



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS**

Presentada para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

por

Omar Cortés De Luna  
Ingeniero Biotecnólogo

Producción de polihidroxibutirato (PHB) con un cultivo mixto fotoheterotrófico.

Dirigida por

Dra. Elvia Inés García Peña  
Dra. Tatiana Timoshina Lukianova

México, D.F. 26 de Enero de 2016

# Acta de revisión de Tesis



SIP-14-BIS

## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12 horas del día 25 del mes de Enero del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

Producción de polihidroxibutirato (PHB) con un cultivo mixto fotoheterotrófico

Presentada por el alumno:

Cortés  
Apellido paterno

De Luna Omar  
Apellido materno

Nombre(s)

Con registro: 

A	1	4	0	3	6	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Envia Ines García Peña

Dra. Tatiana Yuzefina Lukianova

Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos



Dr. Edgar Saigado Manjarez

Dr. Jorge Isaac Charez Oña

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL  
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Ramón Villanueva Arca

## Declaración de originalidad

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional

Presente

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Omar Cortés De Luna (se anexa copia simple de identificación oficial), manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada "Producción de polihidroxibutirato (PHB) con un cultivo mixto fotoheterotrófico", en adelante "La Tesis" y de cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo al Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales (Publicación en línea de la tesis en el repositorio Institucional) "La Tesis" por un periodo de 6 meses contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis"

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México D.F., 25 de Enero de 2016

Atentamente

IBT. Omar Cortés De Luna

# CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita



Dra. Elvia Inés García Peña



IBT, Omar Cortés De Luna  
Vo. Bo.



Dra. Tatiana Timoshina Lukianova

## Resumen

La producción de PHAs (polihidroxicanoatos) y en especial de su monómero PHB (polihidroxi-butarato), es de interés debido a su alto valor agregado. Particularmente, resultaría de cierto interés obtenerlas industrialmente con el uso de microorganismos, ya sean cultivos puros o consorcios microbianos creciendo en distintos tipos de sustratos. Los PHAs son comúnmente utilizados por sus propiedades, ya que poseen características similares a las de diversos termoplásticos sintéticos, tales como polipropileno. Además, tienen la ventaja de que pueden ser sintetizados y degradados por varios microorganismos, por lo que se han estudiado las propiedades térmicas y de miscibilidad de los PHB. Entre los organismos que son capaces de sintetizar los PHB se encuentran los cultivos mixtos fototróficos. A pesar de sus grandes ventajas sobre los materiales sintéticos, el costo de su producción del polímero por fuentes microbianas aún puede ser muy superior a la de plásticos sintéticos. Debido a lo anterior es necesario llevar a cabo investigación para desarrollar procesos de producción competitivos que sean bajos similares al de los plásticos petroquímicos. En el presente trabajo se determinó y comparó la producción de PHB con tres consorcios microbianos fototróficos. El cultivo denominado arbitrariamente como C4 produjo la mayor cantidad de PHB en peso, alcanzando una acumulación máxima de hasta 44%. El PHB producido por este consorcio presentó una masa molecular promedio de 1313m/z, ligeramente superior a la del PHB comercial. Este consorcio fototrófico C4 fue caracterizado en cuanto a su composición microbiana determinando que está compuesto por un 60% de poblaciones productoras del polímero.

Mientras que el polímero obtenido por el consorcio C2 es muy cristalino lo que le brinda al biopolímero una mayor resistencia y conformación similar a la de los poliésteres. Sin embargo el porcentaje de acumulación del mismo fue de alrededor de un 26%, con solo un 34% de la población total como productora de PHB.

## Abstract

The production of PHAs (polyhydroxyalkanoates) and especially its monomer PHB (polyhydroxybutyrate), is of interest because its high added value. It would be interest the industrial obtaining using some microorganisms, either with pure cultures or microbial consortia growing in different types of substrates. PHAs products are of potential interest for their similar properties to various synthetic polymers such as polypropylene thermoplastics. The PHB also have the advantage that they can be synthesized and degraded by various microorganisms, because its degradability some thermal and miscibility properties have been studied. Among the microorganism that capable to synthesize PHB are phototrophic mixed cultures. Despite its great advantages over synthetic materials, the cost of production by microbial sources is still far

superior compare to synthetic plastics. In order to reduce the cost it's necessary research and develops competitive production processes. In the present work it was determined and compared the production of PHB with three phototrophic microbial consortia.

The culture known as C4 produced the most weight PHB, reaching a maximum accumulation up to 44 % of cell dry weight. PHB produced by this consortium provided an average of 1313m /z, of molecular mass slightly superior compare to commercial PHB. This phototrophic consortium named C4 was characterized to determinate, its microbial composition resulting in 60% of polymer producing populations.

While the polymer obtained by the consortium C2 is highly crystalline this gives a greater resistance similar to polyesters. However, the accumulation rate was about 26 %, with only 34 % of the total population as producers of PHB .

## **Agradecimientos**

*Agradezco al Instituto Politécnico Nacional y a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología por permitir mi formación y desarrollo como estudiante y futuro investigador, a la vez por permitirme el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.*

*A Conacyt le agradezco el soporte económico brindado durante mis estudios de posgrado.*

*Quiere agradecer especialmente al Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías por los servicios brindados para el desarrollo de este proyecto.*

*A la Dra. Inés García Peña le agradezco todo el apoyo, confianza y paciencia que tuvo durante el desarrollo de este proyecto. Su guía permitió que alcanzara una meta más en mi desarrollo profesional. Es imposible terminar de agradecerle, por lo que me permito decir que sin usted este proyecto de investigación no hubiera sido posible.*

*Agradezco también enormemente a la Dra. Tatiana Timoshina Lukianova, aprendí mucho de usted, en especial en el ámbito químico, el enfoque y aportaciones permitieron el desarrollo correcto de este proyecto, a la vez le estoy agradecido por la confianza que tuvo al aceptarme como su alumno.*

*Al Dr. Luis Torres Bustillos le agradezco todos sus comentarios, ideas y sugerencias que proporciono a lo largo de estos dos años, ya que permitieron que mejorara mi expresión y con esto el proyecto.*

*Al Dr. Edgar Salgado Manjarrez por sus comentarios siempre tan puntuales que permitieron entender mejor los resultados, lo que ayudo a ampliar y proyectar de manera correcta todos los conceptos, lo que enriqueció mis conocimientos y permitió plasmarlos de una mejor forma en el escrito.*

*Al Dr. Jorge Issac Chairez Oria por el apoyo ofrecido al proyecto de investigación y por su interés en continuar desarrollando el proyecto, me gustaría agradecer la oportunidad y confianza que me brindo al invitarme a continuar con el doctorado.*

*A Elisa Benítez Rodríguez por su apoyo incondicional durante tantos años, por soportarme en todo momento, pero en especial por quererme tanto, lo único que puedo decirte es que TE AMO y siempre contarás conmigo.*

*A Cristina Niño Navarro agradezco tu amistad, ayuda y apoyo que me has brindado durante tantos años, sin olvidar todos esos momentos recreativos llenos de gracia que permitieron llevar el trabajo diario de una forma más fácil.*

*A Víctor, Roberto, Caro, Alejandra, Yaremi, Marquito por el apoyo diario y su amistad gracias.*

*Axa a ti agradezco el que me permitieras ser tu alumno a principios de mi formación, lo que me permitió acercarme al posgrado, tus consejos que permitieron entender y sobrellevar algunas cosas y por último sin menos preciarla tu gran amistad.*

*Finalmente a mis Padres Raymundo Cortés y Verónica De Luna agradezco su apoyo y amor incondicional sin ustedes no podría logrado todo lo que tengo hasta ahora, a mi hermana Vania Cortés le agradezco aquellos momentos de gracia que tuvimos durante estos años, me permitieron olvidarme de muchas preocupaciones, aunque muchas veces me generaste otras, sabes que siempre contarás conmigo y yo contigo.*



# Contenido

1. Introducción.....	1
1.1. <i>Marco Teórico</i> .....	1
1.1.1. Polihidroxicanoatos (PHA) y Polihidroxibutirato (PHB) .....	1
1.1.2. Sustratos .....	2
1.1.3. Microorganismos productores de PHB.....	3
1.1.4. Parámetros de operación.....	5
1.1.5. pH.....	5
1.1.6. Concentración de fuente de nitrógeno y fuente de fosfatos.....	5
1.1.7. Metabolismo .....	6
1.1.8. Aplicaciones.....	7
1.2. <i>Técnicas analíticas y de caracterización</i> .....	8
1.2.1. MALDI-TOF .....	8
1.2.2. Microscopía CONFOCAL.....	8
1.2.3. Microscopía de Barrido de alta resolución .....	9
1.3. <i>Antecedentes</i> .....	9
1.4. <i>Problemática</i> .....	11
1.5. <i>Justificación</i> .....	11
1.6. <i>Objetivos</i> .....	12
1.6.1. General.....	12
1.6.2. Específicos .....	12
2. Metodología .....	13
Estrategia Experimental.....	13
2.1.1. Reactivación, crecimiento del cultivo y producción del polímero .....	13
2.1.2. Extracción de PHB .....	13
2.1.3. Predicción del sistema.....	14
2.2. <i>Técnicas Analíticas</i> .....	15
2.2.1. Producción de Biomasa .....	15
2.2.2. Consumo de sustratos .....	15
2.2.3. Microscopía confocal .....	16
2.2.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	16
2.2.5. Difracción por rayos X (DRX).....	16
2.2.6. MALDI-TOF .....	16
3. Resultados y discusión.....	18
3.1. <i>Evaluación del efecto del tipo de sustrato sobre el crecimiento de los consorcios microbianos fotoheterotróficos</i> .....	18
3.2. 21	
3.3. <i>Balance elemental para describir el crecimiento, producción de hidrógeno y PHB</i> .....	21
3.4. <i>Caracterización del polímero</i> .....	30
3.4.1. Microscopía Confocal.....	30
3.4.2. MALDI-TOF .....	34
3.4.3. DRX.....	38
3.4.4. Microscopía electrónica de Barrido .....	43
3.5. <i>Análisis de las poblaciones al final del proceso</i> .....	45
4. Conclusiones.....	47
5. Referencias .....	48

## Índice de Figuras

Figura 1 Poblaciones en el Consorcio C2.....	10
Figura 2 Poblaciones en el Consorcio C4.....	10
Figura 3 Poblaciones en el Consorcio C5.....	11
Figura 4. Evolución de la concentración de biomasa de los consorcios microbianos con acetato. .....	18
Figura 5. Evolución de la concentración de biomasa de los consorcios microbianos con acetato.butirato. ....	19
Figura 6. Evolución de la concentración de biomasa de los consorcios microbianos con mezcla de Acetato-Butirato.....	20
Figura 7. Efecto de la concentración de acetato sobre el crecimiento de PHB. ....	23
Figura 8. Efecto de la concentración de butirato sobre el crecimiento de PHB. ....	23
Figura 9. Efecto de la combinación acetato-butirato sobre la formación de PHB.....	24
Figura 10 Evaluación de la Biomasa y Consumo de sustrato de C2.....	25
Figura 11 Evaluación de la Biomasa y Consumo de sustrato de C4.....	26
Figura 12 8 Evaluación de la Biomasa y Consumo de sustrato de C5.....	26
Figura 13 Efecto del Medio B sobre el crecimiento del consorcio C2.....	28
Figura 14 Efecto del Medio B sobre el crecimiento en medio de acumulación del consorcio C2. .....	29
Figura 15 Efecto del Medio B sobre el crecimiento del consorcio C4.....	29
Figura 16 Efecto del Medio B sobre el crecimiento en medio de acumulación del consorcio C4. .....	30
Figura 16 Barrido de 425nm a 721nm para autofluorescencia .....	31
Figura 17 Vacuolas de acumulación del polímero después de en el consorcio C2 dos días en medio de acumulación a 63x 561nm.....	32
Figura 18. Vacuolas de acumulación del polímero después de 8 días en medio de acumulación a 63x 561nm .....	32
Figura 21 Consorcio C4 dos días en medio de acumulación a 63x 561nm.....	33
Figura 22. Consorcio C4 ocho días en medio de acumulación a 63x 561nm.....	34
Figura 23 Estructura monomérica de PHB obtenida a partir del consorcio C2.....	35
Figura 24 Fragmentos de 102 m/z correspondientes a la adición de una unidad monomérica mediante MALDI-TOF .....	35
Figura 25 Estructura Dimérica de PHB obtenida a partir del consorcio C4 .....	36
Figura 26 Fragmentos de 172 m/z correspondientes a la adición de unidades diméricas mediante MALDI-TOF .....	37

Figura 27 Fragmentos de 102 y 172 m/z correspondientes a la adición de unidades monoméricas y dimericas mediante MALDI-TOF .....	37
Figura 28 Fragmentos de 102 y 172 m/z correspondientes al PHB comercial mediante MALDI-TOF.....	38
Figura 29 Cromatogramas de cristalinidad del PHB a partir del consorcio C2 .....	39
Figura 30 Porcentaje de Cristalinidad de PHB del consorcio C2 .....	40
Figura 31 Cromatogramas de cristalinidad del PHB a partir del consorcio C4 .....	40
Figura 32 Porcentaje de Cristalinidad de PHB del consorcio C4 .....	41
Figura 33 Cromatogramas de cristalinidad del PHB a partir del consorcio C5.....	42
Figura 34 Porcentaje de Cristalinidad de PHB del consorcio C5 .....	43
Figura 35 Morfología de polímero Microscopia a 1000 X.....	44
Figura 36 Morfología de polímero Microscopia a 10,000 X.....	45
Figura 37 Poblaciones Finales consorcio C2.....	46
Figura 38 Poblaciones Finales consorcio C4.....	46

## Índice de Tablas

Tabla 1. Evaluación de tres consorcios en acetato.....	20
Tabla 2. Evaluación de tres consorcios en butirato-acetato.....	20
Tabla 3. Medio actual. ....	21
Tabla 4. Variaciones en la concentración de nitrógeno.....	22
Tabla 5 % PHB en los consorcios C2, C4 y C5 .....	27
Tabla 6 Porcentaje de PHB recuperado a partir del medio de acumulación .....	30

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de plásticos derivados del petróleo se ha ido incrementando en los últimos años de forma significativa. Esto se debe a la amplia gama de usos que se le da en todas las actividades cotidianas de la humanidad. Sin embargo, sus costos han ido en aumento por el uso de recursos no renovables, así como por el manejo de residuos debido a su baja biodegradabilidad. Dado lo anterior hoy en día se ha planteado la búsqueda y el uso de alternativas de producción de plásticos más sustentables como son los polihidroxicanoatos (PHAs), dentro de los cuales destacan los polihidroxibutiratos (PHB), que tienen la capacidad de remplazar el uso de plásticos derivados del petróleo (Bingqing Wang, 2012)

Los polihidroxicanoatos (PHBs) son biopolímeros que acumulan una gran diversidad de microorganismos como una reserva intracelular de energía y fuente de carbono, permitiéndolo que las células microbianas puedan sobrevivir en condiciones de estrés. (Emma Zribi-Malaloul, 2013). Sin embargo el costo de los productos derivados de PHB es diez veces mayor que el de los productos obtenidos a partir de polietileno, debido a sus altos costos de producción derivados de sus gastos de operación. En la búsqueda de la reducción de los costos de producción, se han comenzado a emplear cultivos mixtos bacterianos y sustratos de bajo costo como los ácidos grasos volátiles, entre los que destacan el ácido acético y butírico (Qinxue Wen, 2010)

Algunas de las bacterias capaces de producir PHB a partir de ácidos orgánicos son las bacterias púrpuras no sulfurosas, dentro de las que destacan *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodopseudomonas palustris*. Estas bacterias son capaces de ganar electrones y protones mediante la degradación de ácidos orgánicos y generar ATP a partir del fotosistema, permitiendo acumular PHB y producir H<sub>2</sub> (Siang Chen Wu, 2012).

### 1.1. Marco Teórico

#### 1.1.1. Polihidroxicanoatos (PHA) y Polihidroxibutirato (PHB)

La familia de los PHA son polímeros biodegradables de naturaleza lipídica que se acumulan en el citoplasma de algunos microorganismos. Los PHA son productos de la polimerización y condensación de unidades monoméricas, los cuales se pueden dividir en dos: Los de cadena corta que son aquellos con 3 a 5 átomos de carbono en su cadena, dentro de los cuales se encuentran 3-hidroxipropionato (3HP), 3-hidroxibutirato (3HB), 4-hidroxibutirato (4HB) y 3-

hidroxivalerato (3HV); mientras que los PHA de cadena media contienen de 6 a 14 átomos de carbono en su cadena (De-Chuang Meng, 2012)

Los PHAs tienen propiedades químicas y físicas similares a los plásticos convencionales, además de su biodegradabilidad y biocompatibilidad, lo que les otorga el potencial de reemplazar los plásticos a base de petróleo (Frandidho, 2013). Uno de los primeros tipos de PHAs descubiertos fueron los PHBs mismos que han sido ampliamente estudiados, además se ha encontrado que los PHBs tienen de una amplia aplicación como materiales biomédicos para su uso quirúrgico, como soporte de implantes de tejido, dispositivos de administración de fármacos, así como para empacar alimentos (Wendland, 2005)

Además los PHB tienen la ventaja de que pueden ser naturalmente sintetizados y degradados por varias especies microbianas (Moita, 2014). También se ha encontrado que este biopolímero es insoluble en agua, resistente a la luz ultravioleta e impermeable para el oxígeno (Aarthi. N, 2011). Es por estas características que hoy en día los PHBs se consideran un producto de interés con un alto valor comercial, actualmente se producen usando cultivos puros y sustratos refinados como son glucosa, fructosa o sacarosa, bajo condiciones de esterilidad. Sin embargo, para poder competir con los precios bajos de los plásticos petroquímicos, se requiere mayor cantidad de investigación y evaluación enfocada principalmente en el uso de sustratos alternos de bajo costo, así como en emplear cultivos mixtos que permitan que los costos de producción de los PHAs puedan reducirse para ser competitivos, ya que las evaluaciones económicas muestran que los gastos en la producción de PHA pueden ser reducidos en más de la mitad mediante el uso de fuentes renovables tales como residuos y lodos activos ya que el costo de los sustratos antes mencionados llega a representar hasta el 50% del costo total de la producción de PHB (Reis, 2003; Vasco, 2010).

Además el costo del PHB también dependerá de las condiciones de fermentación (temperatura, aereación, pH), así como del proceso de recuperación y purificación, entre otras condiciones fisiológicas (Naranjo, 2013). Aunado a estos parámetros se reporta que la concentración de nitrógeno y fósforo también determinarán la cantidad de PHB que se acumulará durante el cultivo de los distintos microorganismos productores de este compuesto (Hustede, 1993). Debido a lo anterior se presentan a continuación algunos aspectos relevantes durante la producción de PHB.

