular sumergible hecha a la medida del reservorio.



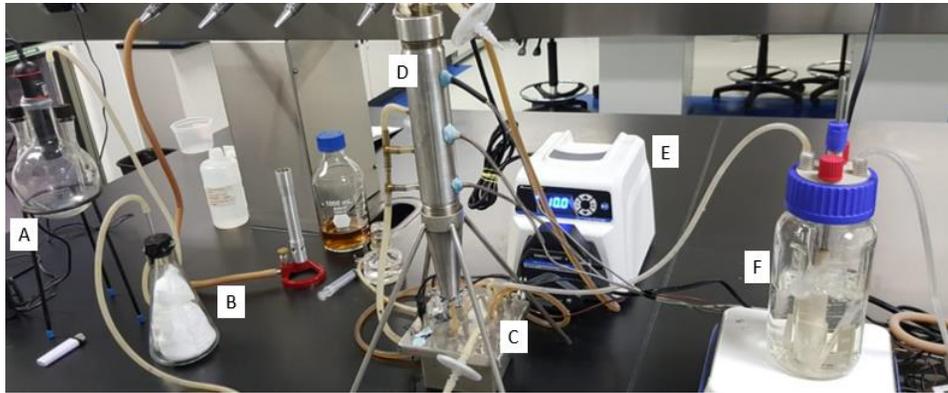
**Figura 41.** Caracterización térmica de BLPR MBQ y efecto de aeración a 34°C. Gráfica obtenida directamente del software del registrador de datos Measurement Computing USB-5100 Series.



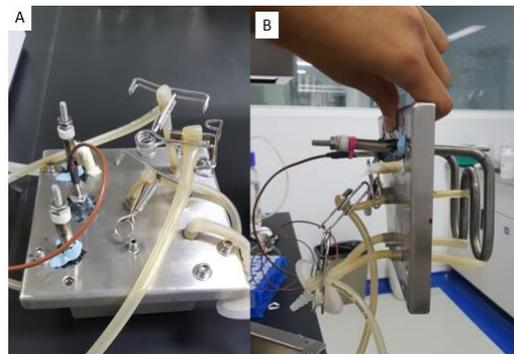
**Figura 42.** Sistema de caracterización térmica para BLPR MBQ con implementación de aire húmedo y a temperatura de 34°C utilizando un frasco Schott Duran y una termobalanza con control Thermofisher.

#### 3.1.4.2 Montaje de MBQ

Con los cambios realizados tras la caracterización térmica, se montó MBQ para cultivo de *Cellulomonas flavigena*. Se utilizó nuevamente un frasco Schott DURAN para la humidificación y calentamiento de aire de entrada. Se utilizó una bomba peristáltica MasterFlex para recircular el medio líquido desde el reservorio hasta la parte superior de la columna. El exhausto de aire del reservorio se acopló a una trampa de algodón para reducir la humedad del aire y después a un matraz de bola con un sensor de CO<sub>2</sub> Vernier. Se utilizaron mangueras MasterFlex para todas las uniones de aire y medio líquido además de filtros Millipore para cada entrada y salida de gases (la trampa de CO<sub>2</sub> se retiró para el cultivo de BGA debido a su poca funcionalidad). La columna fue empacada con 50g de biomasa neutra y junto con el reservorio se esterilizaron a 121°C y 15 psi durante 15 minutos.



**Figura 43.** Biorreactor de lecho percolador con A) Matraz bola con sensor de CO<sub>2</sub>, B) trampa de algodón para absorber humedad del aire, C) reservorio, D) columna del lecho, E) bomba peristáltica y F) humidificador y calentador de aire.



**Figura 44.** A) Vista del reservorio desde la parte superior y B) desde el perfil.

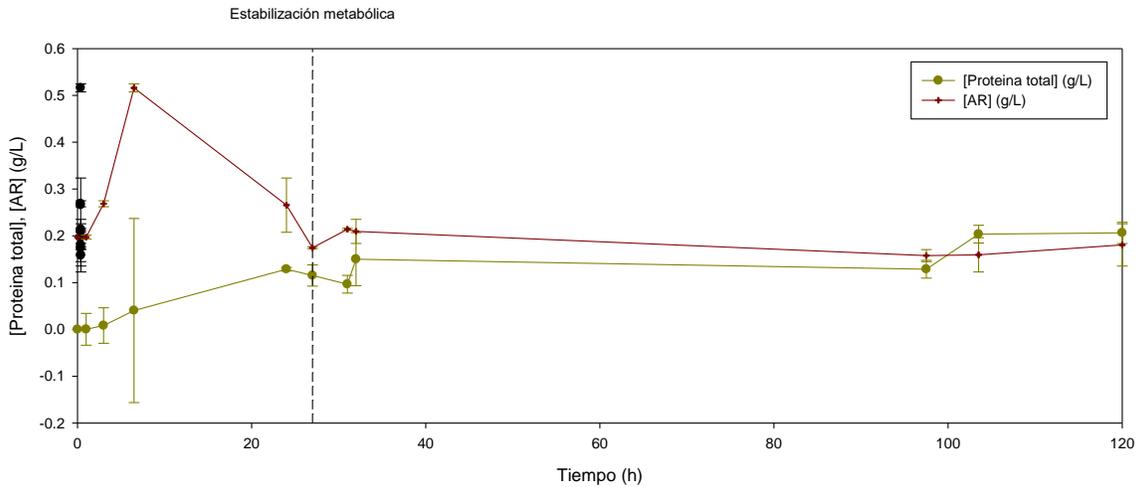
#### 3.1.4.3 Caracterización metabólica de *C. flavigena* PR-22 en MBQ

En cada cultivo se inoculo el reservorio con 50mL de un cultivo previo de *C. flavigena* PR-22 crecido en matraz de 250mL con MM, 10% buffer fosfato pH 7 y 1% (m/v) de biomasa lignocelulolítica (bagazo de agave y rastrojo de maíz). Se manejaron los flujos descritos en la sección 3.1.1. La nueva resistencia tubular mantuvo la temperatura del medio líquido del reservorio en un rango de 35-37°C. El cultivo duró 120 horas durante los cuales se determinó proteína total, azúcares reductores, actividad holocelulolítica.

#### **RM200 como sustrato**

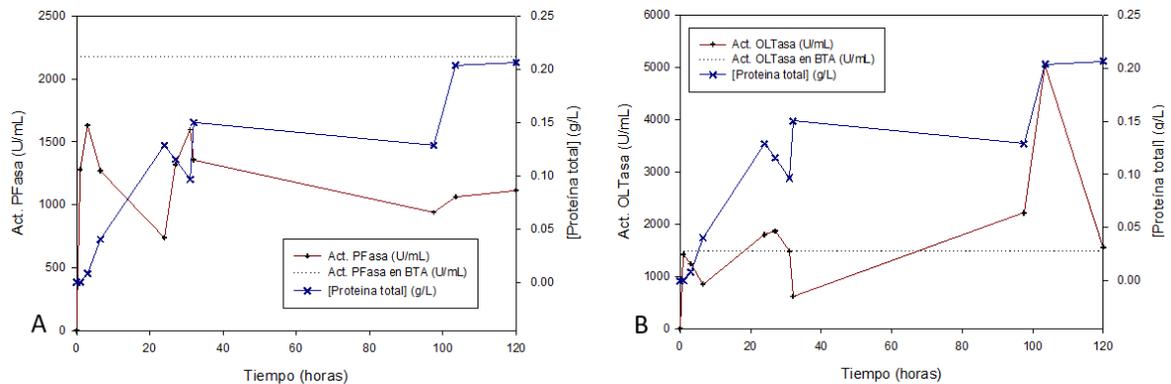
Con ambos sustratos, la proteína total del cultivo incrementó en función del tiempo, por lo que se puede comprobar que hubo crecimiento bacteriano dentro del sistema. Con RM200,

como se puede observar en la figura 45 la concentración de azúcares reductores aumenta con el transcurso de 8 horas hasta un máximo de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  tras lo cual se reduce considerablemente la concentración hasta la hora 24, donde se mantuvo estable a  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ . Durante las mismas 8 horas la cantidad de biomasa incremento de manera casi exponencial hasta un máximo de  $0.15 \text{ g L}^{-1}$ , tras lo cual disminuyó su tasa de crecimiento.