### 1.1.2. Sustratos

Diversas compañías dedicadas a la producción de polímeros como Cargill Dow Polymers, Imperial Chemical Industries, así como la industria brasileña utilizan sustratos como el maíz, azúcar y sacarosa respectivamente para la producción de biopolímeros, sin embargo el costo de los polímeros obtenidos a partir de estos sustratos es elevado, alcanzando un aproximado de 5 USD/Kg de biopolímero en comparación a los productos derivados del petróleo, los cuales no superaran 1 USD/Kg. Considerando este aspecto diversas investigaciones se llevan a cabo actualmente con el objetivo de utilizar fuentes de carbono más económicas, que representan una disminución considerable en el costo del polímero, afectando de forma positiva los costos totales de producción y con ello lograr competir con la industria plástica actual (Gil et al, 2007; Choi & Lee, 2011; Bingqing Wang, 2012).

Uno de los aspectos más relevantes que puede impactar tanto la concentración del polímero es el tipo de fuente de carbono, por lo que este aspecto sigue siendo frecuentemente explorado. Distintas investigaciones muestran que se pueden usar una gran diversidad de sustratos para la producción de PHB, entre los cuales destacan aguas residuales y residuos orgánicos, por sus bajos costos. Además se sabe que a partir de estas fuentes de carbono y durante el proceso de fermentación anaerobia se obtiene distintos productos de interés como PHA, metano e hidrógeno. Durante el proceso de fermentación anaerobia el 70% del sustrato es empleado en la formación de ácidos grasos volátiles (AGV), tales como ácido acético y butírico, mismos que pueden ser utilizados y polimerizados en PHA por las bacterias, en condiciones limitantes de componentes esenciales para el crecimiento como son las fuentes de nitrógeno, fósforo, sulfuro, oxígeno y la presencia en exceso de una fuente de carbono (Kumar, 2004).

El acetato es uno de los sustratos más reportados en la literatura que permiten el almacenamiento de PHAs, con una producción mayor al 65% de polímero con respecto al peso seco de la biomasa, sin embargo la relación estequiométrica es mayor para el butirato, debido a que su estructura tiene una mayor cantidad de átomos de carbono, lo que supone rendimientos superiores sustrato/producto ( $Y_{s/p}$ ) (Katja Johnson, 2009). El butirato es un sustrato interesante para la producción del biopolímero por dos razones. Primero, por sus altos rendimientos teóricos. Los rendimientos estequiométricos de PHA al utilizar el butirato como sustrato están cerca de 0.94 Cmol/Cmol, lo que implica un rendimiento 40% mayor al que se puede obtener con acetato. En segundo lugar, el butirato es producido en grandes cantidades durante la fermentación acidogénica de residuos. (Marang, 2013)

### 1.1.3. Microorganismos productores de PHB

Una gran variedad de géneros bacterianos tienen la capacidad de acumular PHA de forma natural, dentro de esto se incluyen bacterias Gram positivas y negativas, y algunas especies del dominio Archaea. En total existen más de 75 géneros bacterianos capaces de acumular estos polímeros, algunos microorganismos productores de PHA son *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida* y *Bacillus spp* (Yu-Hong Wei, 2011)

En microorganismos tales como *Cupriavidus* y *Pseudomonas*, se observó la capacidad de acumular y utilizar PHA, este tipo de compuesto permite que las células tengan una mayor capacidad de supervivencia al estrés oxidativo y térmico (Lopez et al, 2009). Dentro de los cultivos puros *Plasticumulans acidivorans* ha sido reportada como una cepa hiper-productora alcanzando hasta un 89% en peso seco de PHA a partir de acetato en 7.6 horas, ya que tiene alta especificidad por AGVs, incluyendo el butirato.

Se han encontrado otros microorganismos como *R. sphaeroides* que son capaces de utilizar AGVs como sustrato y de captar energía de la luz, lo cual es conocido como fototrófia. Este mecanismo les permite usar la luz como fuente energía para la generación de ATP (fotofosforilación). Al utilizar los AGVs que son un subproducto de la digestión anaerobia otorgan una ventaja competitiva. Los microorganismos fototróficos presentan comportamientos fisiológicos interesantes en ausencia de nitrógeno, ya que la enzima nitrogenasa se activa permitiendo producir hidrógeno y acumular PHB en condiciones anaerobias (Jiang-Yu Ye, 2013).

Estas bacterias anaerobias pueden ser obtenidas a partir de una columna de Winogradsky, (denominada así en honor del microbiólogo ruso Sergei Winogradsky) que es un modelo de ecosistema que se utiliza para el estudio de los microorganismos acuáticos y de sedimentos. En la columna se desarrollan poblaciones bacterianas fotosintéticas que utilizan el sulfuro de hidrógeno como donador de electrones en su metabolismo fototrófico (Contreras, 2003)

Las bacterias fotosintéticas están divididas en 7 subgrupos, conformados por células Gram negativas, de forma esférica, espiral, bacilar o vibroide. Se organizan en agregados regulares o irregulares, unicelulares o formas filamentosas multicelulares. Presentan pigmentos fotosintéticos localizados en la membrana citoplasmática, y en varios tipos de sistemas de membrana intra-citoplasmática o en cloro somas. El color de las suspensiones celulares varía de purpura-violeta a purpura-roja, rojo-rosado, amarillo, café y verde.



En contraste a la fotosíntesis oxigénica de las cianobacterias, presentan una fotosíntesis anoxigénica, la cual es dependiente de un donador externo de electrones, como compuestos orgánicos. Durante la oxidación del sulfuro glóbulos de azufre son formados transitoriamente almacenados dentro de la célula o fuera de la célula, almacenando polisacáridos, poli-b-hidroxi-butilato y polifosfato. (Núñez-Cardona, 2003)

#### 1.1.4. Parámetros de operación

Con el objetivo optimizar la síntesis de PHA a partir de residuos o efluentes, es necesario optimizar también los parámetros de operación (Moita et al, 2012), tales como pH, concentración de sustrato, nitrógeno, fósforo, concentración de AGVs.

#### 1.1.5. pH

El pH es un factor importante en la productividad de los PHAs y en la composición de sus monómeros. Algunos estudios realizados para determinar el efecto del pH en fermentación acidogénica muestran que un pH alcalino de 9 genera altas cantidades de ácidos grasos volátiles (Chen, 2013). Serafin, 2004 reporta que en el caso de los PHAs y en específico del monómero PHB es posible alcanzar una acumulación del polímero alrededor de 27.5% y 39.8% respectivamente en cultivos mixtos de bacterias sulfato reductoras con un pH controlado entre 7 y 8.3, utilizando acetato como sustrato. En los casos en los que no se llevo a cabo el control del pH la concentración acumulada se incrementó hasta 47.5%. Los autores determinaron, al llevar a cabo el análisis del incremento de la biomasa, que a pH 7 el 44% del sustrato es empleado para energía celular y el 56% para crecimiento y acumulación del polímero. Caso contrario, al no controlar el pH y alcanzar un pH alcalino entre 8 y 9, solo 12% del sustrato fue empleado como energía y el 88% restante para crecimiento y almacenamiento celular.

#### 1.1.6. Concentración de fuente de nitrógeno y fuente de fosfatos

Los ácidos grasos volátiles pueden ser utilizados y polimerizados en PHAs utilizando bacterias, en condiciones de limitación de algún componente como el nitrógeno, fosfatos, sulfuros, oxígeno.

Wen, 2010 llevó a cabo un estudio en el que evidenció el efecto de la limitación de fósforo y nitrógeno sobre la acumulación de PHA utilizando lodos activados y residuos de una cervecera como sustrato. Los autores demostraron que durante una fase de limitación de nitrógeno o de

fosfatos la acumulación de PHA se ve afectada por la relación C:P o C:N. También evidenciaron que la limitación en la fuente de fosfatos fue menos efectiva en la formación de PHB, al limitar el cultivo en una fuente de nitrógeno se demostró que fue posible alcanzar una acumulación del polímero del 59%.

Con el fin de desarrollar de sistemas de producción de PHA se han realizado estudios en los que se utilizan cultivos mixtos microbianos compuestos principalmente por bacterias fotosintéticas tales como *Rhodospseudomonas palustris*. En dichos estudios se demuestra que los cultivos en dos fases pueden constituir una buena alternativa para favorecer la acumulación intracelular del polímero, la primera fase será una rica en nutrientes y la segunda una fase de limitaciones de nitrógeno, durante los cambios de fase se promueve la competencia por el sustrato (acetato), así como el consumo del mismo. La fase de limitación o ausencia total de amonio o de nitrógeno permitió alcanzar hasta un 89% del polímero en los cultivos mixtos pero estos requieren de una intensa aireación, lo que aumenta los costos de operación substancialmente. Para evitar estos costos de aireación, se ha propuesto el uso de un nuevo sistema de producción de PHA basado en el uso de microorganismos fotosintéticos facultativos en condiciones anaerobias. En el sistema fotosintético se ha encontrado la ventaja de que estos organismos pueden obtener su energía a partir de la luz, sin requerir la aireación para la producción de ATP (Fradinho et al, 2013, Johnson ., 2010)

Cuando un cultivo microbiano fototrófico es alimentado con un medio de cultivo nutritivo, la distribución de electrones se dirigirá a la producción de biomasa, y en la formación de algunos subproductos celulares, mientras que usando ácidos orgánicos como sustrato, y limitando los nutrientes la mayor parte se va a la acumulación de PHB, así como la producción de H<sub>2</sub>. Se sabe que durante la distribución de electrones pueden existir pérdidas en la formación de subproductos, los cuales no son de interés, para evitar esto es necesario el análisis de las fases de formación del biopolímero y producción de H<sub>2</sub>; se sabe que la relación entre la producción de H<sub>2</sub> y la formación de PHB es inversa, debido a que para que se produzca H<sub>2</sub> es necesaria la ausencia de fuentes de nitrógeno, mientras que para la acumulación de PHB es necesario un medio rico en fuente de carbono y limitado en fuente de nitrógeno (Yilmaz, 2010).

#### 1.1.7. Metabolismo

No solo es necesario conocer la distribución de electrones para mejorar la producción de PHB, también se debe analizar la ruta asociada al metabolismo microbiano responsable de la

producción con el objetivo de encontrar las reacciones de biosíntesis y degradación del polímero.

Se sabe que la vía biosintética para la producción de PHB consiste en tres reacciones a partir de acetil-CoA:

- a) La condensación de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA por la enzima  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa.
- b) La reducción de (R)-3-hidroxiacetil-CoA por la deshidrogenasa acetoacetil-CoA dependiente de NADPH.
- c) La polimerización de los monómeros de (R)-3-hidroxiacetil-CoA para formar poli(3-hidroxiacetato) por la polimerasa P(3HB), la cual determinará la composición del polímero resultante, así como la variación en la composición de los copolímeros.

Por lo que se puede decir que la producción de PHB dependerá de la disponibilidad de Acetil-CoA y de NADPH (Cordero, 2005).

#### 1.1.8. Aplicaciones

Los PHBs tienen un gran potencial de uso en diferentes aplicaciones incluidas aquellas que implican su uso al aire libre. En estas aplicaciones PHB estará expuesto a la luz solar y otros elementos del tiempo, como el calor y la humedad. Por lo tanto, se vuelve de gran importancia dilucidar cómo se comportará el PHB cuando se expone a estas condiciones (Sadi, et al 2010).

Con el fin de mejorar la degradación térmica y la fragilidad se han estudiado tres enfoques : 1 ) La síntesis de copolímeros , como poli ( hidroxibutirato - co - hidroxivalerato ) ( PHBV ) ; 2 ) La introducción de aditivos , como plastificantes y agentes de nucleación. 3) Las formulaciones de compuestos y mezclas basadas en PHB.

En base a estudios realizados a las propiedades térmicas y de miscibilidad de los PHBs, se encontró que las mezclas de PHB y lignina son térmicamente más estables, que el de PHB por si solo en un rango de temperatura más amplio. Los datos de FT-IR mostraron que la miscibilidad de las mezclas se asocia a las interacciones específicas de la unión del hidrógeno entre los grupos funcionales de la lignina con los grupos carbonilo de PHB.

La modificación fisicoquímica de los PHBs y propiedades de los materiales a través de la copolimerización y mezcla han demostrado, el éxito en la manipulación de estas propiedades, particularmente como bioplástico para aplicaciones ambientales (Chan, et al 2011).

El polihidroxibutirato (PHB) al tener una temperatura de fusión y procesamiento cercana a la temperatura de degradación alrededor de los 270°C, requiere de mezclas que le permitirán que la temperatura de fusión del PHB este debajo de la temperatura de descomposición térmica para hacer de este material mucho más fácil de procesar. En este sentido, la modificación de biopolímeros por mezcla tiene mayores ventajas, ya que ofrece la oportunidad de mejorar las propiedades termoplásticas, permitiéndo que el polímero se empleado en una amplia gama de productos. (Arrietaa, et al 2014).

## 1.2. Técnicas analíticas y de caracterización del polimeros

### 1.2.1. MALDI-TOF

Esta técnica de ionización, comúnmente llamada *MALDI*, fue descrita por Karas y Hillenkamp en 1988. En este método se ha convertido en una técnica analítica empleada frecuentemente para el análisis de péptidos, proteínas, lípidos etc. Su eficiencia y transferencia de energía directas durante la desorción inducida por el láser promueve la ionización de los analitos que son disueltos en una solución de un compuesto que absorbe UV, llamado matriz y colocado dentro del espectrómetro de masas. Esto permite medir los componentes con fidelidad y sensibilidad, combinándolo con un analizador de tipo *time-of-flight (TOF)* dando un sistema de alta sensibilidad. (Lewis, 2000). Esta técnica además permite conocer la estructura del monómero, el número de repeticiones del monómero o la distribución y la masa molecular promedio del biopolímero.

### 1.2.2 Microscopia CONFOCAL

Fue inventado en el año 1955 por el científico estadounidense Marvin Minsky al estudiar neuronas, este instrumento permite realizar cortes ópticos finos a muestras de tejidos más o menos gruesos y realizar reconstrucciones en tres dimensiones a partir de cortes seriados. Su mecanismo, basado en el microscopio de fluorescencia, hace posible la obtención de imágenes de la arquitectura tridimensional de células y tejidos.

Este instrumento permite enfocar únicamente un plano determinado del espécimen, eliminando la luz (fluorescencia) procedente de las regiones que no están en el plano de enfoque para ello

se necesita una fuente de luz muy potente, así como también un filtro con un agujero que se coloca en el trayecto del rayo de luz, como un rayo láser cuya longitud de onda puede estar disponible en un amplio rango de frecuencias (Semwogerere, 2005)

En el caso del proceso la técnica permite observar la acumulación del polímero de forma intracelular, lo cual se observa mediante vacuolas que muestran fluorescencia en los microorganismos.

### 1.2.3 Microscopia de Barrido de alta resolución

El primer microscopio electrónico de barrido fue desarrollado en 1930 en Alemania y en 1949 en Estados Unidos y finalmente en Inglaterra en 1950. El primer modelo comercial fue presentado en 1964 por "The Cambridge Scientific Instrument Company"; posteriormente muchos otros fabricantes han desarrollado nuevos modelos.

El principio del sistema SEM consiste en que si se hace incidir sobre la muestra un haz de electrones finamente enfocado, emite una señal que puede registrarse en una pantalla mediante un tubo de rayos catódicos. (David B. Williams, 1996).

La técnica permite observar la morfología del polímero, la porosidad del material, así como la interacción de los electrones con el material.

## 1.3. Antecedentes

En las primeras etapas del proyecto de investigación del que deriva el presente estudio se utilizaron y evaluaron tres consorcios heterotróficos aislados de ambientes naturales con el objetivo de producir hidrógeno. Estos consorcios microbianos utilizan AGVs como sustrato para producir hidrógeno, bajo condiciones de limitación de nitrógeno. Los datos obtenidos mostraron que el consorcio C2 alcanza una producción de hasta 74% (v/v) de hidrógeno, como resultado de la actividad de la enzima nitrogenasa. Durante los primeros experimentos se determinó también que existía un metabolito que se acumulaba y que no podía constituir biomasa, al explorar las características de dicho metabolito se determinó que se trataba de PHB.

En la siguiente fase del proyecto se determinó los microorganismos que se encontraban en los distintos consorcios microbianos, por lo que se mandó a secuenciar cada uno de los cultivos (C2, C4 y C5) y se obtuvieron los resultados mostrados en las Figuras 1, 2 y 3. Los resultados de secuenciación mostraron que el 29% del consorcio C2 estaba constituido por *Rhodospseudomonas palustris* microorganismo conocido por su capacidad para producir

hidrógeno, así como para el almacenamiento de PHB. Además de *Citrobacter* el cual constituye por un 12% de la población microbiana del consorcio como se observa en la Figura 1, este último también ha sido reportado como un productor del polímero.

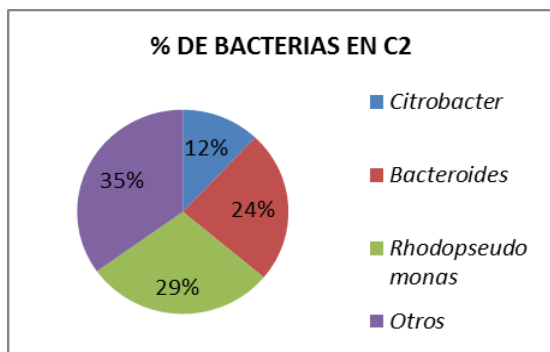


Figura 1 Poblaciones en el Consorcio C2

El consorcio C4 presento poblaciones similares a las del consorcio C2, sin embargo se determinó adicionalmente que el 8% de la población microbiana corresponde a *Dysgonomonas* que pertenecen a las clase Bacteroidea y no están reportadas como productoras de PHA pero si en la remoción de fosfatos. (Liu, 2005)

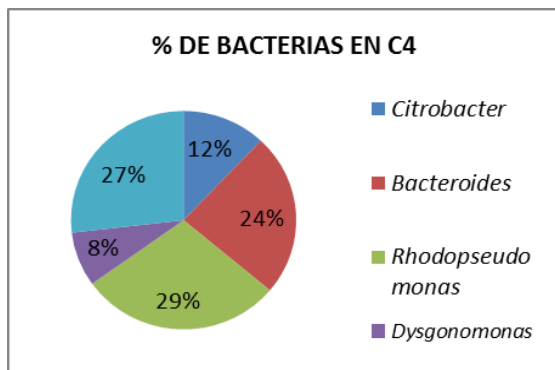


Figura 2 Poblaciones en el Consorcio C4

El consorcio C5 presento porcentajes y diferencias en los microorganismos, como se observa en la Figura 3, destacando la ausencia de *Citrobacter* y un incremento en el porcentaje de *Dysgonomonas* alcanzando hasta un 26%

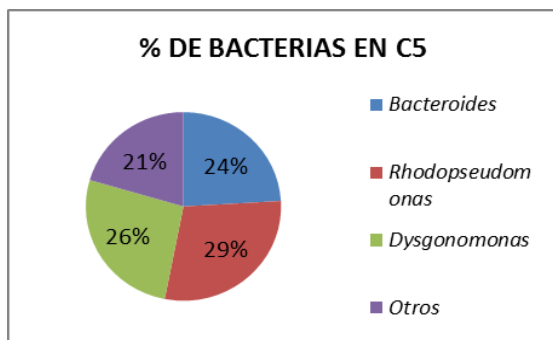


Figura 3 Poblaciones en el Consorcio C5

Los tres consorcios tienen un contenido de 24% de bacteroides los cuales están reportados como microorganismo capaces de alcanzar una acumulación de hasta un 50% de PHB en base a biomasa seca (Anderson, 1990). Estos datos sugieren que los tres consorcios son capaces de almacenar PHB.

#### 1.4. Problemática

La SEMARNAT estima que alrededor de 1kg de residuos sólidos es generado diariamente por persona en México, de los cuales mediante un estudio realizado en 2006, encontró que el 6.1% corresponden a desechos plásticos, por lo que el consumo anual por persona puede llegar a ser de 49 kg. (SEMARNAT, 2006)

Actualmente México se ubica en el primer lugar en el consumo de agua embotellada, a pesar de que la degradación de los plásticos sintéticos es muy lenta en comparación a productos orgánicos que tarda 3 ó 4 semanas, la de telas de algodón 5 meses. Mientras que la del plástico puede tardar 500 años. Además, en buena medida la “degradación” de estos plásticos simplemente genera partículas de plástico más pequeñas que, a pesar de ya no ser evidentes, se acumulan en los ecosistemas. (Daniel Segura, 2007)

Es por ello que se busca disminuir o eliminar el consumo de plásticos derivados del petróleo mediante alternativas con una mayor degradabilidad como son los biopolímeros

#### 1.5. Justificación

La producción de biopolímeros (PHB) ha tomado un papel sumamente relevante para la humanidad. Debido a que estos además de tener la posibilidad de sustituir a los poliésteres, pueden ser obtenidos a partir de cultivos mixtos fototróficos, los cuales pueden emplear AGVs como fuente de carbono y con ello eliminar los residuos de la digestión anaerobia, además de

que reducirán los altos costos de producción. Permitiendo así, obtener un producto de interés farmacológico en un sistema sustentable, que permitirá reducir las emisiones.

## **1.6. Objetivos**

### **1.6.1. General**

Identificar el potencial de producción de polihidroxibutirato de un cultivo mixto utilizando AGVs como sustrato (acetato y butirato)

### **1.6.2. Específicos**

- Texto Evaluar el crecimiento y la producción de PHB en tres consorcios microbianos utilizando dos sustratos (Acetato y Butirato) y su combinación.
- Determinar el efecto de concentraciones crecientes de acetato y butirato y mezclas (1,2g/L) sobre la producción de PHBs.
- Evaluar el efecto de distintas concentraciones de amonio (0.1 a 1g/L) sobre la producción del biopolímero.
- Evaluar el efecto de distintas concentraciones de la combinación Acetato-butirato (1:1 y 3:1) sobre la producción del biopolímero.
- Caracterización inicial del polímero.
- Determinación de poblaciones microbianas predominantes en el momento de mayor producción de polímero.



## 2. METODOLOGÍA

Esta sección se encuentra dividida en dos apartados:

- Estrategia Experimental
- Técnicas Analíticas

### Estrategia Experimental

#### 2.1.1. Reactivación, crecimiento del cultivo y producción del polímero

Se evaluarán tres cultivos mixtos fototróficos (C2, C4 y C5) tomados de una columna de Winogradsky para identificar si tienen la capacidad de producir PHB a partir de acetato. Se usó un inóculo de 15 mL de cada cultivo que fue crecido en 35 mL de medio AT, con composición siguiente:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1000 mg/L,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  500 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100 mg/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1000 mg/L,  $\text{NaHCO}_3$  3000 mg/L,  $\text{NaCl}$  1000 mg/L y Acetato de sodio 1000 mg/L.

Los experimentos se realizaron en botellas serológicas de 120 mL y se realizó un desplazamiento con argón para asegurar las condiciones de anaerobiosis. Después de dos semanas, los cultivos crecidos fueron centrifugados a 60000 rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 10 mL de medio estéril y transferida a una botella serológica con 100 mL de medio de crecimiento (medio A). La composición del medio fue:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  49.5 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  75 mg/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1000 mg/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  129.5 mg/L, acetato de sodio 2 g/L, EDTA disódico 20 mg/L y extracto de levadura 200 mg/L. Cada uno de los cultivos se mantuvo en este medio por cuatro días. Transcurrido este tiempo, la biomasa fue recuperada por centrifugación, como se describió previamente, y transferida a medio nuevo de acumulación para producción de PHB durante 8 días hasta la extracción del polímero.

El medio A se modificó agregando  $\text{K}_2\text{PO}_4$  (Medio B) como amortiguador para el control de pH y se siguió la metodología antes mencionada hasta el punto de extracción del polímero.

#### 2.1.2 Extracción de PHB

La extracción se realizó con cloroformo. Para obtener el polímero se concentró la biomasa, se colocó en papel filtro, y sometió al cloroformo en el Soxhlet durante 4 horas, se recuperó en una caja Petri donde se realizó una evaporación del solvente a 55°C, durante 24 horas.

El precipitado obtenido se pesó en una placa de Petri de vidrio previamente pesada y por diferencia de pesos se obtuvo la cantidad de polímero en la película del PHB purificado (Almeida, 2010).

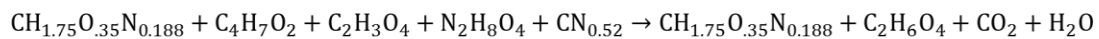
### 2.1.3 Predicción del sistema

#### Balance elemental

Con el fin de entender y poder predecir en que afecta la cantidad de sustrato o si es suficiente para que el sistema funcione en la vía deseada, es necesario utilizar un balance elemental mediante un modelo del tipo **caja negra** (John Villadsen, 2011)

El modelo del tipo caja negra nos permite manipular los flujos de entrada a fin de optimizar los rendimientos del sistema (es decir las salidas).

Biomasa+ Butirato+ Acetato+ Sulfato de amonio +Extracto de levadura->Biomasa+ PHB+ CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O



Conociendo los valores a medir se plantea la ecuación para el modelo tipo caja negra

$$E_m q_m + E_c q_c = 0$$

Donde

$E_m$  = Matriz de los medidos

$q_m$  = Matriz de los valores a insertar

$E_c$  = Matriz de los calculados

$q_c$  = Matriz a calcular

A partir de lo cual se despeja la matriz de los que deseamos calcular y se resuelve el sistema.

$$q_c = -(E_c)^{-1} E_m * q_m$$

El sistema se plantea en Wolfram Mathematica 9.0 para poder resolver la ecuación

```
qm={{Fc1},
{Fc2},
{Y},
{Ni}}; Fc1=-2/59;Fc2=-2/87;Y=-0.2/100;Ni=-0.1/19.28;
```

Donde Fc1= sustrato 1 en g/l

Fc2= sustrato 2 en g/l

Y= extracto de levadura g/l

Ni= Fuente de Nitrógeno en g/l

```
Em={{2, 4, 0, 1},
     {3, 7, 8, 0},
     {2, 2, 4, 0},
     {0, 0, 2, 0.52}}};
Ec={{1, 1, 0, 4},
     {1.75, 0, 2, 6},
     {0.34, 2, 1, 2},
     {0.188, 0, 0, 0}}_);
qc=-Inverse[Ec].(Em.qm);
qc//MatrixForm;
peso=(_{{21.822, 44, 18, 86}}_);
peso//MatrixForm;
result=qc.peso;

result//MatrixForm
```

## 2.2. Técnicas Analíticas

### 2.2.1. Producción de Biomasa

Se determinó la concentración de biomasa con un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda XLS UV-VIS mediante D.O. a una longitud de onda de 660nm, para lo cual se tomaron muestras de 1ml de los tres consorcios (C2, C4 y C5) mediante una jeringa estéril sin permitir la entrada de aire y se realizó la posterior lectura en el espectrofotómetro

### 2.2.2. Consumo de sustratos

El consumo de los AGVs (acetato y butirato) se determinó por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), utilizando un cromatógrafo marca Perkin Elmer serie 200, equipado con un detector UV vis y una columna Prevail Organic Acid 150x4.6 mm marca Grace. Como fase móvil se empleó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en solución acuosa al 0.25% y con un flujo de 500 µL/min. La longitud de onda ajustada para las mediciones fue 210 nm y el volumen de inyección fue 25µL.

### 2.2.3. Microscopia confocal

Se evidenció la acumulación del polímero en el consorcio mediante la tinción con azul nilo al 1% en solución acuosa (222550 Sigma-Aldrich), se fijo por calor el consorcio en el portaobjetos. Posteriormente, se cubrió el frotis con la solución de azul nilo y mantuvo a 55°C durante 10 minutos. Después el frotis se lavó con agua destilada para remover los excesos, se realizó otro lavado con una solución acuosa al 8 % de ácido acético durante 1 min, el frotis se dejó secar y se cubrió con un cubre objetos, con el fin de proteger la muestra del aceite de inmersión.

El Microscopio Confocal Láser de Barrido que se utilizó es de la marca Carl Zeiss modelo LSM710–NLO a 561nm al 2% y 63x (Holt, 1982, Mercedes Berlanga, 2006)

### 2.2.4. Microscopia electronica de barrido (MEB)

Se realizó el análisis morfológico del polímero, se dejó secar el polímero 48 horas a 55°C, la muestra se pulverizó, para poder fijarla y se hizo un recubrimiento con oro, se utilizó microscopio modelo JSM 7800F marca JEOL, con una resolución de 1.2 nm a 1 kV de aceleración y de 0.8 nm a 15 kV; se emplearon los detectores secundarios de uso en alto vacío (HV), y el detector de electrones retrodispersados (BSE) de estado sólido.

### 2.2.5. Difracción por rayos X (DRX)

Se analizó el porcentaje de cristalinidad del polímero, se dejó secar el polímero 48 horas a 55°C, la muestra se pulverizó, para poder fijarla, se colocó sobre un portaobjetos de silicio y se insertó en el Difractómetro de polvos Miniflex 600 de Rigaku. La identificación de la estructura del polímero se realizó mediante Sleve+ utilizando la base de datos de ICDD (The International Centre for Diffraction Data), el cálculo del porcentaje de cristalinidad se realizó con el software PDXL2 Rigaku.

### 2.2.6. MALDI-TOF

Se analizó el peso molecular y estructura principal del polímero mediante la técnica de MALDI (desorción / ionización mediante láser asistida por matriz), acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo) utilizando un instrumento autoflexTOF/TO. La matriz utilizada para los

experimentos fue (2-nitrofenil)octil éter de (SIGMA-Aldrich), las muestras fueron disueltas con 10ml de cloroformo. Y la identificación de las subunidades se realizó con la base de datos MASCOT

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Evaluación del efecto del tipo de sustrato sobre el crecimiento de los consorcios microbianos fotoheterotrofos

Se evaluaron los tres consorcios microbianos mixtos, con los que se cuenta y se sabe tienen la capacidad de utilizar acetato como fuente de carbono. Estos consorcios fueron estudiados previamente y se demostró que eran capaces de producir  $H_2$ , con distintas productividades y adicionalmente acumular PHB. Se sabe que el acetato es un sustrato que favorece crecimiento y producción de  $H_2$ , sin embargo resulta de interés conocer la capacidad de los consorcios para utilizar butirato.

Al emplear acetato como sustrato los tres consorcios (C2, C4 y C5) mostraron que podían crecer, teniendo un comportamiento muy similar como se observa en la Figura 4, sin embargo el consorcio C4 alcanzó una concentración ligeramente mayor a las 200 horas.

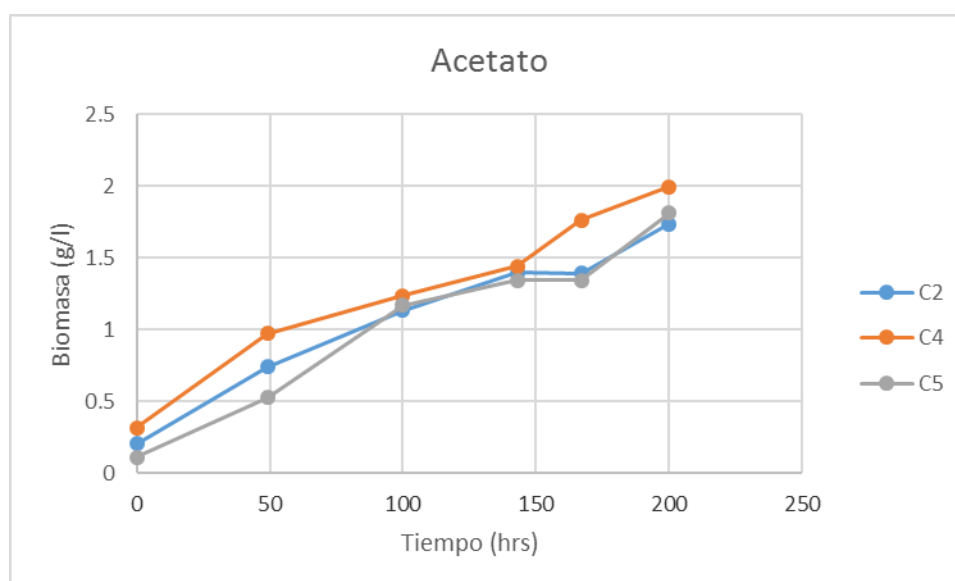
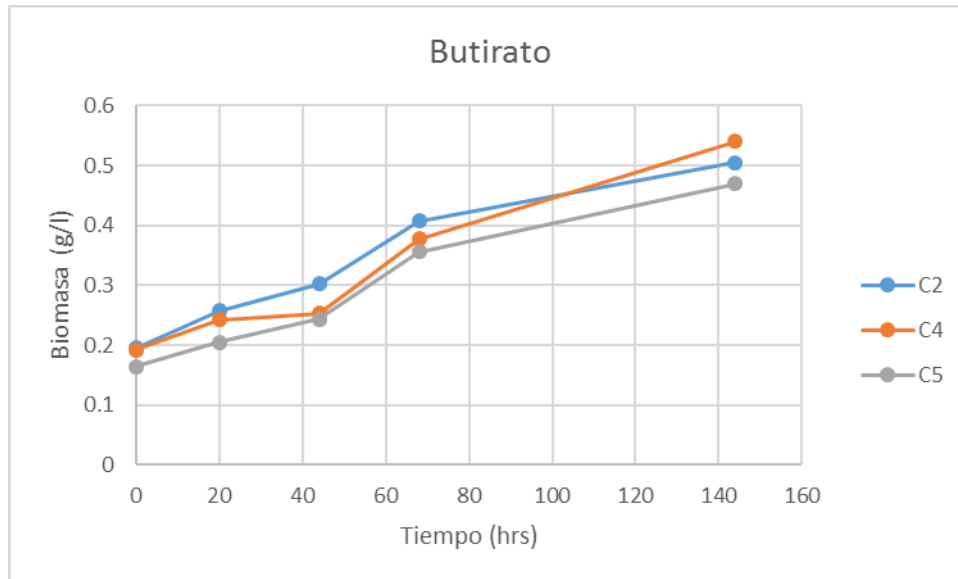


Figura 4. Evolución de la concentración de biomasa de los consorcios microbianos con acetato.

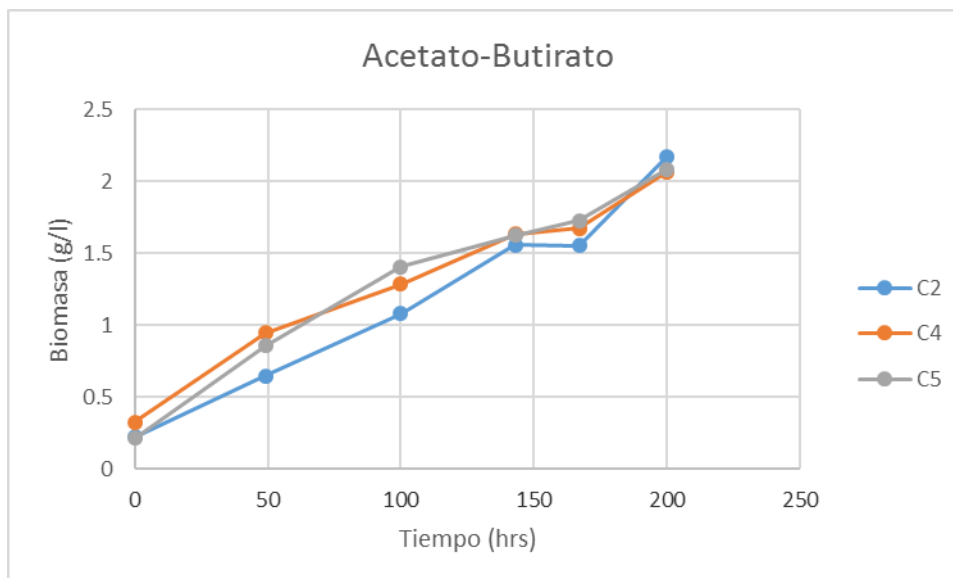
Se observó que los consorcios (C2, C4 y C5) pueden utilizar el butirato como sustrato, ya que mostraron aumento en la concentración de biomasa como se observa en la figura 5.



**Figura 5. Evolución de la concentración de biomasa de los consorcios microbianos con acetato.butirato.**

El comportamiento de los consorcios fue similar, el cultivo C4 alcanzó una concentración de biomasa ligeramente mayor al final del cultivo. A pesar de que los consorcios microbianos mostraron la capacidad de crecer en presencia de butirato, alcanzaron una concentración de alrededor de 0.3 1 g/l en 140 horas, lo cual demuestra que el crecimiento máximo fue aproximadamente 4 veces menor en butirato comparado al que se obtiene al utilizar acetato como sustrato. Sin embargo, se sabe que el butirato es una mejor fuente de carbono para lograr la producción de PHB's, por esto es que se decidió implementar una combinación de sustrato (acetato-butirato) como fuente de carbono.