**Figura 45.** Crecimiento de biomasa y reducción de azúcares reductores durante el transcurso del cultivo en BLPR MBQ.

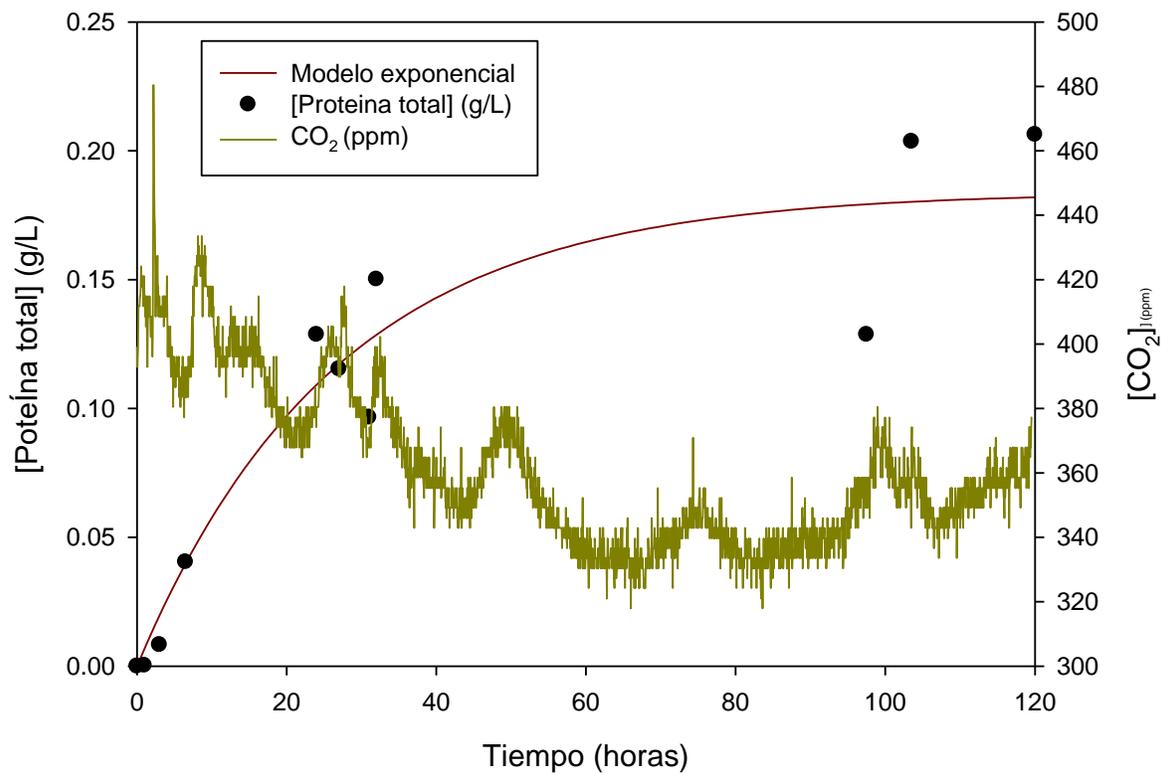
El decremento e incremento exponencial de azúcares reductores y biomasa, respectivamente, concuerda con el comportamiento de la actividad enzimática. La actividad celulolíticas (FPasa) tiene un incremento exponencial en las primeras 8 horas de cultivo, tras lo cual disminuye durante 24 hasta oscilar y mantenerse estable el resto del cultivo



**Figura 46.** Actividad enzimática en comparación con crecimiento de biomasa y referencia de actividad en BTA para A) FPasa en BLPR MBQ y B) OLTasa en BLPR MBQ.

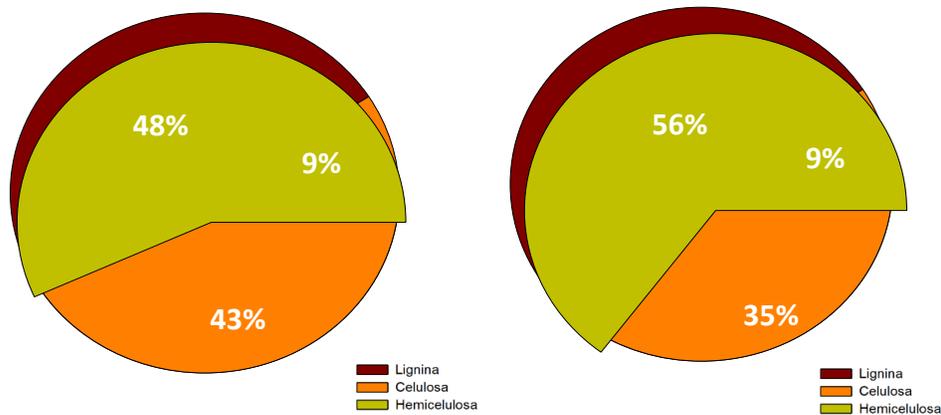
Con el comportamiento obtenido para la generación de biomasa, consumo de azúcares reductores y actividad enzimática se puede definir 8 horas como un punto de inflexión en el que se alcanza un lavado máximo de azúcares reductores y tras el cual empiezan a ser consumidos por la bacteria. Este comportamiento se extiende hasta las 24 horas, tras el cual se alcanza una etapa de estabilización en la que la biomasa continúa su crecimiento, siguiendo el modelo matemático exponencial propuesto en la figura 28. mientras los azúcares se mantienen a una misma concentración. La concentración estable de los azúcares se debe a que la hidrólisis de la holocelulosa (principalmente hemicelulosa) produce azúcares reductores a la misma razón que *Cellulomonas* los consume para crecimiento.

Se utilizó un sensor de CO<sub>2</sub> vernier para estimar en línea el crecimiento metabólico de *Cellulomonas*, sin embargo, la inestabilidad del sensor demostraba comportamientos completamente ajenos a los reportados previamente, por lo que no se consideran representativos de lo ocurrido dentro de MBQ. Para posteriores experimentaciones se recomienda hacer un análisis experimental previo con el sensor para definir su correcto uso o bien implementar la trampa de potasa usada anteriormente.



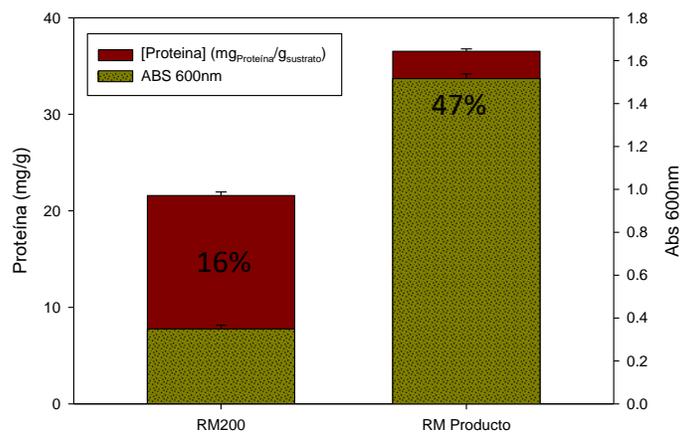
**Figura 47.** Modelo matemático exponencial de crecimiento de *Cellulomonas flavigena* PR-22 y CO<sub>2</sub> a tiempo real.

Se hizo un análisis del RM200 tras la incubación. Se analizaron los porcentajes de celulosa y hemicelulosa. Para estos análisis se solubilizó la hemicelulosa en una solución de KOH 30% durante 24 horas y se hizo una diferencia de masa para estimar la cantidad porcentual de celulosa y hemicelulosa en RM200 neutro y RM200 posterior a la incubación. El porcentaje de hemicelulosa se redujo hasta un 16% tras la incubación. Esto se puede observar en la figura 48. La composición de la holocelulosa del bagazo de agave pretratado fue proporcionada por Langridge y se puede observar en la figura 49.



**Figura 48.** Composición del RM200 A) previo y B) post la incubación en MBQ.

No se conocen métodos de adhesión en la matriz extracelular de *Cellulomonas flavigena* PR22, sin embargo se suspendieron 20g de RM200 neutro y RM200 tras la incubación en una solución de Tween 80 al 0.1%. Se mantuvo en constante agitación durante 24 horas y se le determino concentración de proteína. Visualmente había mucha distinción entre ambas muestras, por lo cual se midió también la turbidez mediante a espectrofotometría a 600nm.

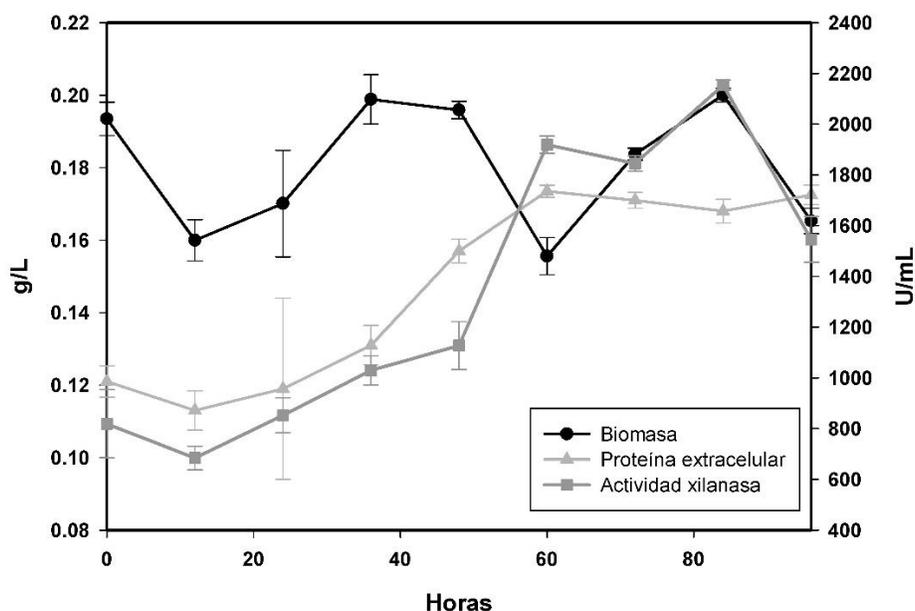


**Figura 49.** Concentración de proteína y turbidez en la suspensión de A) RM200 neutro y B) RM200 post 120 horas de incubación.

Tanto en turbidez como en concentración de proteína, se obtuvieron valores mucho más altos tras la incubación en MBQ. Dentro de la matriz sólida de la columna del BLPR se mantuvo una gran cantidad de biomasa, por lo cual no se descarta que *Cellulomonas flavigena* PR22 tenga un mecanismo de adhesión que le permita mantenerse embebida en el sustrato. Por falta de tiempo, fue imposible determinar actividad enzimática de esta suspensión, sin embargo, esto hubiera sido sumamente interesante para definir si también las enzimas hidrolíticas se mantuvieron dentro de la matriz sólida.

### BGA como sustrato.

Al igual que con RM200, *C. flavigena* PR-22 tuvo un constante aumento en proteína creciendo en BGA, sin embargo la proteína total tuvo un comportamiento oscilatorio debido a los sólidos solubles obtenidos del sustrato. En contraste, en la proteína extracelular (obtenida tras un proceso de centrifugación de la muestra) se puede observar un crecimiento logístico en función del tiempo. Por ende, la proteína extracelular se relacionó directamente con el crecimiento celular. En la figura 50 se puede apreciar el comportamiento proteico previamente mencionado.



**Figura 50.** Crecimiento y actividad enzimática de *C. flavigena* PR-22 en BLPR utilizando BGA como sustrato.

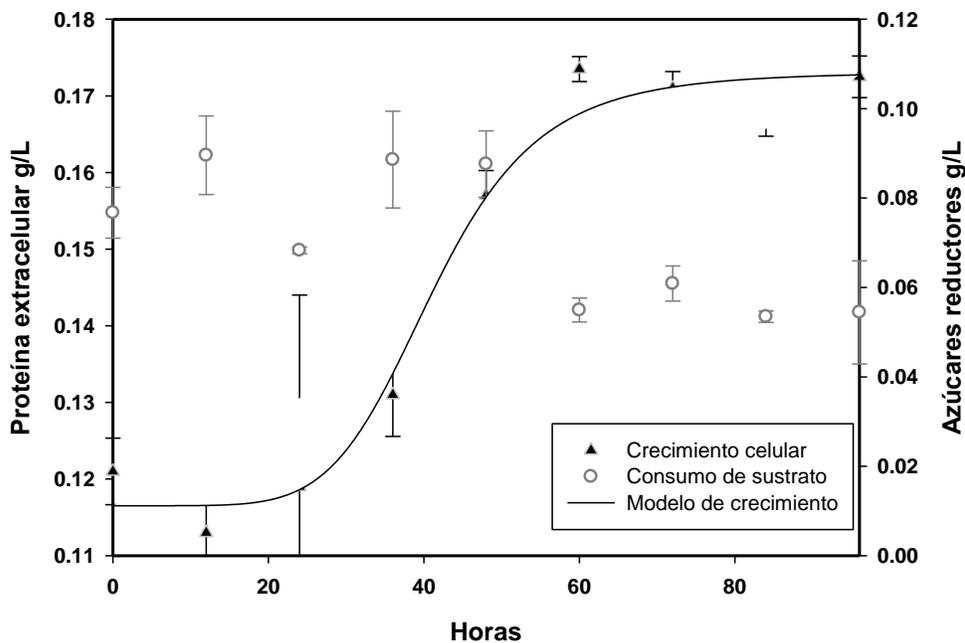
En la figura previa se puede apreciar la actividad xilanasa durante el transcurso del cultivo. El comportamiento de actividad enzimática es relacionable con la proteína extracelular producida por la bacteria, manteniéndose constante hasta la hora 48 donde se observa un creciente casi

exponencial. Esto concuerda con lo reportado en la literatura (Abt, y otros, 2010). La actividad xilanasa tiene un pico de 2200 U/L menor a las 3631 U/L obtenidas en sustrato sumergido utilizando BGA.

El crecimiento celular fue modelado matemáticamente a la ecuación logística de cuatro parámetros Morgan Mercer Fodin (MMF):

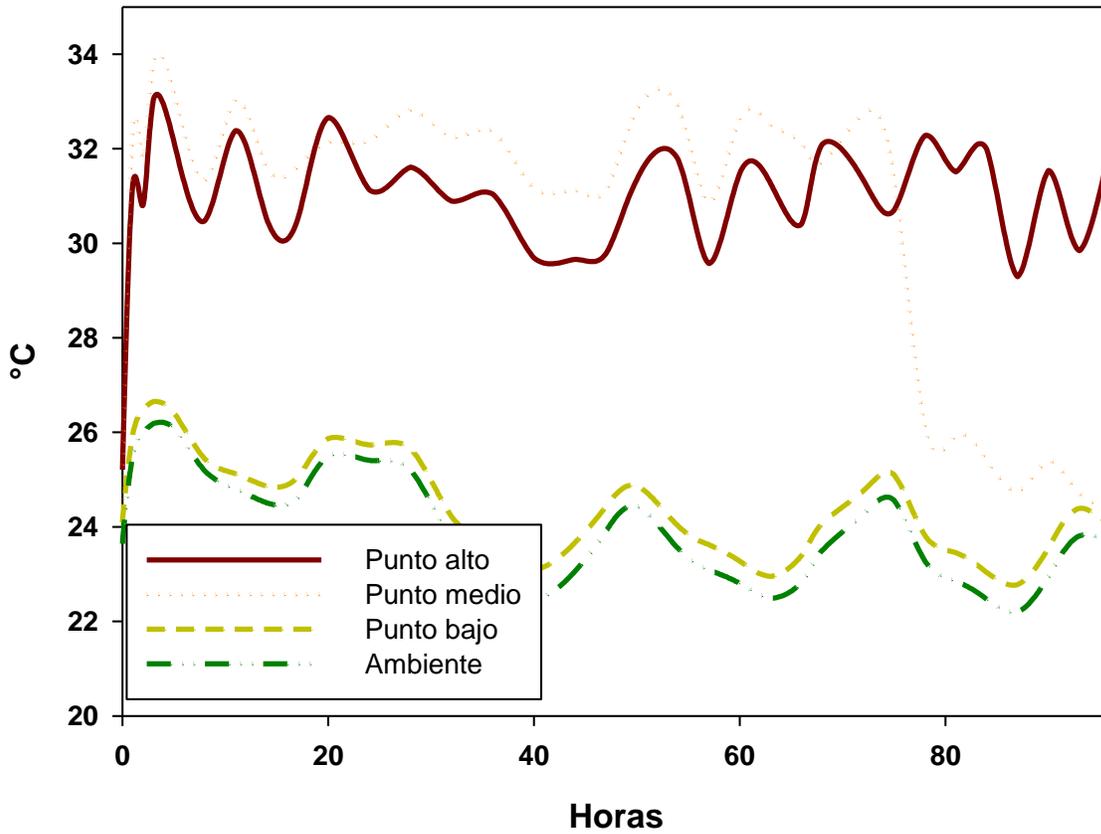
$$X_{pE} = \frac{ab + ct^d}{b + t^d}$$

Donde  $X_{pE}$  es el crecimiento de biomasa reportada como proteína extracelular y a, b, c y d son constantes empíricas y equivalen a 0.117,  $5.05 \times 10^9$ , 0.173 y 6 respectivamente. El modelo tiene un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0.992. La tasa de crecimiento específica fue de  $0.0886 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 51** Crecimiento celular reportado como proteína extracelular y modelo logístico MMF; concentración de azúcares reductores en el medio.