Al emplear la combinación de sustratos acetato-butirato podemos observar que el comportamiento de los consorcios mejora puesto que alcanzan una mayor concentración de biomasa en el mismo tiempo de fermentación tal como se observa en la Figura 6.



**Figura 6. Evolución de la concentración de biomasa de los consorcios microbianos con mezcla de Acetato-Butirato**

En las Tablas 1 y 2 podemos observar que el consorcio C4 muestra una mayor concentración de biomasa, sin embargo este consorcio no tiene el mayor rendimiento sustrato-biomasa.

**Tabla 1. Evaluación de tres consorcios en acetato**

Sustrato	Consorcio	Hrs	Biomasa (g/l)	Ys/x
Acetato	C2	200	1.734587252	0.0864759
	C4	200	1.995820272	0.07515707
	C5	200	1.81400209	0.08269009

Se sabe que la concentración de biomasa está asociada a la acumulación y producción de PHB, sin embargo no es posible identificar bajo este criterio cual el mejor consorcio para la producción de PHB, utilizando acetato como sustrato como se observa en la Tabla 1. Los consorcios muestran un comportamiento similar en la Tabla 2 a pesar de que el sustrato es una combinación de acetato-butirato. Esta combinación de sustrato es común en los residuos de digestión anaerobia, por lo que se requiere evaluar su comportamiento pensando en la posible factibilidad de operar procesos acoplados de fermentación oscura y foto-fermentación.

**Tabla 2. Evaluación de tres consorcios en butirato-acetato**

Sustrato	Consorcio	Hrs	Biomasa (g/l)	Ys/x
Acetato-	C2	200	2.175548589	0.06894813



Butirato	C4	200	2.066875653	0.07257331
	C5	200	2.085684431	0.07191884

En la Tabla 2 el incremento en la concentración de biomasa para los tres consorcios es significativo comparado al observado al usar butirato como sustrato, en especial para el consorcio C2 que alcanzó una concentración de biomasa mayor de 2 g/l. Aun así, la concentración de biomasa para los tres consorcios es similar por lo que es difícil seleccionar un consorcio para la producción de PHB utilizando una combinación de acetato y butirato como fuente de carbono, misma combinación que se encuentra de forma natural en los residuos de la digestión anaerobia.

### 3.2. Balance elemental para describir el crecimiento, producción de hidrogeno y PHB

El balance elemental mediante el método de la “caja negra” nos permite manipular los flujos de entrada como son la fuente de carbono, nitrógeno, etc. con el fin de determinar las magnitudes de los productos. Esto permitirá determinar teóricamente como se podría aumentar o disminuir la cantidad de productos, y residuos que se obtienen durante el proceso. En la tabla 3 podemos observar las concentraciones de acetato o butirato en el medio de cultivo que fueron de 2 g/L y la mezcla de acetato-butirato de 4 g/L mientras que el nitrógeno se mantuvo constante en 1 g/L en los tres medios. Al aplicar el modelo teórico de “caja negra” se determinó que la concentración biomasa teórica es de 3.5 g/l, sin importar la fuente de carbono utilizada. Sin embargo, la producción de PHB es casi nula, por lo que se puede suponer que debido a que la fuente de nitrógeno está en una alta concentración, es posible que la mayor parte de la fuente de carbono se dirija a la formación de biomasa y no a la acumulación de PHB.

**Tabla 3. Medio actual.**

	Sustrato(g/l)	Biomasa (g/l)	PHB(g/l)	Nitrógeno(g/l)
Acetato	2	3.594	0	1
Butirato	2	3.594	0	1
Acetato-Butirato	4	3.594	0.056	1

A través del balance elemental se determinó que el medio de cultivo era insuficiente para la producción de PHB, ya sea porque es necesaria una mayor cantidad de sustrato o, por que la fuente de nitrógeno es muy grande, es necesario disminuir la concentración de nitrógeno con la finalidad de aumentar los rendimientos sustrato-producto o en este caso sustrato-PHB.

Se decidió aplicar al modelo una disminución en la fuente de nitrógeno hasta un nivel donde no se vea muy afectado el metabolismo del consorcio y favorezca de forma significativa la formación del biopolímero.

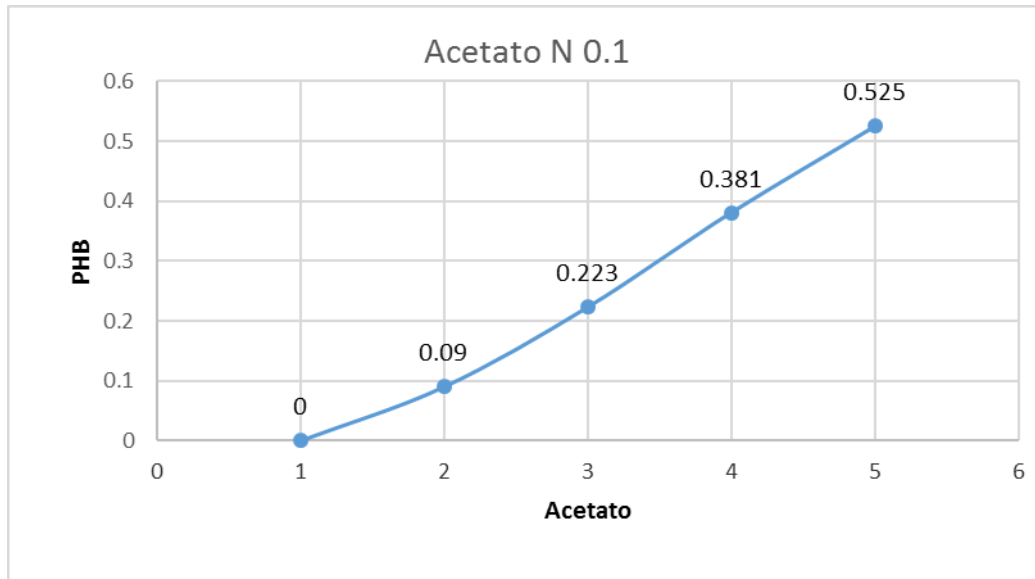
En la Tabla 4 se pueden observar los valores de PHB y biomasa al mantener constante el sustrato acetato y a distintas concentraciones crecientes de nitrógeno.

*Tabla 4. Variaciones en la concentración de nitrógeno.*

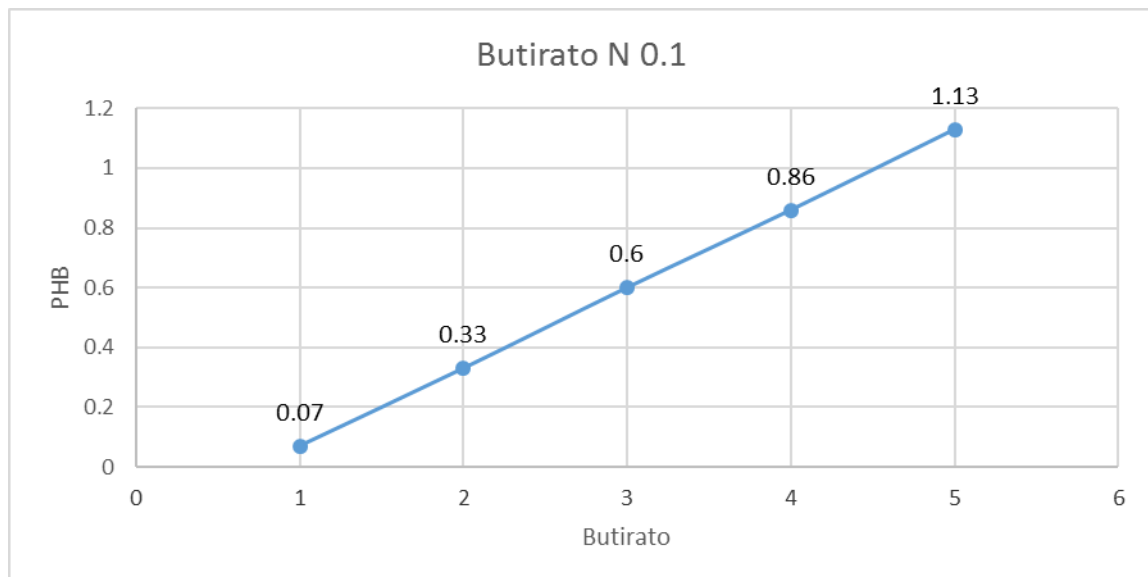
Acetato	Nitrógeno	Biomasa	PHB
1	0.1	0.777	0
1	0.2	1.09	0
1	0.3	1.4	0
1	0.4	1.71	0
1	0.5	2	0
2	0.1	0.777	0.09
2	0.2	1.09	0.03
2	0.3	1.4	0
2	0.4	1.71	0
2	0.5	2	0

Como podemos ver, para una concentración de 1g/l de acetato y todos los niveles de nitrógeno evaluados determinamos que la biomasa se va incrementando, pero la producción de PHB es 0. El modelo teórico también demostró que en las combinaciones de 2 g/L y 0.1 y 0.2 g/L de nitrógeno permitirían la mejor producción de PHB. Por lo tanto, de acuerdo a los datos obtenidos, la mejor condición experimental sería 2 g/L de sustrato (acetato), 0.1 g/L de fuente de nitrógeno.

En las figuras 7 y 8 se presentan los datos que se obtienen mediante la aplicación del modelo a diferentes concentraciones de acetato o butirato con una concentración de nitrógeno constante de 0.1g/l. Se puede observar que la concentración de PHB aumenta de forma proporcional al incremento en la concentración del sustrato.



**Figura 7. Efecto de la concentración de acetato sobre el crecimiento de PHB.**

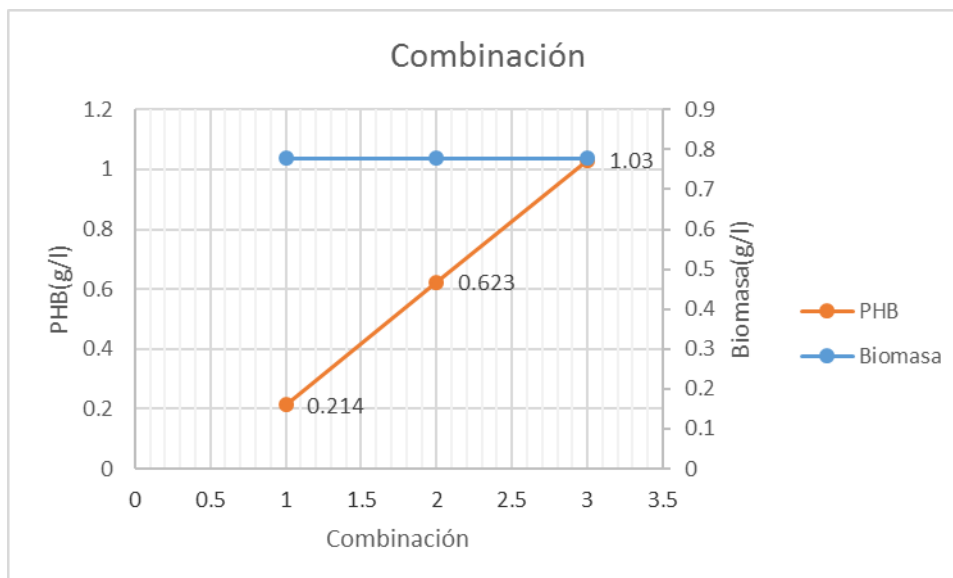


**Figura 8. Efecto de la concentración de butirato sobre el crecimiento de PHB.**

Al disminuir la fuente de nitrógeno 0.1 g/l se observó que la formación de PHB se vería beneficiada sin importar si la fuente de carbono era menor o mayor en el medio, en la Figura 7 y 8 se observa un comportamiento lineal, donde al ir aumentando las concentraciones de fuente de carbono ya sea acetato o butirato la formación de PHB aumenta de forma proporcional. Sin embargo, es conocido que los consorcios no pueden degradar concentraciones mayores a 3 g/L de acetato o butirato.

La combinación de ambos sustratos resulta más efectiva ya que se puede alcanzar una mayor acumulación del polímero, dando como resultado teórico 1g/L de polímero, por cada gramo de

biomasa que se forma utilizando una máximo de 6 g de sustrato en combinación, como se observa en la Figura 9.



**Figura 9. Efecto de la combinación acetato-butirato sobre la formación de PHB.**

Se comprobó que al disminuir la fuente de nitrógeno a 0.1 g/L la concentración de biomasa se mantiene constante, cuando los valores de la concentración de sustrato se mantienen entre 1g/L y 3 g/L y que aumenta la formación del biopolímero de forma lineal. Por lo que se puede decir que el medio de cultivo deberá ser modificado, y las condiciones corregidas para favorecer la producción de PHB. Estas deberán ser de 0.1g/L de fuente de nitrógeno y 6 g/L de sustrato en combinación 1:1 de acetato y butirato.

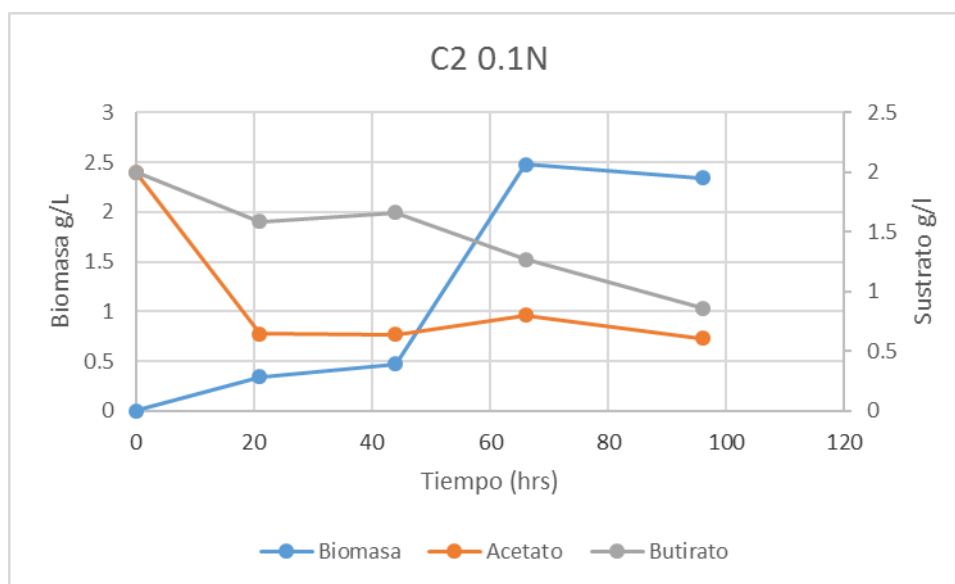
La aplicación del método de la “caja negra” en un balance elemental nos permitió conocer cuáles son las concentraciones de los nutrientes en el medio que determinarán la acumulación del biopolímero y con ello establecer los valores que se quieren alcanzar de forma experimental:

1. Se deberá verificar si una disminución a 0.1 g/L de concentración de la fuente de nitrógeno permitirá alcanzar 1 g/L del biopolímero
2. El consumo de sustrato de forma teórica se estableció en un 100 % por lo que deberá comprobarse que existe un consumo de los AGVs ya sea de forma individual o en combinación.

Una vez que se establecieron las condiciones teóricas óptimas para el crecimiento y formación del polímero en los tres consorcios C2, C4 y C5, como siguiente etapa se evaluó el crecimiento de los cultivos con una concentración inicial de acetato de 2 g/L y una

concentración de amonio de 0.1 g/L. Esta última es un orden de magnitud menor en comparación a la que se tenía en el medio inicial.

Se evaluó el consumo de sustrato en los consorcios durante el crecimiento de la biomasa, determinando que el consorcio C2 consume aproximadamente un 70% del acetato en la primeras 20 horas de fermentación, mientras que el consumo de butirato fue menor y mas lento ya que hasta las 44 horas de fermentación, donde inició la fase de crecimiento exponencial. En este periodo de incubacion el butirato practicamente no habia sido consumido. Posterior a las 44 horas de cultivo el consumo de butirato aumentó, alcanzando un consumo final de hasta un 80% del mismo. A medida que se fueron consumieron ambos sustratos la concentración de biomasa se incremento hast alcanzar un máximo de hasta 2.5 g/L despues de las 60 horas de cultivo, tal como se observa en la Figura 10.