Se monitoreo la temperatura dentro de la columna durante el transcurso del cultivo, como se puede observar en la figura 52.



En el punto superior y medio de la columna la temperatura se mantuvo en el rango de 30°C – 34°C. El punto inferior se mantuvo siempre a la misma temperatura que el ambiente, por lo que se supone un malfuncionamiento y se asume que toda la temperatura se mantuvo en condiciones favorecedoras de cultivo.

### 3. Reflexión de aprendizajes, implicaciones éticas y aportes sociales del proyecto.

#### 4.1 Aprendizajes profesionales

Durante el transcurso del proyecto he desarrollado una serie de competencias profesionales que me han vuelto más competente en ámbito de la biotecnología, así como puesto en prueba saberes y técnicas aprendidas durante el transcurso de mi carrera. Uno de los aspectos que más me ayudado a mejorar es el del análisis de datos y situaciones en general. Aprendí que un resultado negativo puede ser un buen resultado que te proporciona una cantidad enorme de información y aprendizaje, sobre todo en el ámbito de la investigación y desarrollo de tecnologías. He aprendido a desarrollar técnicas analíticas de laboratorio (basadas en protocolos establecidos) que se ajusten a la información que se necesita y el equipo que se tiene disponible. Con proyectos de desarrollo e investigación como este se redescubre el significado de “ingeniería”: existen ocasiones en las que se tienen obstáculos que te impiden llegar a un objetivo y hay que utilizar el ingenio para poder sobreponerlos.

#### 4.2 Aprendizajes sociales

La biotecnología esta normalmente relacionada con producción de metabolitos de interés industrial como farmacéutica, alimentaria, química, etc. Este proyecto me ha ayudado a comprender mejor el alcance que tiene la investigación y desarrollo de biotecnología para el ser humano y el medio ambiente. Las biorrefinerías de segunda generación pueden ayudar en gran medida a mover la sociedad en la que vivimos a una con un uso y gasto de energía mucho más responsable y sustentable.

#### 4.2 Aprendizajes éticos

La biotecnología siempre es razón de debate ético debido a su misma naturaleza: el uso de organismos vivos para desarrollar tecnología. Esto sumado a la discusión acerca de la responsabilidad de realizar modificaciones genéticas. En este proyecto destaca el hecho de que se utilizó una cepa mutante de *Cellulomonas flavigena*. Al analizar los enormes alcances que tiene (por poner este proyecto de ejemplo) la bioenergía para mejorar la vida de las personas y los rendimientos que se pueden alcanzar con organismos genéticamente

modificados, el balance entre a favor y en contra de estos se vuelve muy claro. Esta práctica es el futuro de la gran mayoría de las industrias y debe de fomentarse su investigación y desarrollo, claro sin nunca dejar a un lado la responsabilidad y el cuidado.

#### 4.3 Aprendizajes personales

Este PAP me ha ayudado a darme cuenta del potencial que tengo como futuro profesionalista y que soy capaz de hacer más cosas de las que creía, sin embargo, también he logrado identificar muchos aspectos de mi persona que se tiene que mejorar, tanto en la vida como profesionalmente. Uno de ellos es la organización de tiempo; en la investigación biológica, los tiempos para obtener resultados son muy largos. Se tiene que mantener un orden cronológico de las actividades a realizar y apegarse a él. Algo que mejoró de mi persona durante el transcurso del PAP fue mi reacción ante el fracaso o los problemas, hay ocasiones en las que se tiene que dejar a un lado la emotividad y ver de manera fría o alejada las situaciones para poder tomar una decisión más acertada.

#### 4. Conclusiones

- El biorreactor de tipo lecho percolador con recirculación de medio promovió el crecimiento de *C. flavigena* PR-22.
- A partir de la octava hora de cultivo el consumo de azúcares reductores, producción de biomasa y actividad hemicelulolítica incrementan exponencialmente, tras lo cual la razón de hidrólisis y consumo de sustrato se igualan, manteniendo la concentración de azúcares reductores constante.
- Con la operación del sistema utilizando rastrojo de maíz se obtuvo una producción máxima de 3300 U/mL de ototasa en la primera semana de cultivo, inferior a las 3600 U/mL obtenidas en un biorreactor de tanque agitado (BTA). Con bagazo de agave se produjeron 2200 U/mL de hemicelulosa.
- El crecimiento de *C. flavigena* PR-22 fue ajustado a un modelo cinético exponencial y se determinó una velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) de 0.00375 h<sup>-1</sup> para rastrojo de maíz y de 0.08865 h<sup>-1</sup> para bagazo de agave.
- Hubo una disminución del 16.5% en la proporción de hemicelulosa en rastrojo de maíz tras el cultivo.

## 6. Referencias

- Abt, B., Foster, B., Lapidus, A., Clum, A., Sun, H., Pukall, R., . . . Ivanova, N. (2010). Complete Genome sequence of *Cellulomonas flavigena* type strain (134T). *Standards in Genomic Sciences*.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, P., Ballesteros, M., & Negro, M. (2009). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 4851-4861.
- Birte, A., Brian, F., Alla, L., Alicia, C., Hui, S., Rüdiger, P., . . . Konstantinos, M. (2010). Complete genome sequence of *Cellulomonas flavigena* type strain (134T). *Stand Genomic Sci*, 15-25.
- Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., . . . Han, S. (2016). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 196-206.
- Environmental Protection Agency. (2016). *Renewable Fuel Standard Program: Standards for 2017 and Biomass Based Diesel Volume for 2018*. Environmental Protection Agency.
- International Energy Agency. (2017). *Key World Energy Statistics*. Paris: IEA Publications.
- Jacobson, R., Zhang, X., DuBose, R., & Matthews, B. (1994). Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*. *Nature*, 761-766.
- Jin, Y., Petricevic, M., John, A., Raich, L., Jenkins, H., Portela De Souza, L., . . . Davies, G. (2016). A beta-Mannanase with a Lysozyme-like Fold and a Novel Molecular Catalytic Mechanism. *ACS Cent Sci*.
- Khademi, S., Zhang, D., Swanson, S., Wartenberg, A., Witte, K., & Mayer, E. (2002). Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*.
- Knauf, M., & Moniruzzman, M. (2004). Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *International Sugar Journal*, 147-150.
- Krishna, C. (2005). Solid-State Fermentation Systems-An Overview . *Critical Reviews in Biotechnology*.

- Levisson, M., Han, G., Deller, M., Xu, Q., Biely, P., Hendriks, S., . . . Kengen, S. (2012). Functional and structural characterization of a thermostable acetyl esterase from *Thermotoga maritima*. *Proteins*.
- Lo Leggio, L., K. S., Eckert, K., Teixeira, S., Bhat, M., Andrei, C., . . . Larsen, S. (2001). Substrate Specificity and Subsite Mobility in *T. Aurantiacus* Xylanase 10A. *FEBS Lett.*
- Martinez-Hernandez, E., & Samsatli, S. (2017). Biorefineries and the food, energy, water nexus — towards a whole systems approach to design and planning. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 16-22. doi:<https://doi.org/10.1016/j.coche.2017.08.003>
- Mathioudakis, V., Gerbens-Leenes, P., Meer, T. V., & Hoekstra, A. (2017). The water footprint of second-generation bioenergy: A comparison of biomass feedstocks and conversion techniques. *Journal of Cleaner Production*, 571-582. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.032>
- Mattinen, M., Linder, M., Drakenberg, T., & Annala, A. (1998). Solution structure of the cellulose-binding domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* and its interaction with cello-oligosaccharides. *Eur Journal of Biochemistry*, 279-286.
- Mitchel, A., D., Verovic, M., & Krieger, N. (2006). Solid-State fermentation bioreactor fundamentals: Introduction and Overview. En Mitchel, D. A., M. Verovic, & N. Krieger, *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation* (págs. 1-12). Springer.
- Muñoz-Tlahuiz, F. G.-R.-M.-S.-T.-G.-G.-L.-R. (2013). Producción de rastrojo y grano de variedades locales de maíz en condiciones de temporal en los valles altos de Libres-Serdán, Puebla, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(4).
- Murad, H., & Azzaz, H. (2010). Cellulase and Dairy Animal Feeding. *Biotechnology*, 238-256.
- Nizami, A., Rehan, M., Waqas, M., Naqvi, M., Ouda, O., Shazad, K., . . . Pant, D. (2017). Waste biorefineries: Enabling Circular Economies in Developing Countries. . *Bioresource Technology*.
- Norgren, M., & Edlund, H. (2014). Lignin: Recent advances and emerging applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 409-416.

- Özdenkci, K., De Blasio, C., Mudassar, H. R., Melin, K., Oinas, P., Kiskinen, J., . . . Järvinen, M. (2017). A novel biorefinery integration concept for lignocellulosic biomass. *Energy Conversion Management*.
- Paschoal, G., Muller, C., Carvalho, G., Tischer, C., & Mali, S. (2015). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NANOFIBRILLATED CELLULOSE FROM OAT HULLS. *Quimica Nova*.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. . *International Microbiology*, 53-63.
- Rojas-Rejón, Ó. A., Poggi-Varaldo, H. M., Ramos-Valdivia, A. C., Ponce-Noyola, T., Cristiani-Urbina, E., Martínez, A., & de la Torre, M. (2016). Enzymatic Saccharification of Sugar Cane Bagasse by Continuous Xylanase and Cellulase Production from *Cellulomonas flavigena* PR-22. *Biotechnology Progress*, 321-326.
- Rose, J., & Bennet, A. (1999). Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci*, 176-183.
- Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J., Martínez-Ripoll, M., Lequerica, J., & Polaina, J. (1998). Crystal structure of beta-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *Journal of Molecular Biology*, 491-502.
- Schubot, F., Kataeva, I., Chang, J., Shah, A., Ljungdahl, L., Rose, J., & Wang, B. (2004). Structural basis for the exocellulase activity of the cellobiohydrolase CbhA from *Clostridium thermocellum*. *Biochemistry*, 1163-1170.
- Singh, P., Suman, A., Tiwari, P., Arya, N., Gaur, A., & Shrivastava, A. (2007). Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World J Microbiol Biotechnology*.
- Stackerbrandt, E., & Kandler, O. (1979). Taxonomy of the Genus *Cellulomonas*, Based on Phenotypic Characters and Deoxyribonucleic Acid-Deoxyribonucleic Acid Homology, and Proposal of Seven Neotype Strains . *International Journal of Systematic Bacteriology*, 273-282.

- Thayer, D. (1984). Motility and Flagellation of Cellulomonads. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 218-219.
- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J. A., & Hernández-Santiago, C. (2010). Distribution potential of bioenergy resources from agricultural activities in México. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2147-2153.
- Vandamme, E. J. (2009). Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products. En S.-N. Nigam, & A. Pandey, *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (págs. 3-10). Springer.
- Vandenbossche, V., Braulta, J., Vilarema, G., Hernández-Melénde, O., Vivaldo-Limac, E., Hernández-Luna, M., . . . Castellón, E. (2014). A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and biocatalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Industrial Crops and Products*.
- Zhao, S., Li, G., Zheng, N., Wang, J., & Yu, Z. (2018). Steam explosion enhances digestibility and fermentation of corn stover by facilitating. *Bioresource Technology*.

## 7. Anexos

## **Anexo 1 : Protocolo para cuantificación de $\alpha$ -, $\beta$ - y $\gamma$ -celulosa, lignina, ceniza y hemicelulosa (por diferencia) de material vegetal.**

**Resumen:** Se determinará la composición de holocelulosa (y sus componentes, celulosa + hemicelulosa) y lignina (soluble e insoluble) en muestras de biomasa vegetal. Mediante a cloración repetida (Rabemanolontsoa y Saka, 2011), se retirará la lignina soluble de la muestra. A continuación, la muestra se expondrá a dos hidrólisis acidas donde se recuperará el hidrolizado suspendido, con el cual se cuantificará la cantidad de lignina insoluble (TAPPI T222), proteína (Bradford) y ceniza (TAPPI T211). Con el suspendido del hidrolizado se determinará la cantidad de lignina soluble en una muestra sin clarificar mediante a espectrofotometría (NREL). La diferencia de pesos determinará el porcentaje de holocelulosa en la muestra. Para finalizar, se cuantificará la composición de celulosa ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) en la muestra clarificada (TAPPI T203); la diferencia entre la celulosa total y la holocelulosa equivale a la hemicelulosa en la muestra.

**OJO**, este es un ácido fuerte de doble disociación, por lo que la reacción:



es altamente reactiva, exotérmica y agresiva. SIEMPRE MEZCLAR EL ÁCIDO EN EL AGUA, NUNCA AL REVÉS. Colocar el ácido lentamente y que resbale por la pared del vaso para evitar salpicaduras. Es normal que se caliente, pero trabaje con precaución (utilizar guantes). Revisar las fichas de seguridad, pero lavar con mucha agua si se llega a tocar.

### Preparación de las muestras.

1. Secado y molido de las muestras.
  - I. Pesar 200g de muestra.
  - II. Secar la muestra en horno a 100°C hasta peso constante.
    - i. Pesar el soporte donde se secará la muestra.
    - ii. Agregar los 200g de muestra y pesar el conjunto.
    - iii. Insertar en el horno a 100°C.
    - iv. Pesar cada 30min. Para pesar, retirar la muestra del horno y colocar en un desecador; abrir el desecador solo para pesar la muestra (tratando de ser rápido para que no se humidifique con el aire) y para regresar al horno.
    - v. Pesar las veces que sean necesarias hasta que el peso sea constante.
  - III. Moler la muestra (utilizar molino manual de laboratorios de química)
  - IV. Utilizando un tamizador, recuperar toda la muestra con partícula de diámetros de 150-500µm (malla 35-100).
  - V. De ser necesario, repetir la molienda y tamizado hasta recuperar la mayor cantidad posible de muestra.

### Clarificación de las muestras

Reactivos: Ácido acético glacial, ácido acético 0.2M, Clorito de Sodio (NaClO<sub>2</sub>), Acetona.

1. Determinar la cantidad de ciclos de clorado. (Saltar este paso si ya se conoce el dato)
  - I. Rotular 10 matraces de 250ml. (1,2,3,4,5,6,7,8, 9 y 10 ciclos)
  - II. Pesar y agregar 3.5g de muestra en cada uno.
  - III. Agregar 150ml de ácido acético 0.2M en cada matraz. Agitar.
  - IV. Agregar 1g de clorito de sodio (NaClO<sub>2</sub>) seguido de 0.2ml de ácido acético glacial.
  - V. Mantener en baño maría (70-80°C) durante una hora.
  - VI. Cada 15 min agregar nuevamente clorito de sodio y ácido acético glacial, según la cantidad de ciclos correspondientes. Dejará reposar 1 hora tras el último ciclo.

- VII. Filtrar las muestras en un matraz Kitasato con papel filtro y vacío. Lavar con 500ml de agua fría, seguido por 50ml de acetona.
  - VIII. Recuperar el sólido filtrado y pesar (**PESO MUESTRA CLARIFICADA**: Este peso se utilizará en el paso 3 del análisis de lignina soluble y para la determinación de holocelulosa)
2. El proceso anterior se tiene que realizar únicamente 1 vez por cada muestra. Ya que se conozca la cantidad de ciclos óptimos, repetir el paso anterior únicamente con la cantidad de ciclos necesarios.