*Figura 10 Evaluación de la Biomasa y Consumo de sustrato de C2*

Al evaluar el crecimiento del consorcio C4 con ambos sustratos, se observó que el consorcio C4 que aparentemente el consumo de los sustratos es simultáneo y no como en el caso del cultivo C2 donde aparentemente se consume primero el acetato y posteriormente el butirato. El 70% del acetato fue consumido durante las primeras 20 horas de fermentación, mientras que solamente el 40% del butirato fue consumido posterior a las 70 horas de fermentación. La biomasa en este caso alcanzo una concentración máxima de 2.7 g/L como se observa en la Figura 11

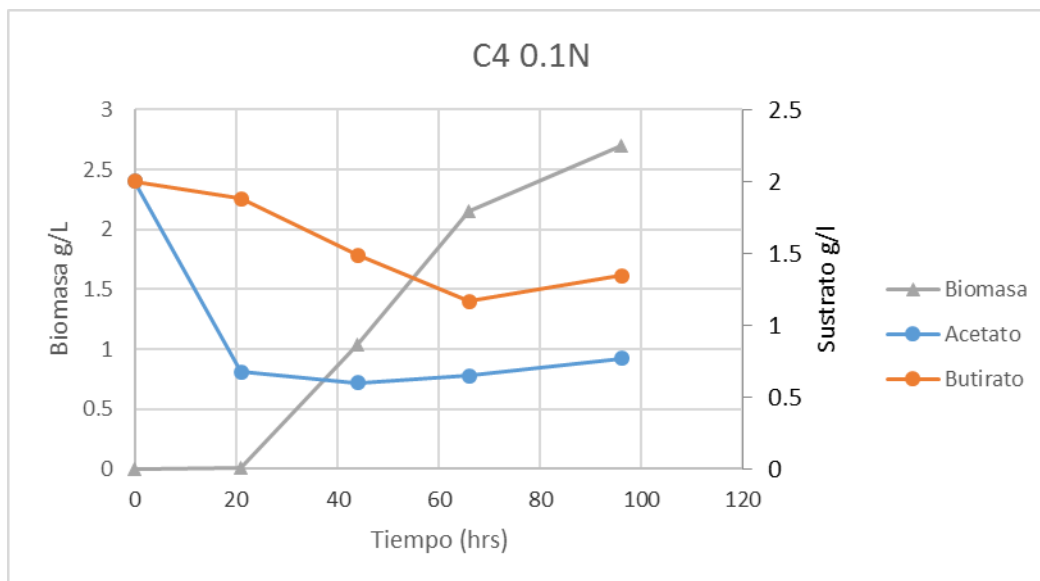


Figura 11 Evaluación de la Biomasa y Consumo de sustrato de C4

Finalmente, también se evaluó el crecimiento del C5 en presencia de la mezcla de sustratos. Esto permitió evidenciar que el consorcio C5 consume aproximadamente un 70% del acetato en la primeras 20 horas de fermentación, al mismo tiempo se consumió el butirato pero en una menor cantidad, por lo que solamente se alcanzó un porcentaje de asimilación/degradación del sustrato de 50% de una concentración de alrededor de 2 g/L de cada uno de ellos. El consumo de ambos sustratos continuó llevándose a cabo a una velocidad menor hasta las 70 horas de fermentación alcanzando un consumo máximo de 75% y 55% para el acetato y butirato, respectivamente. El consumo del sustrato permitió alcanzar una concentración de biomasa mayor a 2 g/L, tal como se puede observar en la Figura 12

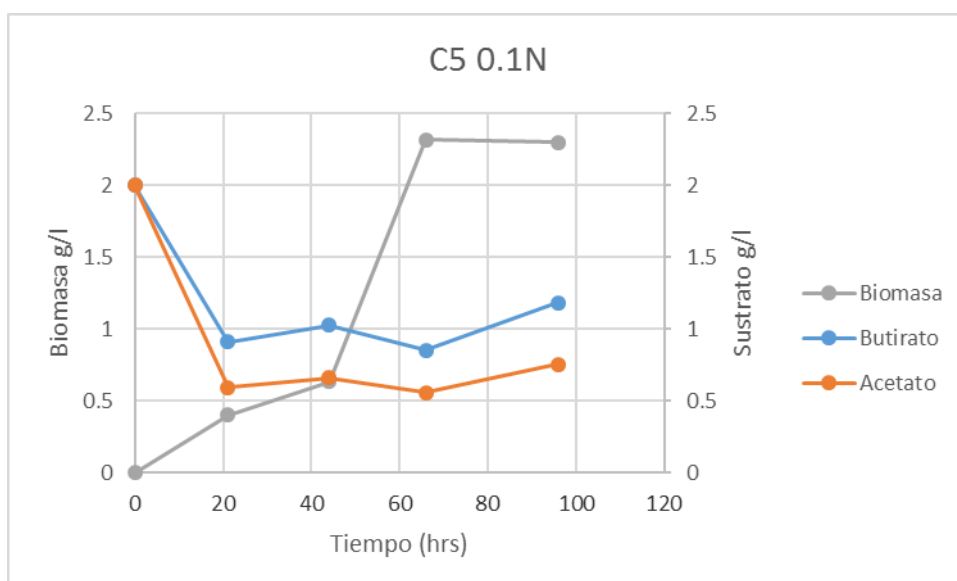


Figura 12 8 Evaluación de la Biomasa y Consumo de sustrato de C5

Se demostró que los consorcios tiene la capacidad de consumir los sustratos y crecer en la condiciones establecidas en base a la teoría, así mismo se observó que pueden alcanzar concentraciones de biomasa superiores a los 2 g/L a pesar de que la fuente de amonio se vio drásticamente disminuida, lo que permite comprobar que con una concentración de 0.1 g/L de amonio se puede fomentar el crecimiento de los consorcios de forma correcta.

Posteriormente y una vez definidas las mejores condiciones de crecimiento, se realizó la extracción del polímero a los tres consorcios para poder comprobar que las condiciones establecidas permiten la formación de este. Los resultados obtenidos demostraron que efectivamente el polímero se produjo bajo estas condiciones de cultivo. Los datos del porcentaje de PHB producido se resumen en la Tabla 5, estos porcentajes de acumulación son menores a los reportados en la bibliografía, mismo que se encuentran alrededor del 40% para cultivos mixtos, sin embargo la concentración de biomasa alcanzada es comparable con lo reportado por esto se podría deber a que los tres consorcios presentaron aumentos en el pH alcanzando un promedio superior a 8, que está dentro de los parámetros reportados para bacterias purpuras no sulfurosas en lo que puede afectar en gran medida el almacenamiento del polímero, así como al crecimiento celular.

*Tabla 5 % PHB en los consorcios C2, C4 y C5*

	Peso seco (g/l)	%PHB
C2	0.42	13
C4	0.5	6
C5	0.64	2

Debido a que los resultados con el medio de cultivo A fueron muy bajos respecto a la acumulación del biopolímero, como se observa en la tabla 5, se decidió realizar una modificación al medio de cultivo agregando 0.9 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> como amortiguador permitiendo así mantener el pH más estable alrededor de 6.8± 0.2.

Al mantener el pH en 6.8 el aumento en la biomasa conforme al tiempo es evidente permitiéndole alcanzar concentraciones hasta de 0.7 g/L en 96 horas de fermentación, por lo que el crecimiento del consorcio depende en gran medida de la estabilidad del pH, puesto que en la cinéticas anteriores sin el amortiguador que permitiera regular de pH, la concentración de

la biomasa es menor, lo que puede atribuirse a que el medio se torna básico alcanzando un pH de 9.

Se observó que al utilizar el medio B que incluía el amortiguador, el crecimiento de la biomasa continuaba durante las 96 horas correspondientes a esta etapa, donde el consorcio C2 alcanzó 0.65g/l de biomasa y se observa que se interrumpe en una fase de crecimiento, lo que permite que el consorcio continúe aumentando su concentración de biomasa y comience a acumular el polímero en la siguiente etapa

El consorcio C2 mostro un crecimiento menor como se observa en la Figura 13, lo que sugiere que el control de pH afecto la evolución del consorcio, sin embargo la oxidación de los cromoforos se ve afectada por un pH alcalino lo que justificaría las diferencia en la densidad óptica y por lo tanto la menor concentración de biomasa

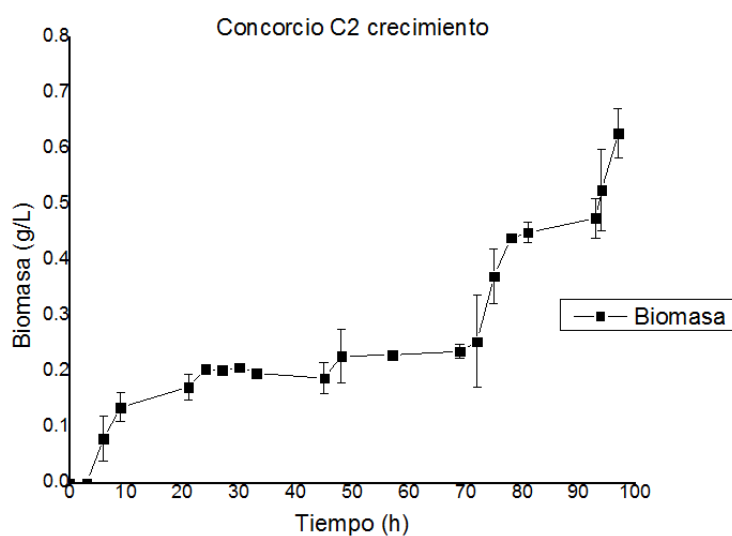


Figura 13 Efecto del Medio B sobre el crecimiento del consorcio C2.

Al recuperar la biomasa del medio de crecimiento y realizar un recultivo en medio de acumulación la biomasa continua aumentando hasta alcanzar concentraciones de 1.7 g/L, debido a que hay un concentración de 0.1g/l fuente de nitrógeno(NH<sub>4</sub>) que permite que la biomasa siga incrementándose.



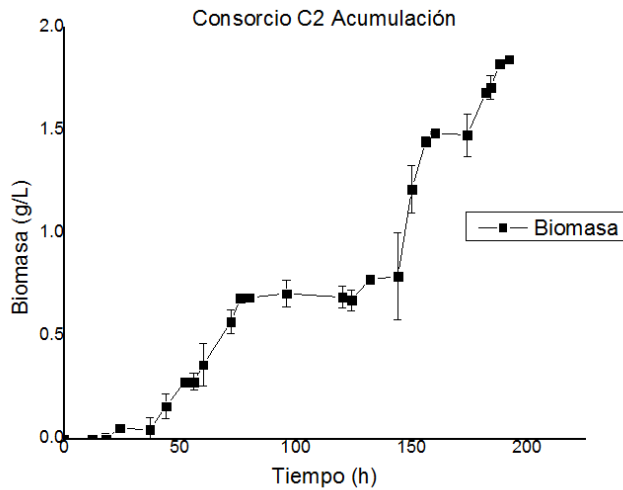


Figura 14 Efecto del Medio B sobre el crecimiento en medio de acumulación del consorcio C2.

El consorcio C4 mostró un comportamiento similar en el medio de crecimiento, sin embargo la concentración celular fue menor alcanzando 0.38 g/L de biomasa, lo que sugiere que el consorcio C4 crece de manera más lenta en un pH neutro a diferencia del medio alcalino y se interrumpe a las 96 horas como se observa en la Figura 14 con el fin de utilizar la biomasa como inóculo en un medio que fomente la acumulación del polímero.

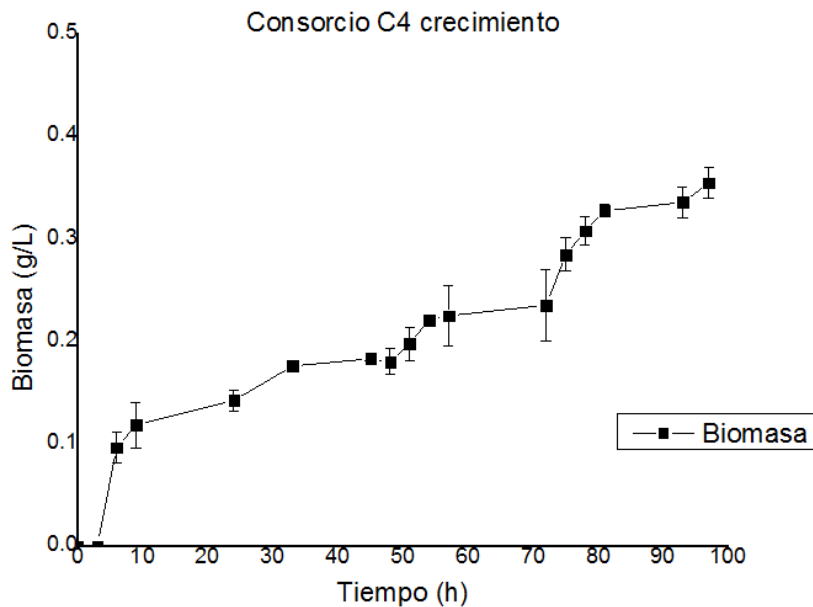


Figura 15 Efecto del Medio B sobre el crecimiento del consorcio C4.

Al cambiar de al medio de acumulación la biomasa continua aumentando hasta alcanzar concentraciones de 0.85g/L, esto debido a que existe un fuente de nitrógeno que permite que la biomasa siga aumentando.

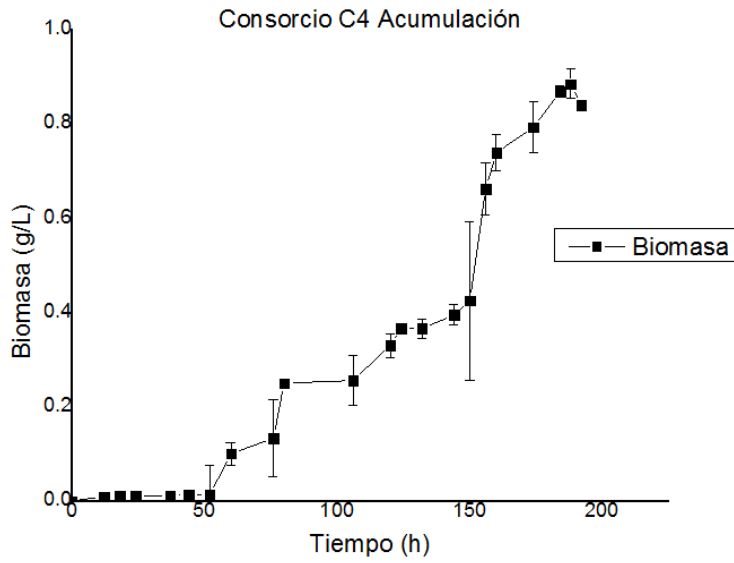


Figura 16 Efecto del Medio B sobre el crecimiento en medio de acumulación del consorcio C4.

La estrategia de someter a las celular a dos tipos de medio permitió alcanzar en primer lugar una buena acumulación de biomasa y en segundo lugar fomento la acumulación del polímero, permitiendo alcanzar hasta un 44% de PHB con respecto de la biomasa seca del consorcio C4

Tabla 6 Porcentaje de PHB recuperado a partir del medio de acumulación

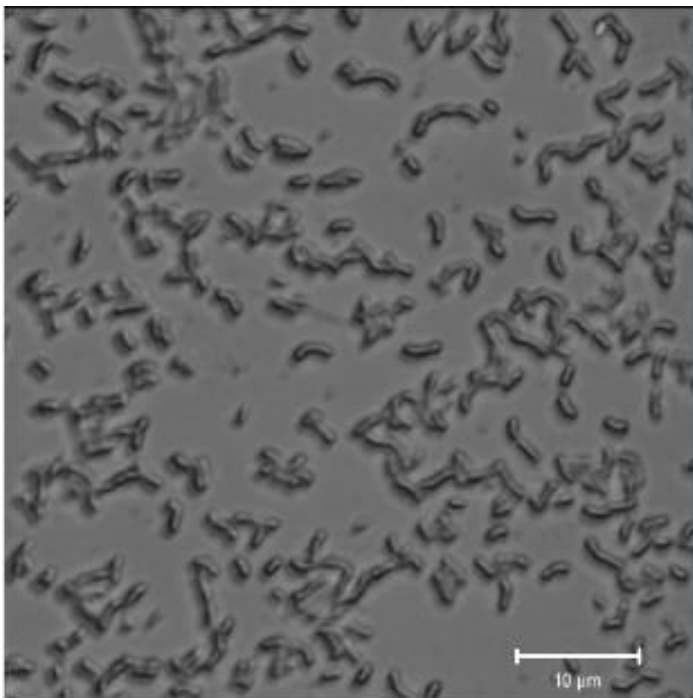
	C2	C4
Peso seco (g/L)	0.06	0.02
%PHB	26.166	44

### 3.3. Caracterización del polímero

#### 3.3.1. Microscopia Confocal

Se realizaron tinciones utilizando Azul Nilo al 1% y mediante microscopía confocal se observaron los gránulos del polímero conforme al tiempo de la fermentación, permitiendo evidenciar acumulación de polímero a lo largo del tiempo en los distintos consorcios C2, C4 y C2P durante la fase de limitación de amonio o fuente de nitrógeno.

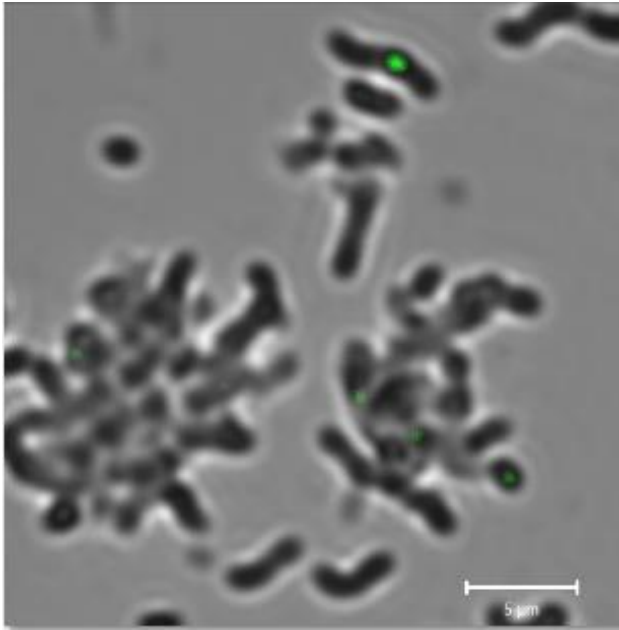
En primer instancia se realizaron pruebas de autofluorescencia mediante un barrido de 425nm a 721nm con la finalidad de evitar un falso positivo como se observa en la Figura 16 y con esto verificar que en efecto lo que se está observando es el polímero dentro de las células



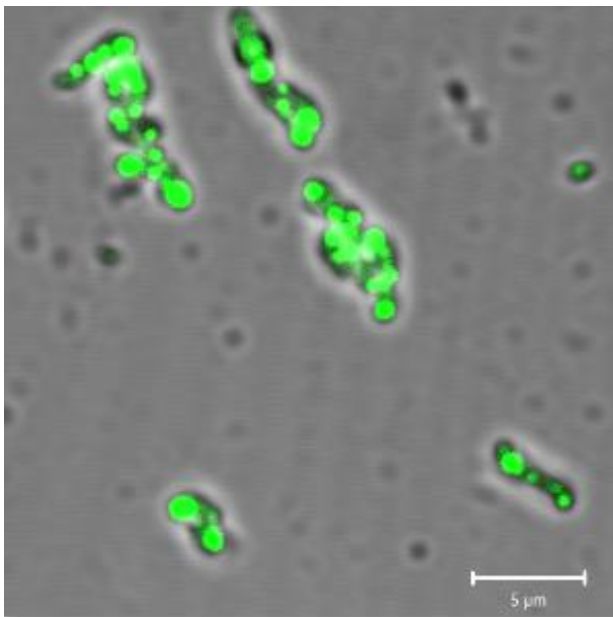
*Figura 17 Barrido de 425nm a 721nm para autofluorescencia*

En la Figura 17 se puede observar que al inicio del cultivo no se percibió fluorescencia lo que corrobora que el colorante fue específico para PHB y que no hubo ningún otro componente celular que se tiñera o floreciera en las condiciones iniciales.

El consorcio C2 mostro acumulación del polímero a partir del segundo día como se observa en la Figura 17 y continuó aumentando hasta el octavo día de la fermentación Figura 18, donde se puede observar que el polímero se encuentra en una alta concentración dentro de la célula.

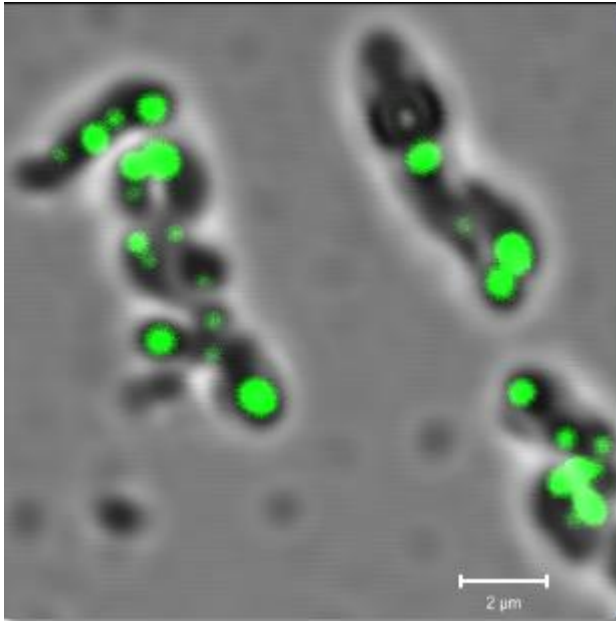


*Figura 18 Vacuolas de acumulación del polímero después de en el consorcio C2 dos días en medio de acumulación a 63x 561nm*



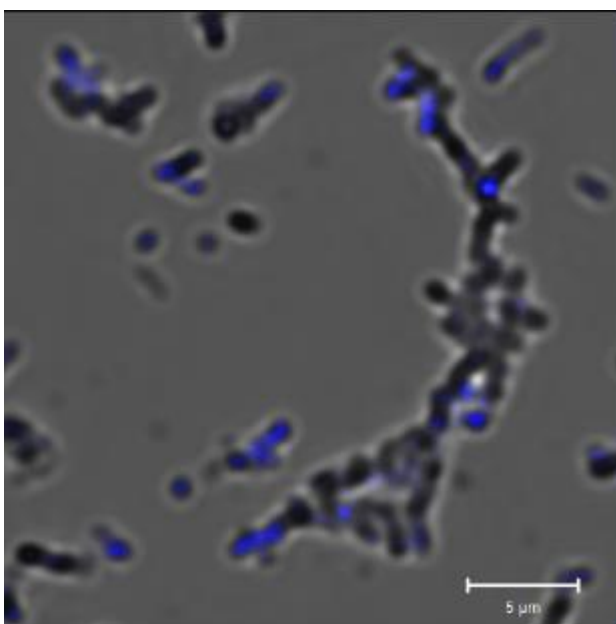
*Figura 19. Vacuolas de acumulación del polímero después de 8 días en medio de acumulación a 63x 561nm*

Mediante un acercamiento a 2 μm se pueden observar las vacuolas formadas por los gránulos del biopolímero dentro de la célula como se observa en la Figura 19, misma que tomando en cuenta la escala, nos permiten suponer que el tamaño de las vacuolas ocupan y porcentaje menor al 30% de la célula, cercano a la cantidad de polímero recuperado (26%).



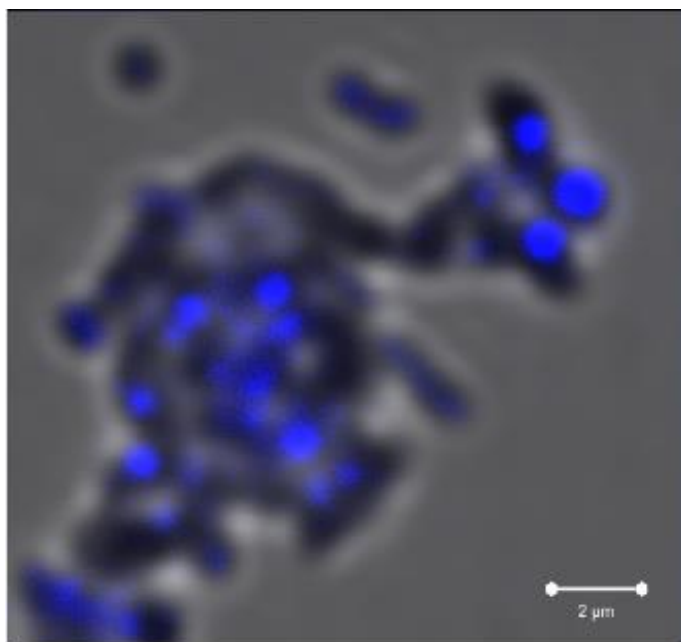
*Figura 19 Vacuolas de acumulación del polímero después de 8 días en medio de acumulación a 63x 561nm*

El consorcio C4 mostró acumulación del polímero a partir del segundo día superior a la que se observó en el consorcio C2 como se observa en la Figura 20, la concentración del polímero dentro de la células continuó aumentando hasta el octavo día de la fermentación, donde se puede observar que el polímero se encuentra en una alta concentración dentro de la célula y la mayor parte de la población presenta el polímero intracelularmente.



*Figura 20 Consorcio C4 dos días en medio de acumulación a 63x 561nm*

Los microorganismos que presenta acumulación del polímero, presenta vacuolas grandes que ocupan alrededor del 50% del cuerpo analizado como se observa en la Figura 21, que también correspondería al 44% que se recuperó del polímero durante el proceso de extracción.



*Figura 21. Consorcio C4 ocho días en medio de acumulación a 63x 561nm*

Existen 3 cromóforos capaces de teñir los PHB que se forman en la células como son el negro suddan, azul nilo y el rojo nilo, sin embargo se ha demostrado que el azul nilo tiene una mejor selectividad que el negro suddan (Schroth, 1994).

Diversos autores señalan que es posible utilizar rojo Nilo y azul Nilo es posible evidenciar la presencia de gránulos de PHB de forma intracelular en los microorganismos ( Berlanga, 2006), sin embargo no es posible cuantificar la concentración del polímero hasta que se realiza una extracción.

Por lo tanto se eligió la técnica de tinción mediante azul Nilo, que permitió evidenciar la presencia y acumulación del biopolímero a lo largo de la cinética en ambos consorcios, mediante microscopia confocal.

### 3.3.2. MALDI-TOF

El polímero obtenido se identificó mediante la técnica de MALDI-TOF que permitió obtener la masa molecular del biopolímero a partir de la ionización de las moléculas correspondientes a los fragmentos del polímero de cada uno de los consorcios C2, C4, C2P y C5, aunado a esto se obtuvo la estructura principal del PHA y se identificó el monómero conocido PHB como se observa en la Figura 22 enmarcado en azul.

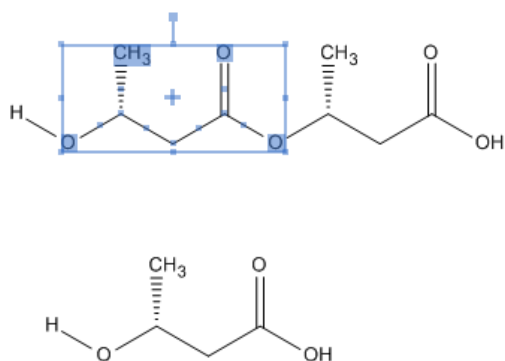


Figura 22 Estructura monomérica de PHB obtenida a partir del consorcio C2

El polímero obtenido a partir del consorcio C2 presentó una masa molecular total del polímero alrededor de 937 m/z con fragmentos de masa molecular de 102 m/z, como se observa en la Figura 23, que son correspondientes a la adición de la unidad monomérica representada en la Figura 22.

Se han reportado polímeros con una masa molecular de 1070 m/z con fragmentos de masa molecular alrededor de 86 m/z (Yu, 2000), que representan polímeros con una mayor masa molecular del que se obtuvo con el consorcio C2, sin embargo las fracciones de la unidad monomérica son más pequeñas, por lo que el polímero se encuentra más fraccionado.

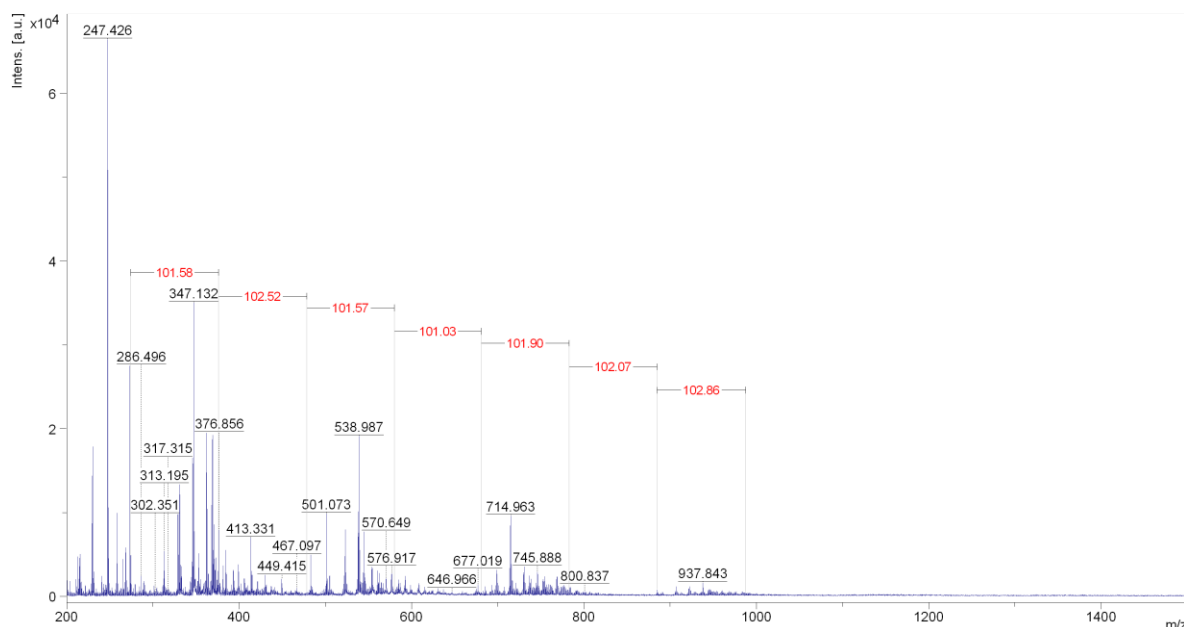
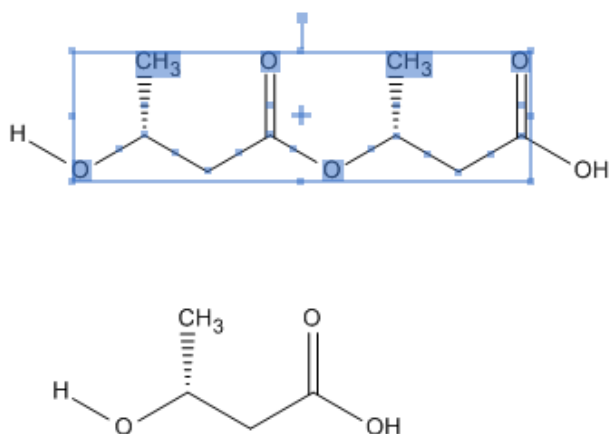


Figura 23 Fragmentos de 102 m/z correspondientes a la adición de una unidad monomérica mediante MALDI-TOF

Mediante la técnica de MALDI-TOF se obtuvo la estructura principal del PHA para el consorcio C4 y se identificó una subunidad de estructura dimérica en el polímero conocido PHB representado en la Figura 24 enmarcado en azul.



*Figura 24 Estructura Dimérica de PHB obtenida a partir del consorcio C4*

El consorcio C4 presentó un polímero con una masa molecular total de 1313.536 m/z con fragmentos de masa molecular de 172 m/z, como se observa en la Figura 25.

Existen reportes con masa molecular en rangos de 580 a 1580 m/z para PHBs obtenidos mediante síntesis química, utilizando butileno adipato para formación de copolímeros (Impallomeni, 2013), que permiten aumentar la masa molecular. Sin embargo el polímero que se obtiene a partir del consorcio C4 se encuentra cercano a estos valores, con la ventaja de ser sintetizado por un cultivo mixto que es capaz de utilizar AGVs como sustrato, aunado a esto el polímero proveniente del cultivo no necesita otro polímero para alcanzar masas moleculares altas, lo que dice que el polímero está menos fraccionado.



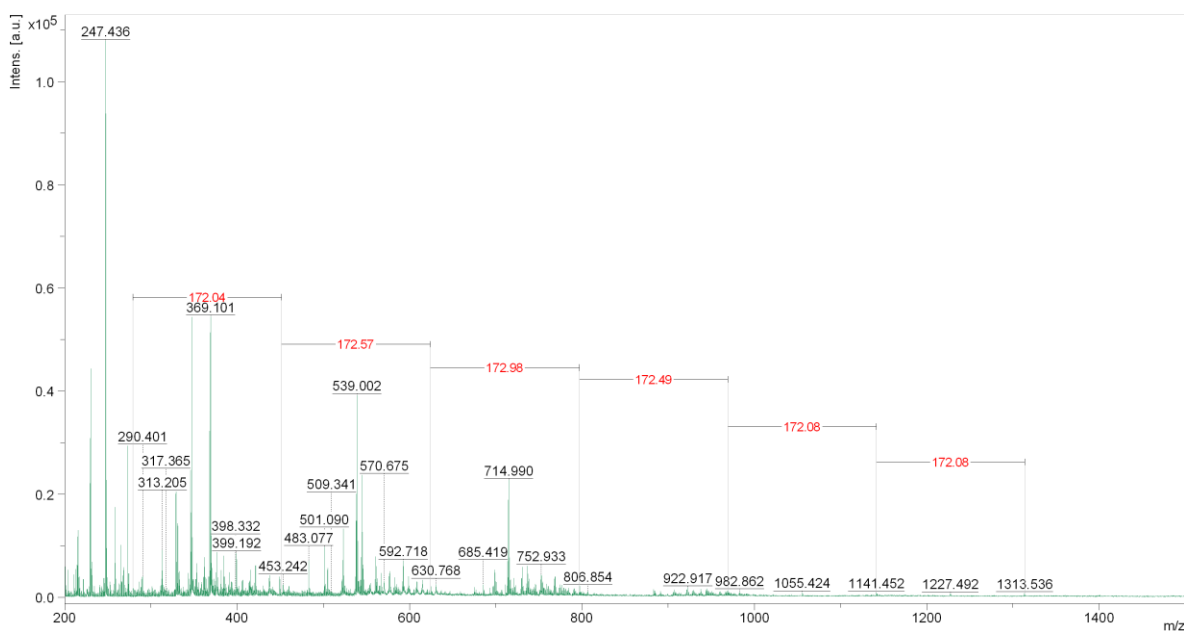


Figura 25 Fragmentos de 172 m/z correspondientes a la adición de unidades díméricas mediante MALDI-TOF

El consorcio C5 presentó un polímero con una masa molecular total de 946.875 m/z sin embargo presento fragmentos de masa molecular tanto de 102 m/z como de 172 m/z, como se observa el Figura 26. Al presentarse dos fragmentos del polímero con distintas masas moleculares, existe la posibilidad de una formación del polímero a partir de oligómeros con distintas masas, sin embargo al repetirse la unidad monomérica de 102 m/z una mayor cantidad de veces y la cual coincide con la unidad monomérica del consorcio C2, es posible decir que el polímero está compuesto por monómeros de PHB.

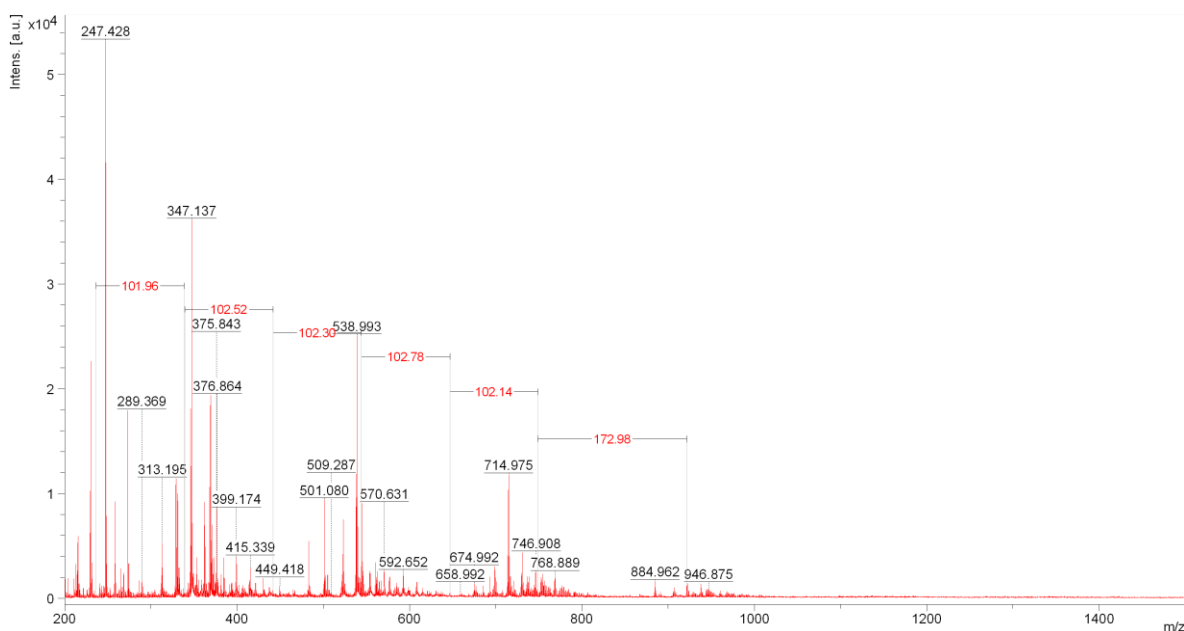


Figura 26 Fragmentos de 102 y 172 m/z correspondientes a la adición de unidades monoméricas y díméricas mediante MALDI-TOF

Para poder comparar el polímero obtenido con los que se encuentran actualmente de forma comercial, se analizó PHB comercial mediante MALDI-TOF y se obtuvo una masa de molecular de 1058 m/z con fragmentos de 102 y 172 m/z similares a los que se encontraron con el consorcio C5 Figura 27, sin embargo el polímero obtenido a partir del consorcio C4 cuenta con una masa molecular mayor a la del polímero comercial, lo que indica que el método de extracción no fragmento al polímero, además este presentó subunidades dimericas, por lo que el PHB obtenido tiene una mayor resistencia debido a los enlaces que se forman.