### Hidrólisis ácida.

Reactivos: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72% y 4%),

1. } Pesar 600 ± 10 mg de muestra clarificada en un frasco Schott de 200ml. Registra los datos en el orden de 0.1 mg. (Para determinar lignina soluble, pesar 300mg de muestra sin blanquear en otro frasco Schott).
2. Agregar 6.00 ± 0.01 ml de ácido sulfúrico al 72%. Agita durante un minuto con agitador.
3. Coloca las muestras (dentro de los frascos Schott) en baño maría (30 ± 3°C) durante 60 ± 5 min. Sin remover el frasco del baño maría, agitar cada 15 minutos con agitador de vidrio. (Si el volumen/cantidad de frascos es muy alta para utilizar en los baños maría automáticos del laboratorio, apoyarte con planchas de calentamiento y un contenedor metálico).
4. Al terminar los 60 minutos de baño maría, remover los frascos y diluir el ácido al 4% agregando agua destilada.
5. Mezcla la disolución invirtiendo y agitando suavemente los tubos de frascos múltiples veces. De esta manera se eliminarán las fases de separación entre concentraciones altas y bajas de ácido.
6. Coloca los frascos en la autoclave a 121°C durante 15 minutos. (O bien en ollas de presión a 15 kPa durante 15 min). **Ojo**, se tiene que agregar un frasco con el mismo volumen de ácido sulfúrico al 4% para muestra blanco.
7. Dejar que los frascos se enfríen a temperatura ambiente.
8. Mezclar vigorosamente cada muestra con varilla de agitación.
9. Dejar que los sólidos precipiten durante 30min.
10. Filtrar el hidrolizado con papel filtro y recuperar tanto el filtrado como los sólidos. Registrar el **volumen del hidrolizado**.

### Análisis de lignina insoluble

1. Lavar el sólido del filtro anterior con agua caliente.
2. Tomar la muestra y determinar el % de humedad en una termobalanza. Reportar como lignina insoluble la cantidad de filtrado seco (**Peso lignina insoluble**).
3. Para determinar el porcentaje de lignina en la muestra:

$$\% \text{lignina insoluble} = \frac{\text{Peso filtrado seco}}{600 \text{mg}}$$

### Análisis de lignina soluble

Reactivos: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4%,

1. Realizar un barrido de espectrofotometría con ácido sulfúrico al 4%. Reportar la longitud de onda máxima. **Realizado:** longitud de onda óptima es 320nm.
2. Con la longitud de onda optima, se lee la absorbancia del hidrolizado ácido (muestra sin blanquear) utilizando ácido sulfúrico al 4% como blanco. **OJO**, utilizar únicamente celdas de cuarzo, de lo contrario el ácido sulfúrico degradará la celda. Tener cuidado con el manejo de estas celdas ya que son costosas (aproximadamente 1500 pesos c/u)
3. La absorbancia debe de estar entre 0.7 y 1.0. De lo contrario, realizar y reportar las diluciones necesarias.
4. Calcular la cantidad de lignina soluble utilizando la siguiente ecuación:

$$\%Lignina_{soluble} = \frac{UV_{abs} * Volumen_{hidrolizado} * Dilución}{\epsilon * ODW_{muestra} * Longitud}$$

Donde  $UV_{abs}$  = Absorbancia promedio de la muestra a longitud de onda recomendada (valor de **30** para olote, con longitud de onda de **320nm**).

$\epsilon$  = Absorbancia registrada

ODW = Peso de la muestra en mg. (**300mg**)

Longitud: Longitud (en centímetros) que tiene que atravesar el haz de luz (consultar manual de equipo). **1mm** para las celdas de cuarzo de laboratorio de alimentos y laboratorio de química.

Volumen de hidrolizado: Volumen que se filtró tras la centrifugación. En esta modificación se tomaron, centrifugaron y recuperaron únicamente 10ml de muestra hidrolizada, sin embargo, se asume que se tomó toda la muestra dentro del frasco Schott. Por lo tanto, este valor debe de ser de **86.73ml**

Dilución: Coeficiente de dilución =  $\frac{Volumen_{muestra} + Volumen_{añadido\ de\ diluyente}}{Volumen_{muestra}}$

### Determinación de proteína total

Reactivos: Reactivo de Bradford, albumina,

1. Preparar una dilución de 100µg/ml de albumina en agua destilada.
2. Realizar una curva de calibración con reactivo de Bradford de la siguiente manera:

	Blanco	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
<b>H2O</b>	100µL	90 µL	80 µL	70 µL	60 µL	40 µL	30 µL	20 µL	10 µL	-
<b>Patrón</b>	-	10 µL	20 µL	30 µL	40 µL	60 µL	70 µL	80 µL	90 µL	100 µL
<b>R. Bradford</b>	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

<b>Total</b>	1.1ml	1.1ml	1.1ml	1.1ml	1.1ml	1.1ml	1.1ml	1.1ml	1.1ml	1.1ml
<b>[proteína]</b>	0µg/ml	10µg/ml	20µg/ml	30µg/ml	40µg/ml	60µg/ml	70µg/ml	80µg/ml	90µg/ml	100µg/ml

3. Se puede realizar en microplaca o en tubos eppendorf. Agitar bien y esperar 2-3 min.
4. Leer absorbancia de cada punto a 595nm.
5. Realizar una regresión lineal  $DO_{595nm}$  vs [proteína] y comprobar  $R^2 > 0.98$
6. Teniendo la curva de calibración, toma 100 µL de hidrolizado ácido, añade 1ml de reactivo de Bradford y registra DO a 595nm.
7. Calcula la concentración de proteína disuelta utilizando la curva de calibración previa.

**Reactivo de Bradford,**

- i. Disolver 5 mg de azul de Comassie en 2.5 ml de Etanol al 96 %.
- ii. Añadir 5 ml de ác. ortofosfórico 85 %.
- iii. Diluir hasta 50 ml con H<sub>2</sub>O destilada.
- iv. Dejar reposar 24 h en oscuridad y filtrar dos veces con papel de filtro o con filtros de 45 nm.

**Determinación** - **!!! conservar en botella oscura no más de 15 días !!!!**

1. Llevar a peso constante 1 crisol de porcelana. Registrar el peso.
2. Añadir 1g de muestra clarificada al crisol.
3. Colocar en mufla a 545°C durante 4 horas.
4. Retirar de la mufla y dejar enfriar en un desecador (**OJO:** mantener el desecador con una ligera abertura, de lo contrario la presión botará la tapa).
5. Pesar nuevamente el crisol.
6. Registrar la cantidad de cenizas como la diferencia entre el último peso con el del crisol solo a peso constante.

**Determinación de holocelulosa**

$$Holocelulosa(g) = \text{Peso}_{\text{muestra clarificada}}(g) - [\text{proteína}] * V_{\text{hidrolizado}} - \text{Peso}_{\text{lignina insoluble}}(g)$$

$$\%Holocelulosa = \frac{Holocelulosa(g)}{2.5g}$$

$$\%Proteína = \frac{[\text{proteína}] * V_{\text{hidrolizado}}}{2.5g}$$

$$\%Lignina Insoluble = \frac{Holocel\text{Peso}_{\text{lignina insoluble}}(g)}{2.5g}$$

**Determinación de α-, β- y γ-celulosa**

1. Preparación de la muestra

Reactivos: NaOH 17.5%,

- I. Pesar 1.5g de muestra blanqueada y colocar en vaso de precipitado de 250mL.
- II. Agregar 75ml de 17.5% NaOH (Registrar el tiempo en el que se añadió)
- III. Agitar en placa de agitación y mosca hasta que esté completamente dispersa la muestra.

- IV. Detener la agitación y remover la muestra adherida a las paredes con una varilla de vidrio.
- V. Agregar 25ml de 17.5%NaOH. (Aforo de 100mL)
- VI. Agitar con varilla de vidrio y colocar en baño maría a 25°C (o bien dejar a temperatura ambiente si se controla el aire acondicionado).
- VII. Tras 30 min de la primera adición de NaOH, agregar 100ml de agua destilada a temperatura ambiente.
- VIII. Dejar reposar otros 30 minutos.
- IX. Filtra en matraz Kitasato con papel filtro. Descartar los primeros 10mL del filtrado y recuperar el resto.