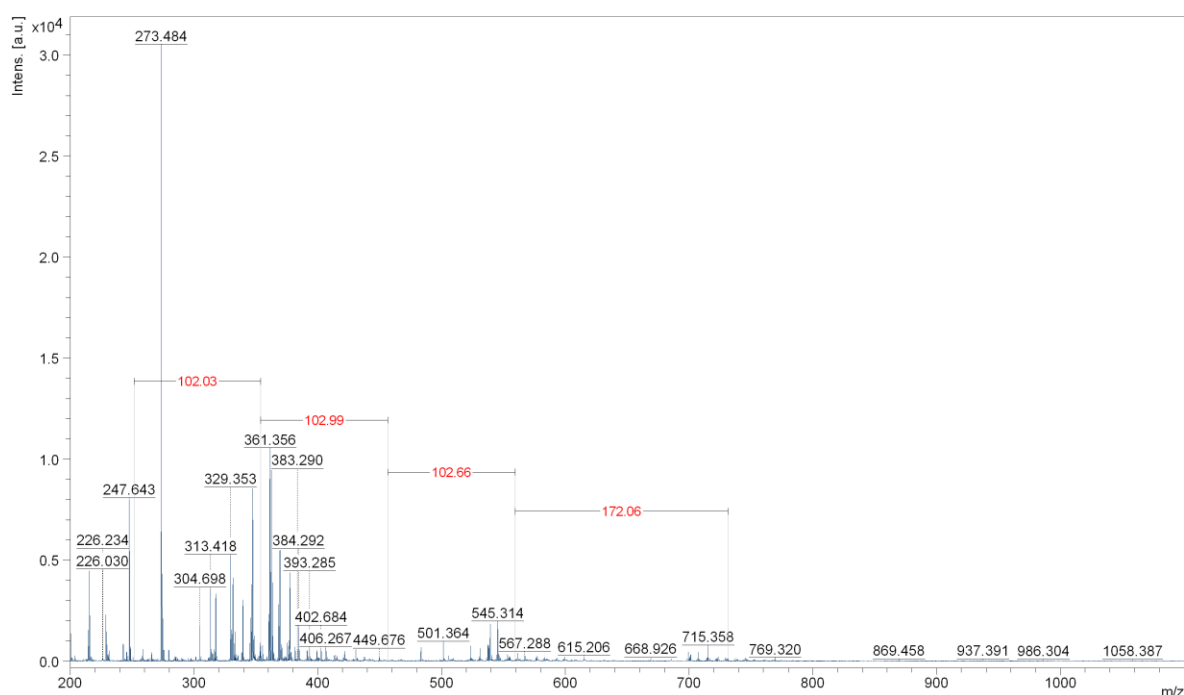


Figura 27 Fragmentos de 102 y 172 m/z correspondientes al PHB comercial mediante MALDI-TOF

La técnica de MALDI-TOF permitió obtener la estructura del polímero, además se analizó y comparó la masa molecular de los polímeros obtenidos a partir de los consorcios, así como del polímero comercial.

### 3.3.3. DRX

Mediante la difracción por rayos x es posible obtener el porcentaje de cristalinidad, además de la identificación del polímero mediante la comparación de los picos en los cromatogramas con los conocidos en la base de datos del centro internacional de difracción.

La cristalinidad de un material influye en sus características, incluyendo su fortaleza mecánica, opacidad y propiedades térmicas. Una mayor cristalinidad en la estructura del polímero le otorgaría una mayor flexibilidad y resistencia.

Se logró identificar mediante la base de datos que los picos en el cromatogramas del polímero correspondiente al consorcio C2 indican la presencia de Poli( $\beta$ -hidroxibutirato) en un 35% y Poli(R,S)- $\beta$ -hidroxibutirato) isotactico en un 64%, que son mostrados en gris y verde respectivamente, mientras que los picos generados por el polímero se muestran en rojo como se observa en la Figura 28

La fracción del polímero analizada mostro un peso molecular de 86.09, con una formulación empírica de  $(C_4H_6O_2)_n$  correspondiente al monómero PHB que se repite durante la estructura del polímero.

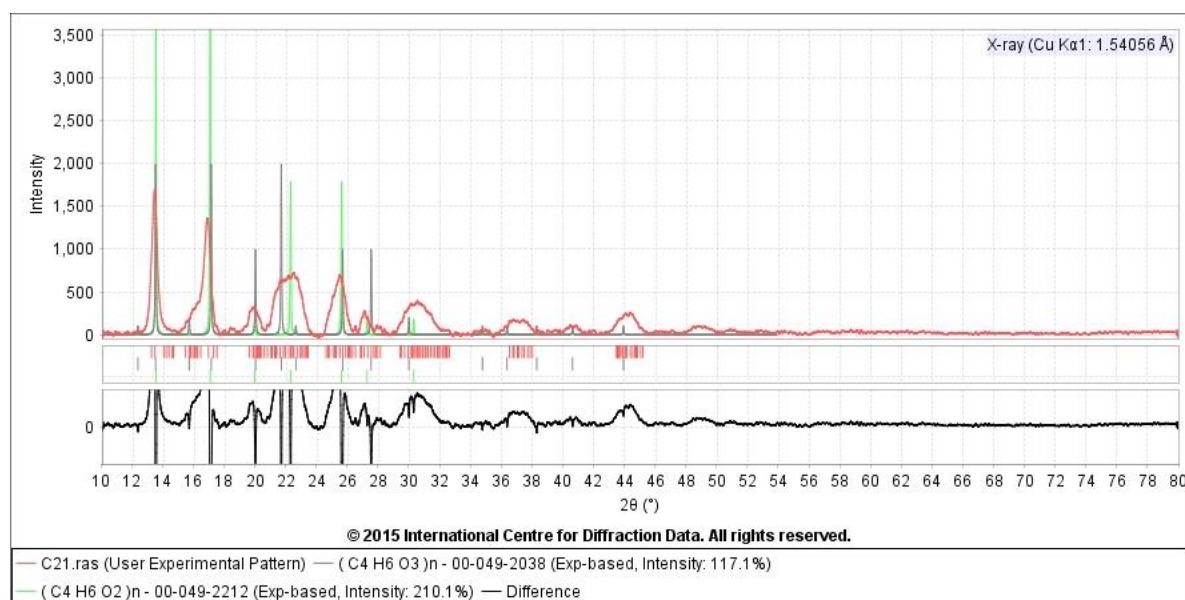


Figura 28 Cromatogramas de cristalinidad del PHB a partir del consorcio C2

El polímero obtenido a partir del consorcio C2 presentó un porcentaje de cristalinidad del 59%(Figura 29), lo que representa un polímero con una densidad media, además presenta una estructura más ordenada lo que le permite funcionar como un material plástico más rígido, sin embargo los reportes indican que al aumentar la temperatura a un punto cercano al punto de fusión, la cristalinidad del polímero aumenta y esta se conserva hasta alcanzar su punto de fusión. (Owen, 1991, Sato, 2006).

El cromatograma del polímero correspondiente al consorcio C2 indica la presencia de Poli( $\beta$ -hidroxibutirato) y Poli(R,S)- $\beta$ -hidroxibutirato) isotactico, siendo que la forma isotactica representa 64%, mientras que Poli( $\beta$ -hidroxibutirato) solamente un 35%

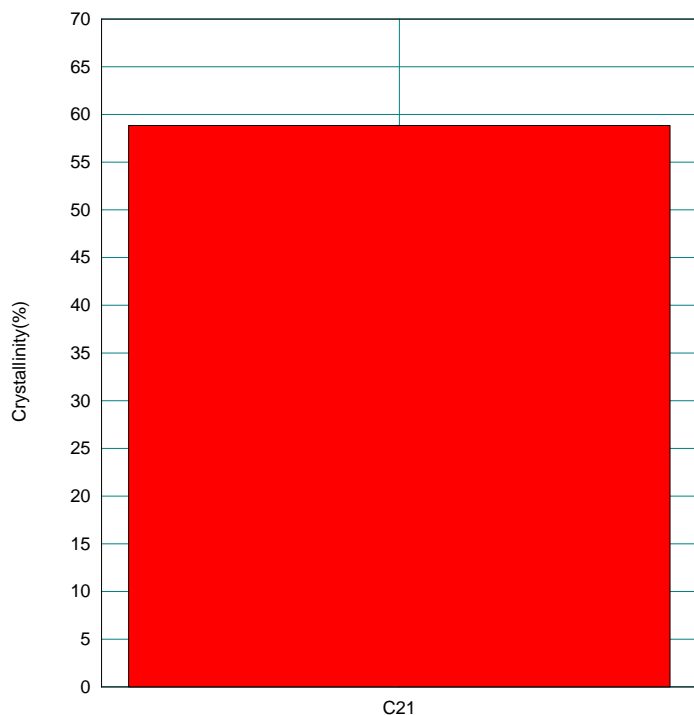


Figura 29 Porcentaje de Cristalinidad de PHB del consorcio C2

El cromatograma del polímero correspondiente al consorcio C4 se muestra en la Figura 31, el cual indica la presencia de Poli( $\beta$ -hidroxibutirato) y Poli(R,S)- $\beta$ -hidroxybutirato) isotactico, la presencia del polímero es su forma isotactica es menor que en el consorcio C2, debido a esto su estructura es amorfa.

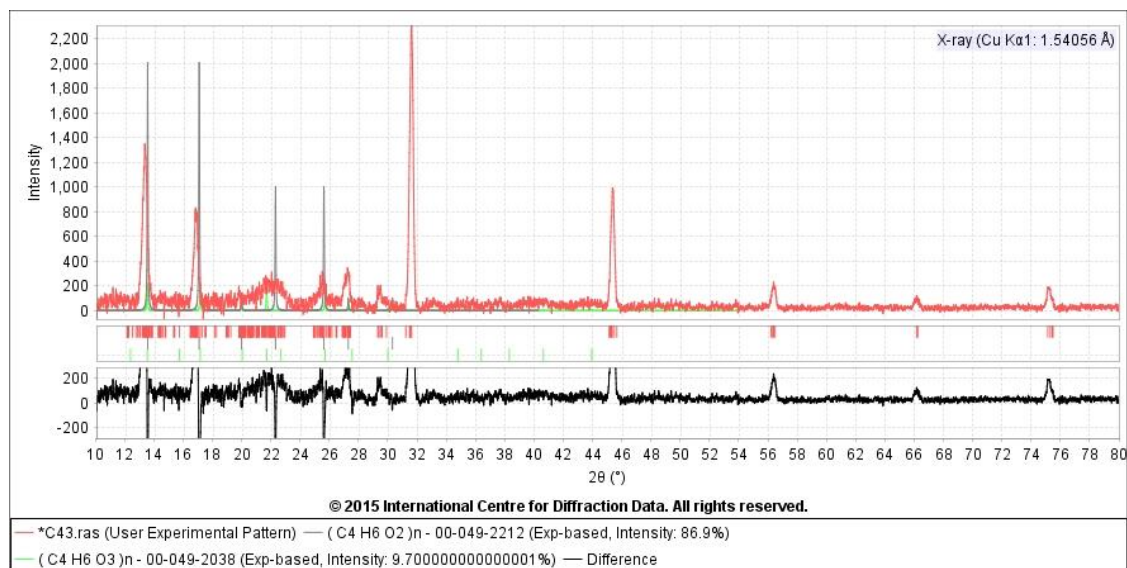
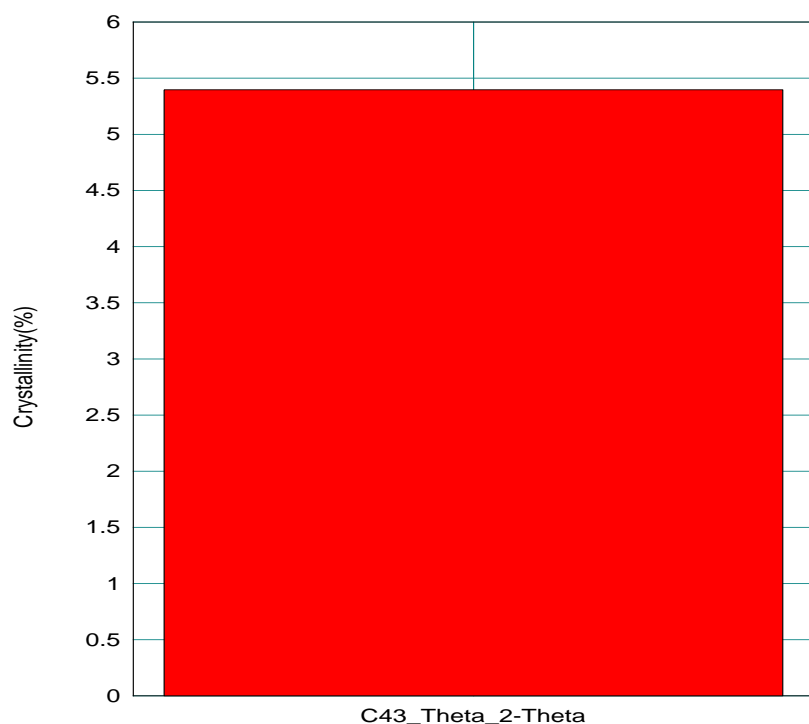


Figura 30 Cromatogramas de cristalinidad del PHB a partir del consorcio C4

La cristalinidad es menor (5.4%) en comparación al polímero obtenido a partir de C2, sin embargo el peso es de 102.09, como era lo esperado debido a que los análisis realizados

mediante la técnica de MALDI-TOF arrojaron una mayor masa molecular para el polímero sintetizado en el consorcio C4.



*Figura 31 Porcentaje de Cristalinidad de PHB del consorcio C4*

Se identificaron los cromatogramas del polímero correspondiente al consorcio C5 que indicaron la presencia de Poli( $\beta$ -hidroxibutirato) en un 100%, que son mostrados en gris como se observa en la Figura 33

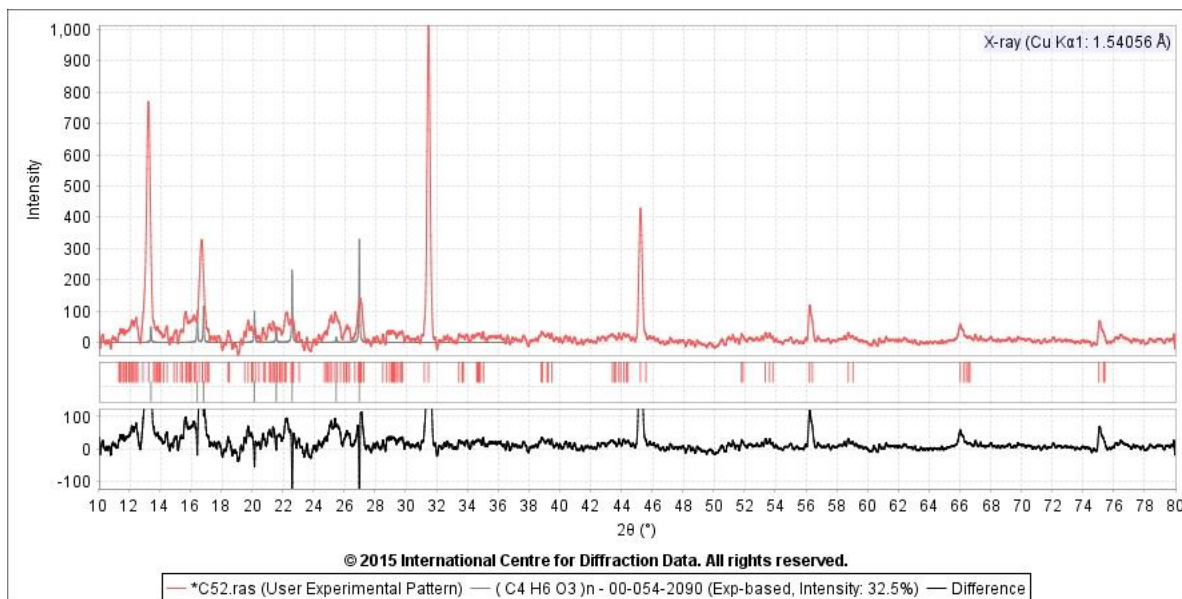
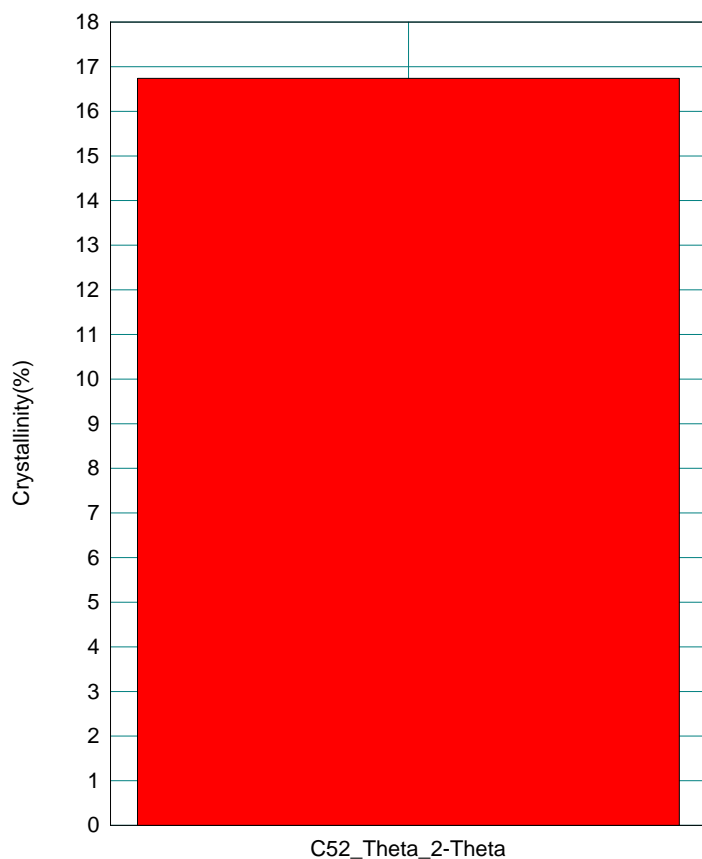


Figura 32 Cromatogramas de cristalinidad del PHB a partir del consorcio C5

El polímero presentó una cristalinidad menor que la correspondiente al consorcio C2 y mayor a la del consorcio C5 alcanzando un 17%, sin embargo el peso es de 102.09, idéntico al del consorcio C4. El consorcio C5 presento fragmentos con la misma masa molecular, ya sea a la unidad monomérica en el polímero proveniente de C2 de 102 m/z o a la fracción dimérica con una masa molecular de 172 m/z, por lo que es posible que el fragmento analizado en ambas pruebas corresponda a una masa molecular de 172 m/z y esto permita que el peso molecular sea el mismo.