## 2. Determinación de alfa-celulosa

Reactivos: 0.5N Dicromato de Potasio, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (concentrado) , sulfato de amonio férrico, ferroina.

- I. En otro matraz de 250mL, pipetear 25mL del filtrado y agregar 10mL de 0.5N Dicromato de Potasio. Agregar cuidadosamente, mientras se agita (con la mano) el matraz, 50mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Deja reposar durante 15 min.
- II. Pasados los 15 min. Agregar 50mL de agua destilada y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- III. Agregar 2-4 gotas de indicador de ferroina.
- IV. Utilizando una bureta, valorar con 0.1N sulfato de amonio férrico hasta color morado. (Registrar el volumen de sulfato de amonio férrico añadido).
- V. Realiza una valoración en blanco, sustituyendo el filtrado por 12.5ml 17.5%NaOH y 12.5mL de agua destilada. (Registrar el volumen de sulfato de amonio férrico añadido).

$$\text{Alpha} - \text{celulosa}\% = 100 - \frac{6.85 * (V_2 - V_1) * N * 20}{A * W}$$

Donde:

V<sub>1</sub>= Volumen de valoración de la muestra (mL).

V<sub>2</sub>= Volumen de valoración del blanco (mL).

N= Normalidad de la solución de sulfato amonio férrico (N). (0.1N en este caso).

A= Volumen de muestra valorada (mL). (25mL en este caso).

W= Peso en seco de la muestra (g). (1.5g menos la humedad)

## 3. Determinación de gamma-celulosa

Reactivos: 0.5N Dicromato de Potasio, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (concentrado) , sulfato de amonio férrico, ferroina.

- I. Pipetea 50mL del filtrado previo en un matraz de 100mL. Agrega 50mL de 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- II. Calienta el matraz en baño maría (70-90°C) durante 10 min. Deja reposar durante unas horas (toda la noche de preferencia).
- III. Decanta el sobrenadante con cuidado (filtra si es necesario).
- IV. En un matraz de 500ml, colocar 50mL de sobrenadante y 10mL de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Agregar cuidadosamente 90mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Dejar reposar durante 15min.
- V. Agregar 2-4 gotas de indicador de ferroina.
- VI. Utilizando una bureta, valorar con 0.1N sulfato de amonio férrico hasta color morado. (Registrar el volumen de sulfato de amonio férrico añadido).
- VII. Realiza una valoración en blanco, sustituyendo el filtrado por 12.5ml 17.5%NaOH, 12.5mL de agua destilada y 25mL de 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. (Registrar el volumen de sulfato de amonio férrico añadido).

$$\begin{aligned} \text{Gamma celulosa}\% &= ([6.85 * (V_2 - V_1) * N * 20]/(25 * W)) \\ \text{Beta celulosa} &= 100 - (\%alfa\text{ celulosa} + \%gamma\text{ celulosa}) \\ \%Celulosa\ total &= \%alpha + \%beta + \%gamma \end{aligned}$$

### **Determinación de hemicelulosa**

$$\%Hemicelulosa = \%HoloCelulosa - \%CelulosaTotal$$

## **Anexo 2. Protocolo para re-suspensión de *Cellulomonas flavigena* en sustrato sólido, determinación de crecimiento mediante a microgoteo y actividad CMCasa.**

**Resumen:** Con el fin de evaluar el crecimiento de *Cellulomonas flavigena* y su capacidad endoglucanasas en sustrato sólido, se hará un tratamiento a una muestra del cultivo. Se realizará una suspensión de la muestra, con una relación sólido a líquido de 1:9, en una solución de Tween80 0.1%. Se calculará el crecimiento mediante a la técnica de microgota en cajas Petri con agar CMC+MMM. La actividad CMCasa se determinará mediante a la prueba de hidrólisis enzimática de CMC.

### Reactivos

- Solución CMC 1% ( $1g_{cmc}/100g_{buffer\ acetato}$ )
- Buffer citrato 0.05M pH4.8
- DNS
- Tween80 0.1%

### Materiales

- Matraz Kitasato
- Embudo Buchner

### Equipos

- Centrifuga
- Refrigerador
- Espectrofotómetro.

### **Resuspensión de la biomasa.**

1. Colocar 5gr de muestra sólida (sustrato + biomasa) en un tubo falcon de 50mL.
2. Agregar 45mL de Tween80 0.1%, pH 4.8.
3. Vortexear durante 30s y mantener en agitación durante 10min.
4. Tomar 10mL de sobrenadante y realizar 3 diluciones seriales (1:10, 1:100, 1:1000) diluyendo con Tween80 0.1mL.
5. En la parte inferior de un Petri con agar CMC+MMI, hacer 9 separaciones con 2 líneas verticales y 2 horizontales, como se muestra en la figura 1.
6. Colocar 3 gotas de cada dilución en distintos espacios, de manera que quede 1 gota por cada separación. Nuevamente referir a la figura 1.

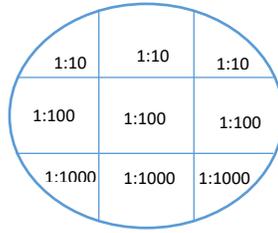


Figura 1. Esquema de Petri.

7. Incubar a 37°C durante 3 días.
8. Hacer un conteo de colonias en cada espacio.
9. Registrar como crecimiento aquella que sea visiblemente más sencilla de contar.
10. Reportar:

$$\text{Crecimiento} \left( \frac{\text{colonia}}{g_{\text{medio}}} \right) = \frac{\# \text{colonias} * \text{factor}D * 45\text{mL}}{5g * 10\text{ml}}$$

### Determinación de actividad endoglucanasa.

1. Tomar el resto de la muestra (35mL + 5g) y filtrar en matraz Kitasato y embudo Buchner con papel filtro. Recuperar el líquido filtrado.
2. Centrifugar el líquido filtrado a 10,000 RFC (fuerza centrífuga relativa) durante 20min.  $[RFC = 1.12 * \text{radio} * (RPM)^2]$
3. Del sobrenadante, realizar diluciones seriales (con buffer acetatos) de 1mL total en tubos eppendorf de la siguiente manera:

Dilución	-	<b>1:10</b>	<b>1:100</b>	<b>1:1000</b>	<b>Blanco</b>
Sobrenadante	1000µL	100µL	10µL	1µL	0
Buffer	0	900µL	990µL	999µL	1000µL
Total	1000 µL	1000µL	1000µL	1000µL	1000µL

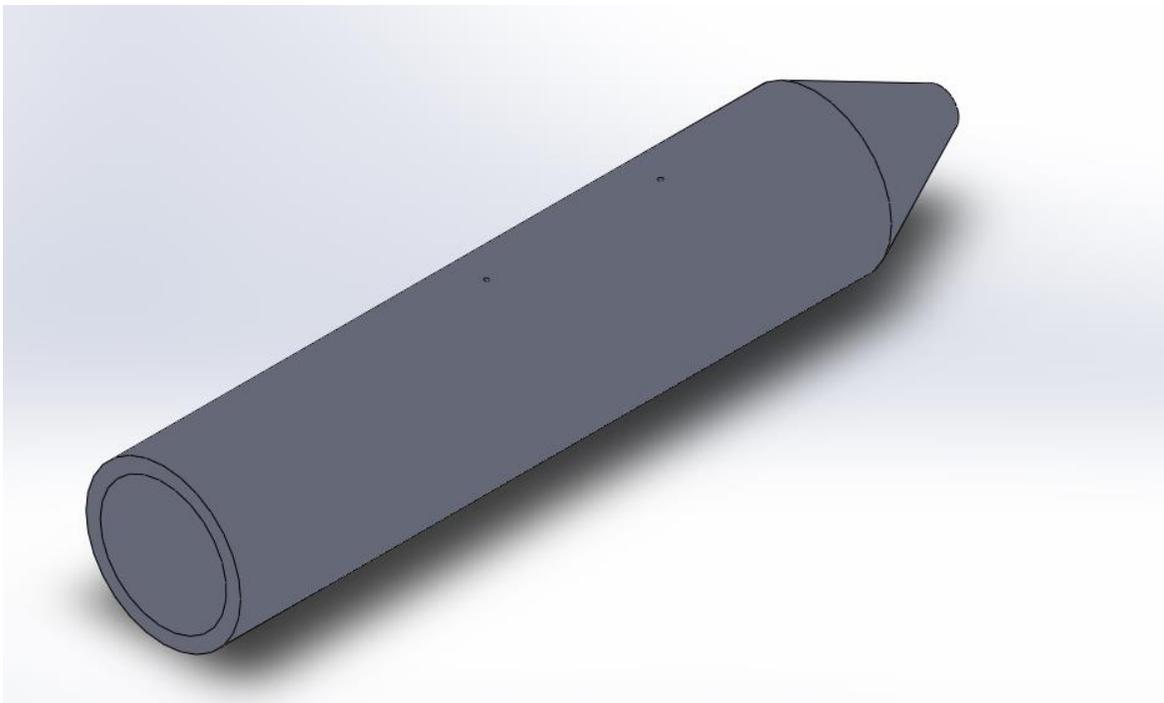
4. Tomar 500µL de cada dilución y colocar en un nuevo tubo eppendorf. Agregar 500µL de una solución 1% (w/w) de CMC. Incubar a 50°C durante 10min.
5. Detener la reacción colocando los tubos eppendorf en hielo.
6. En otro tubo eppendorf, agregar 100µL de cada producto enzimático y agregar 100µL de DNS.
7. Colocar a 90°C durante 5min.
8. Aforar cada tubo a 1mL y leer DO<sub>575nm</sub>
9. Registrar la concentración de glucosa en cada tubo utilizando una curva de calibración de azúcares reductores vs DO (realizada previamente).
10. Reportar actividad endoglucanasa:

$$\frac{U}{g} = \frac{\mu\text{mol}_{\text{glucosa}} * \text{Factor}D * 45\text{mL}}{5\text{min} * 0.1\text{mL} * 5g}$$

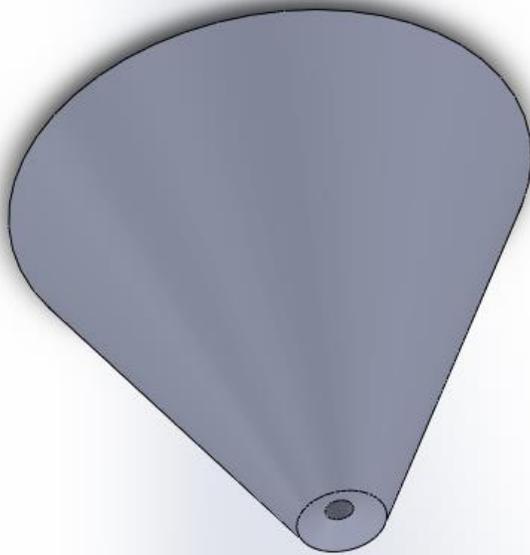
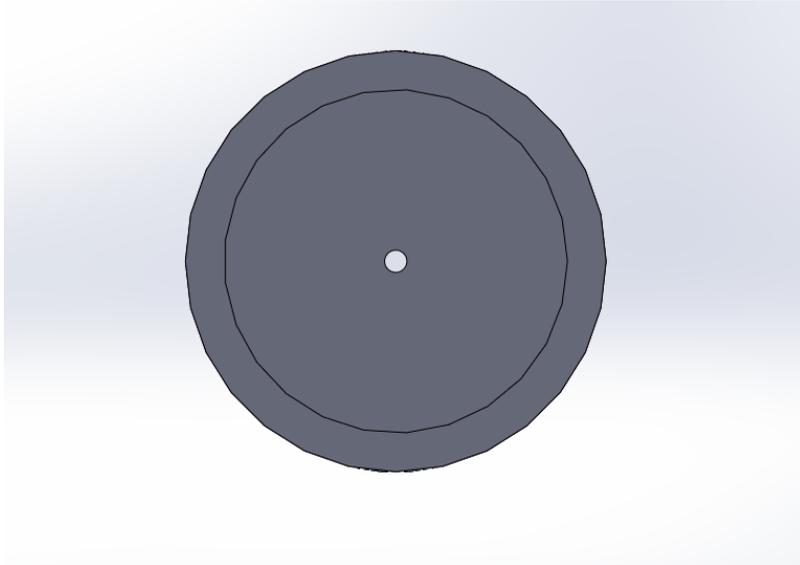
11. Diluir 1:2 el extracto enzimático sobrante en buffer acetato 0.05M pH4.8. Refrigerar.

### Anexo 3. Diseños 3D de BLPR hechos en AUTOCAD

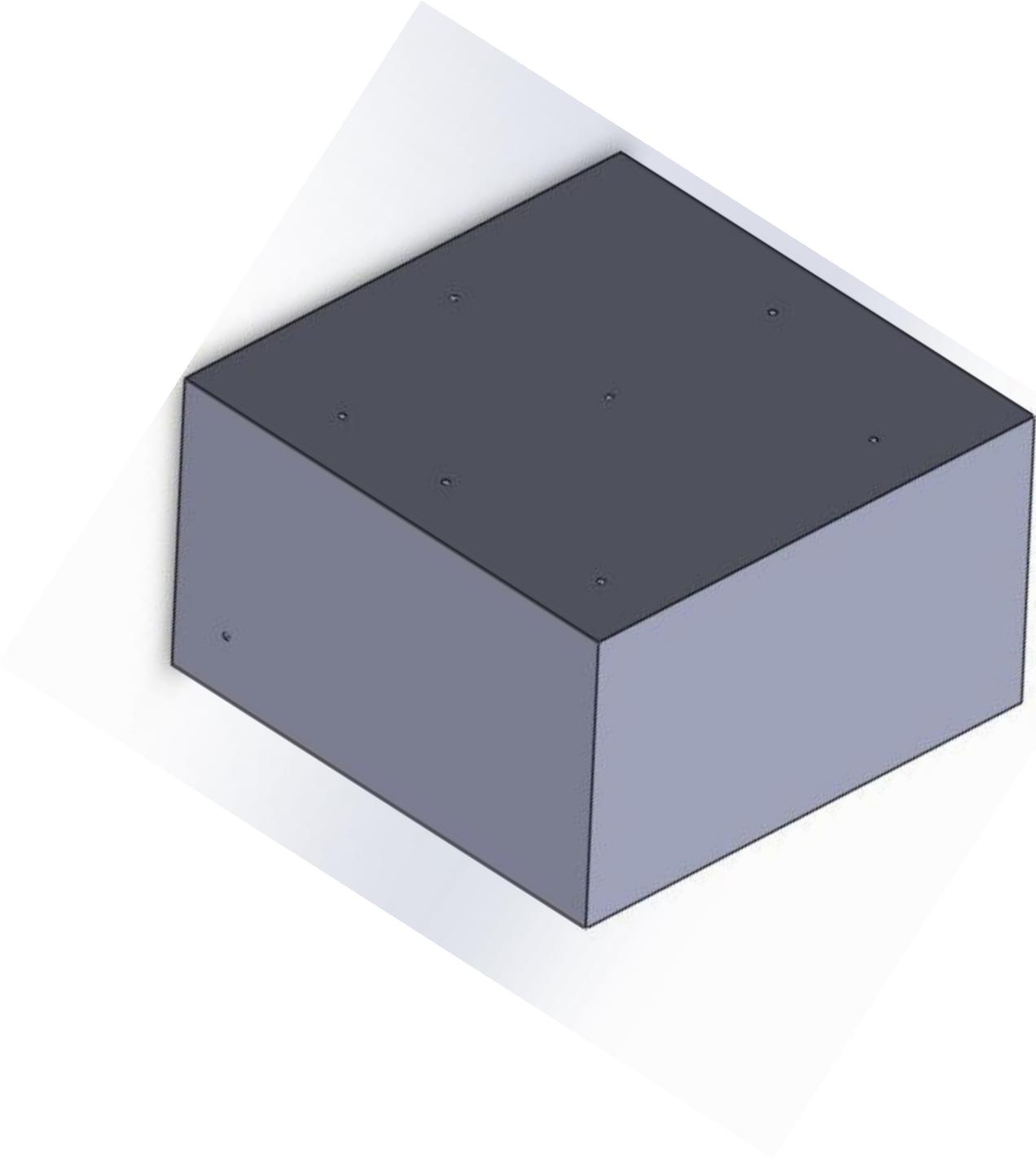
Columna



Cono inferior.



Reservorio



Tapa.