*Figura 33 Porcentaje de Cristalinidad de PHB del consorcio C5*

La cristalinidad e identificación del polímero se encontró de 13 a 32° para los tres polímeros analizados, siendo estos picos los que corresponde a la estructura de PHB, lo que da una confirmación de que efectivamente el polímero almacenado en los tres consorcios corresponde al PHA conocido como PHB.

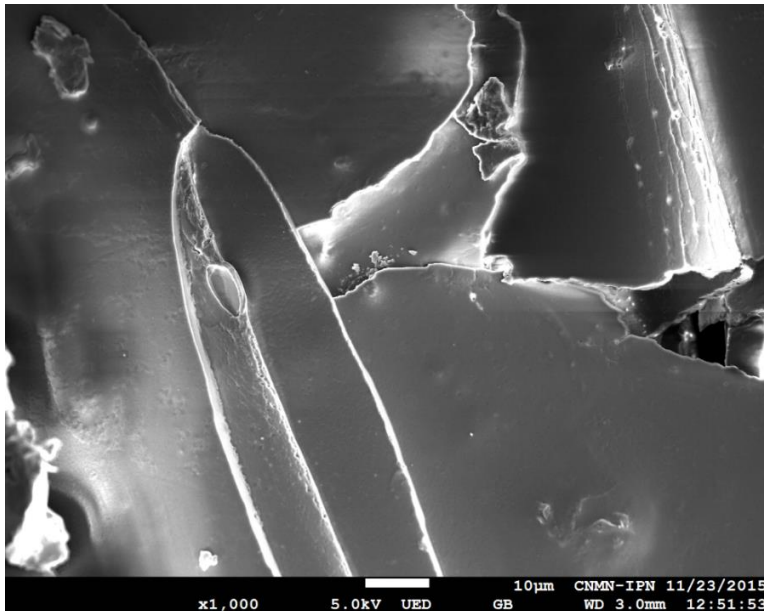
La cristalinidad baja pudo deberse a que durante el proceso de recuperación del polímero la temperatura se mantuvo lejana al punto de fusión, por lo que la formación de cristales se vio afectada. Aunado a esto los polímeros analizados fueron obtenidos a partir de distintos consorcios microbianos, los cuales sintetizaron y almacenaron el polímero de forma distinta debido a la competencia por la fuente de carbono dentro del mismo consorcio.

#### 3.3.4. Microscopia electrónica de Barrido

Se analizó la morfología del polímero median microscopia electrónica de barrido de alta resolución con acercamiento al polímero de 1000X hasta 10000X como se observa en las Figuras 34 y 35. Se observa en la Figura 34 que el polímero se encuentra completamente

cargado, ya que al tener propiedades similares a los plásticos convencionales derivados del petróleo, este funciona como aislante impidiendo la interacción y pase de los electrones, almacenándolos en la superficie.

El polímero presenta efecto borde debido a la sobre posición y fragmentación de la estructura laminar del polímero, sin embargo se puede observar homogeneidad en la estructura, lo que quiere decir que no hay adición de otros materiales en el polímero. Se ha reportado al PHB como matriz de soporte para materiales biocerámicos, donde la morfología del polímero sigue siendo laminar, a pesar de la adición de otro polímero para la formación del copolímeros y darle mayor resistencia, sin embargo las partículas cerámicas se muestran morfología irregular y se encuentran distribuidas sobre la lámina, permitiendo así el uso y evidencia del polímero como soporte (Chen, 2002), igualmente hay estudios que utilizan al PHB como matriz extracelular para la regeneración de tejidos (Deng, 2003)



*Figura 34 Morfología de polímero Microscopia a 1000 X*

Se realizó un aumento a 10,000X con el fin de observar la porosidad del polímero, misma que no fue posible evidenciar, sin embargo se localizaron fragmentos sobre la superficie del polímero, que se puede suponer que son residuos orgánicos o fragmentos del mismo polímero que no quedaron unidos a la estructura laminar



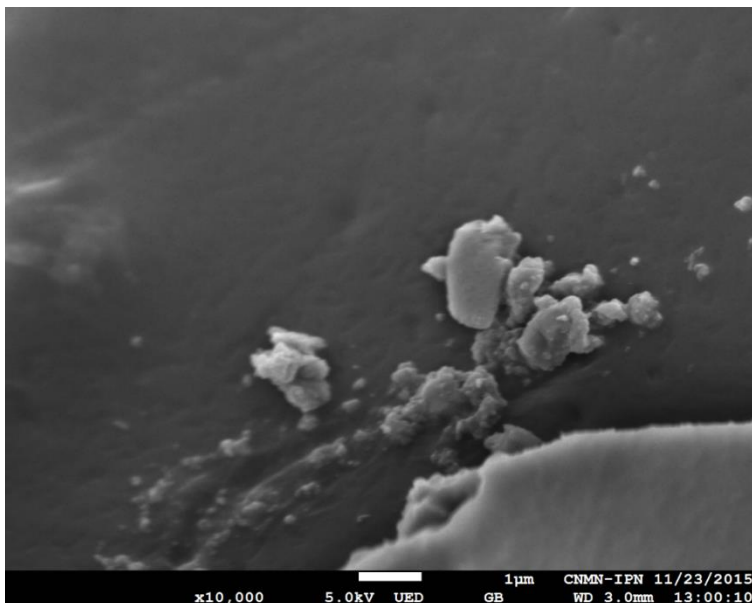


Figura 35 Morfología de polímero Microscopia a 10,000 X

#### 3.4. Análisis de las poblaciones al final del proceso

##### Pirosecuenciación

Se analizaron las poblaciones al final de proceso, con el final de evidenciar la evolución de las especies microbianas en el consorcio, así como identificar a las poblaciones productoras de PHB y su porcentaje en el consorcio.

El consorcio C2 mostro cambios en la poblaciones como se observa en la Figura 37, principalmente en el aumento en la concentración de *Dysgonomonas* alcanzando hasta un 34%, a la vez se benefició el crecimiento de *Clostridium* en un 5%, la cual esta reportada como productora de PHB junto con los *Bacteroides sp.* (Emeruwa at el 1973, Williamson 1958).

Por lo que las poblaciones productoras del biopolímero representan un 35% de las poblaciones en el consorcio, y se logró obtener hasta un 26% de acumulación de PHB.

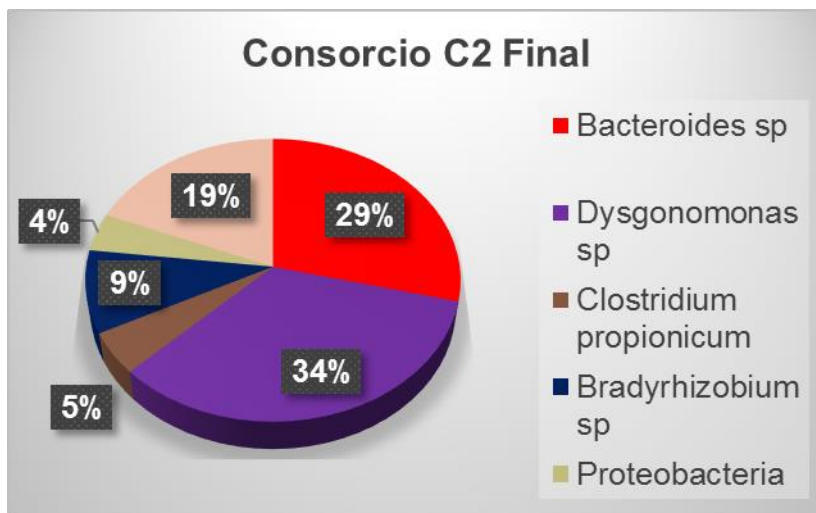


Figura 36 Poblaciones Finales consorcio C2

Las poblaciones en el consorcio C4 al final del proceso evolucionaron de forma positiva en el porcentaje que son capaces de generar PHB alcanzando hasta un 61% del total del consorcio, representadas principalmente por Clostridium en un 30% Bacteroides en 8%, Clostridia en 11% y Rhodoseudomonas palustris en 5% como se observa en la Figura 38. Este consorcio logró una acumulación de un 44% del polímero, siendo el mejor productor debido a que el porcentaje de microorganismos productores es casi el doble del consorcio C2.

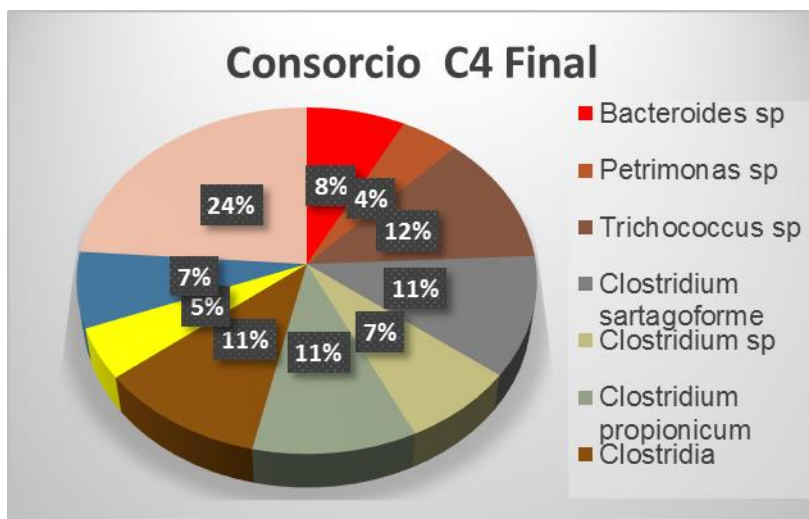


Figura 37 Poblaciones Finales consorcio C4

## 4. CONCLUSIONES

1. Los consorcios fototróficos son capaces de crecer utilizando acetato y butirato como sustrato, obteniendo un perfil de crecimiento similar y una concentración de biomasa máxima de 2.0 g/L. El butirato fue asimilado en menor proporción, alcanzando una concentración de biomasa menor (alrededor de 0.5 g/L).
2. La modelación del bioproceso permitió predecir las condiciones teóricas de crecimiento adecuadas de los consorcios, así como las de producción del polímero. En base a estos resultados, se utilizó una concentración baja (0.1g/l) de fuente de nitrógeno. Esto favoreció una mayor acumulación del polímero en los consorcios C2 y C4 (26 y 44% respectivamente).
3. Las poblaciones que acumulan el polímero se observaron mediante microscopia confocal, evidenciando la acumulación de PHB en una parte de la población microbiana. Estos datos fueron corroborados mediante la caracterización de las poblaciones al final del proceso.
4. Los datos de caracterización del polímero obtenidos mediante la técnica de MALDI-TOF mostraron la presencia de la estructura del monómero característico del PHB, lo que valida el hecho de que el polímero obtenido fue PHB.
5. Se determinó variación en los polímeros, tanto en la masa molecular como en la distribución de pesos moleculares de cada uno de los consorcios, siendo C4 el de mayor masa molecular (1313.536), superando al PHB comercial con una masa de 1058.304.
6. Los porcentajes de cristalinidad, así como la conformación del polímero, permiten establecer que el biopolímero producido a partir del consorcio C2 tiene un conformación de PHB en forma isotáctica, brindándole un mayor cristalinidad (59%).
7. Los datos de caracterización de las poblaciones (pirosecuenciación) del consorcio C2 sugiere que dos de las especies determinadas (*Bacteroides sp* y *Clostridium*) son las comunidades microbianas responsables de la producción del polímero, representando un 34% de la población del consorcio.
8. Los datos de caracterización de las poblaciones (pirosecuenciación) mostraron que el consorcio C4 contiene un 60% de poblaciones reportadas como productoras de PHB. Esto demuestra que existe un mayor número de poblaciones capaces de producir PHB y sugiere que C4 es el mejor productor de biopolímero.

## 5. REFERENCIAS

- A. J.Owen, J. H. (1991). Crystallization and melting behaviour of PHB and PHB/HV copolymer. *polymer*, 1563-1567.
- Aarthi. N, R. K. (2011). Identificaction and Characterizaion of Polyhydroxybutyrate producing Bacillus cereus anda Bacillus mycoides strains. *International Journal of Enviromental Sciences*, 744-755.
- Alistar J. Anderson, E. A. (1990). Occurrence, Metabolism, Metabolic role, and Industrial uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 450-472.
- Almeida, A. d. (2010). Análisis de cepas recombinantes de Escherichia coli productoras de poli (3-hidroxitirato): efecto de la acumulación del polímero y de la proteína PhaP sobre el metabolismo y la expresión génica. Buenos Aires, Argentina.
- Bello Gil, D., & Brandl, H. (2007). Selección de bacterias productoras de Poli-hidroxitirato ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azucar. *ICIDCA*, 10-18.
- Bingqing Wang, R. R.-S. (2012). Production of polyhydroxybutyrate(PHB) by Alcaligenes lactus using sugarbeet. *Industrial Crop and Products*, 802-811.
- Choi, J., & Lee, S. Y. (2011). Factors affecting the economics of polyhydroxyalcanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 13-21.
- Contreras, E. V. (01 de octubre de 2003). *Bioquímica y Biología molecular*. Obtenido de <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/ecuacion%20de%20michaelis4.html>
- D. Dionisi, M. B. (2005). Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1306-1318.
- D. Wendland, W. G.-H. (2005). Possibilities for controlling a PHB Accumulation process using various analytical methods. *Journal of Biotechnology*, 119-129.
- Daniel Segura, R. N. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Bioteconología*, 361-372.
- David B. Williams, C. B. (1996). *The Transmission Electron Microscope*. New York: Springer Science.
- De-Chuang Meng, Z.-Y. S.-P.-C.-Q. (2012). Production and Characterization of Poly(3-hydroxypropionate-co-4hydroxybutyrate) with fully controllable structures by recombinant Escherichia coli containing an engineered pathway. *Metabolic Engineering*, 317-324.

- Denis Semwogerere, E. R. (2005). Confocal Microscopy. En *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* (págs. 1-10). Atlanta, Georgia.
- E. I. García-Peña, R. A.-G. (2015). Hydrogen and Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by a Photoheterotrophic Mixed Culture. En L. T. Bustillos, *Microalgae and Other Phototrophic Bacteria* (págs. 109-121). New York: Nova Science Publishers.
- Eilert Hustede, E. S. (1993). Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sulphur purple bacteria. *Microbiologic Biotechnology*, 87-93.
- Emma Zribi-Malaloul, I. T. (2013). Purification and characterization of two polyhydroxyalkanoates from *Bacillus cereus*. *International journal of Biological Macromolecules*, 82-88.
- Ga-er Yu, R. H. (2000). Characterization of low molecular weight poly(B-hydroxybutyrate)s from alkaline and acid hydrolysis. *polymer*, 1087-1098.
- Giuseppe Impallomeni, G. M. (2013). Characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-butyleneadipate) copolymers obtained from their homopolymers by microwave-assisted transesterification. *polymer*, 65-74.
- H. Chen, H. M. (2013). Polyhydroxyalkanoate production from fermented volatile fatty acids: effect of pH and feeding regimes vol. 128, pp. *Bioresource Technology*, 533-538.
- Harumi Sato\*, R. M. (2006). X-ray Diffraction and Infrared Spectroscopy Studies on Crystal and Lamellar Structure and CHO Hydrogen Bonding of Biodegradable Poly(hydroxyalkanoate). *Macromolecular Research*, 408-415.
- Holt, A. G. (1982). Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-B-Hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 238-241.
- J. Kathleen Lewis, J. W. (2000). Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. En *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (págs. 5880 – 5894). USA: R.A. Meyers.
- J.C. Frandinho, J. D. (2013). Polyhydroxyalkanoates production by mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae. *Bioresource Technology*, 146-153.
- Javier M. Naranjo, J. A. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, 38-44.
- Jiang-Yu Ye, T. L.-K.-C. (2013). Effect of Al crude extract on PHB accumulation and hydrogen photoproduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *International journal of hydrogen energy*, 15770-15776.

- John Villadsen, J. N. (2011). Elemental and Redox Balances. En J. N. John Villadsen, *Bioreaction Engineering Principles* (págs. 63-118). Londres: Springer Science.
- Katja Johnson, R. K. (2010). Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *Journal of Biotechnology*, 73-79.
- Katja Johnson, Y. J. (2009). Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate Storage Capacity. *Biomacromolecules*, 670–676.
- Kumar M S, M. S. (2004). . Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewatertreatment plant. *Bioresource Technology*. *Bioresource Technology*, 327-330.
- L.J. Chen, M. W. (2002). Production and evaluation of Biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. *Biomaterials*, 2631-2639.
- Leonie Marang, Y. J. (2013). Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresource Technology*, 232-239.
- Liu, Y. Z. (2005). Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge . *Bioreosur Technology*, 1205-1214.
- Luisa S. Serafin, P. C. (2004). Optimization of Polyhydroxibutyrate Production by Mixed Cultures Submitted to Aerobic Dynamic Feeding Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 145-160.
- Mercedes Berlanga, M. T.-B. (2006). Rapid spectrofluorometric screening of polyhydroxyalkanoate producing bacteria from microbial mats. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY*, 95-102.
- Núñez-Cardona, M. T. (2003). Aislamiento y caracterización pigmentaria de las bacterias rojas del azufre de la laguna de Tampamachoco. Distrito Federal, México: Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
- Qinxue Wen, Z. C. (2010). Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. *Journal of Environmental Sciences*, 1602-1607.
- Qinxue Wen, Z. C. (2010). Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. *Journal of Enviromental Sciences*, 1602-1607.
- R. Moita, A. F. (2014). Crude glycerol as feedstock for polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *Water Research.*, 9-20.

- Reis, S. L. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess Biosyst*, 377-385.
- S. Venkata Mohan, M. V. (2010). Fermentative effluents from hydrogen producing bioreactor as substrate for poly( $\beta$ -OH) butyrate production with simultaneous treatment: an integrated approach. *Bioresource Technology*, 9382–9386.
- Schroth, L. P. (1994). Detection of Pseudomonas colonies that accumulate Poli-B-Hydroxybutyrate on Nile Blue Medium. *Plant disease*, 682-685.
- SEMARNAT. (2006). *Compendio de Estadísticas Ambientales*. México.
- Siang Chen Wu, S. Z. (2012). Correlation between bio-hydrogen production and polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis by Rhodopseudomonas palustris WP3-5. *Bioresource Technology*.
- Vasco, J. M. (25 de Mayo de 2010). PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES. Colombia.
- Ying Deng, X.-S. L.-G.-C.-Q. (2003). Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro. *Biomaterials*, 4273-4281.
- Yu-Hong Wei, W.-C. C.-S.-M. (2011). Biodegradable and Biocompatible Biomaterial, Polyhydroxybutyrate, Produced by an Indigenous Vibrio sp. BM-1 Isolated from Marine Environment. *Marine Drugs*, 615-624.