



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental: Producción de ácido propiónico con *Propionibacterium acidipropionici* CDBB-B-1981 a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de *Agave* pretratado por explosión de vapor, fue realizado del mes de diciembre del año 2020 al mes de julio del año 2022 en el laboratorio de Bioprocesos (octavo piso), Planta piloto y Planta demostrativa de Biomasa (planta baja) del Departamento de Procesos y Tecnología (DPT) de la División de Ciencias Naturales e ingeniería (DCNI).

## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 22 del mes de diciembre del año 2022, la que suscribe Veronica Elisabet Duran Cruz alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Cuajimalpa, manifiesta que es autora intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada: "Producción de ácido propiónico con *Propionibacterium acidipropionici* CDBB-B-1981 a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de *Agave* pretratado por explosión de vapor" realizada bajo la dirección de la Dra. Adela Irmene Ortíz López, y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de la Dra. Adela Irmene Ortíz López directora del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [irmene@cua.uam.mx](mailto:irmene@cua.uam.mx)

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Ing. Biol. Veronica Elisabet Duran Cruz

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La que suscribe, Veronica Elisabet Duran Cruz, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otra (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas, y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi directora, asesor y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



---

Ing. Biol. Veronica Elisabet Duran Cruz

## **DECLARACIÓN DE NO LUCRO:**

La que suscribe, Veronica Elisabet Duran Cruz, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Veronica Elisabet Duran Cruz.



---

Ing. Biol. Veronica Elisabet Duran Cruz

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Cuajimalpa

---

---



**Producción de ácido propiónico con *Propionibacterium acidipropionici* CDBB-B-1981 a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de *Agave* pretratado por explosión de vapor**

Idónea Comunicación de Resultados

Presenta:

Ing. Biol. Veronica Elisabet Duran Cruz

Para la optar por el grado de Maestra en Ciencias Naturales e Ingeniería

Directora

Dra. Adela Irmene Ortiz López

Asesor

Mtro. Miguel Sergio Hernández Jiménez

Sinodales

Dr. José Antonio Pérez Pimienta

Dra. Dolores Reyes Duarte

Dr. Juan Carlos Sigala Alanis



Ciudad de México, México, diciembre 2022

## Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana por los apoyos otorgados para mi formación académica.

A CONACYT por la beca otorgada con CVU 1023688 para estudios de maestría.

A la Dra. Irmene por la dirección de este proyecto, por las enseñanzas y correcciones, por todo el apoyo académico, pero sobre todo el personal, le agradezco infinitamente.

Al Mtro. Sergio por su asesoría, por sus consejos para superar las adversidades, sus pláticas y risas, por su guía desde la licenciatura, sin ella no estaría ahora donde estoy.

Al Dr. Arellano por la gestión para la obtención del bagazo de *Agave*.

A mi madre, con mucho amor, por todo lo que me ha motivado y enseñado en esta vida, por su cariño y sobre todo su paciencia.

A mi padre, por todas sus palabras de aliento, por ser mi ejemplo a seguir, por enseñarme a nunca rendirme y siempre seguir a mi corazón.

A Carlos, por ser mi apoyo incondicional y mi compañero de vida, por el amor, por escucharme y por sus ánimos.

A mi hermano y su familia por alentarme a ser mejor, por los abrazos y por el cariño que me dan.

A mi familia, en especial a mis primas Claus, Leslie y Mitzi, a mis tías Mirna, Alma, Rome, Eli y Sergio por la motivación, las pláticas y ayuda para poder llevar a cabo mis estudios de maestría.

A Adriana Casanova, Mauricio Carrasco y Brenda Rodríguez por su apoyo, compañerismo y amistad tanto en el laboratorio como fuera de él.

A mis amigos, los tulios, los del CBTis, los de la UMAR, Rocío, Xat y Dulce, por todo su apoyo y porras, por todas las veces que me queje y me escucharon, por su amistad, por su ayuda en los tiempos buenos y también en los tiempos malos, porque a pesar del tiempo y la distancia siguen ahí.



## Dedicatoria

*A mi padre*

## Tabla de contenido

Índice de tablas.....	1
Índice de figuras.....	2
Nomenclatura.....	3
Resumen.....	4
Introducción .....	5
Capítulo I. Marco teórico.....	7
I.I Potencial de las biorrefinerías .....	7
I.I.I Biomosas potenciales para la biorrefinería.....	8
I.I.II Biomasa lignocelulósica como materia prima .....	9
I.II Revalorización de residuos lignocelulósicos .....	12
I.II.I Proceso de producción de tequila.....	13
I.II.II Bagazo de <i>Agave</i> .....	14
I.II.III Pretratamiento.....	14
I.II.IV Hidrólisis enzimática .....	17
I.III Ácido propiónico como producto potencial a partir de bagazo de <i>Agave</i> .....	17
I.III.I Propiedades de ácido propiónico.....	18
I.III.II Usos del ácido propiónico.....	19
I.III.III Métodos de obtención del ácido propiónico.....	19
I.III.IV Microorganismos productores .....	20
I.III.V <i>Propionibacterium acidipropionici</i> CDBB-B-1981 .....	20
I.III.VI Condiciones de fermentación.....	22
Capitulo II. Planteamiento del problema.....	23
II.I Hipótesis .....	23
II.II Justificación.....	23
II.III Objetivo general.....	24
II.IV Objetivos particulares.....	24
Capitulo III. Materiales y métodos .....	25
III.I Estrategia de experimentación.....	25
III.II Biomasa.....	25

III.II.I Caracterización de la biomasa .....	26
III.II.II Caracterización de las fases líquidas.....	27
III.III Pretratamiento .....	27
III.IV Hidrólisis enzimática .....	29
III.V Microorganismo y medio de cultivo.....	29
III.V.I Preparación del inóculo.....	30
III.V.II Fermentación .....	30
III.V.III Métodos analíticos.....	32
III.VI. Cálculos de rendimientos y análisis de datos.....	32
Capitulo IV. Resultados y discusión.....	34
IV.I Caracterización de la biomasa inicial.....	34
IV.II Evaluación de las condiciones de pretratamiento.....	35
IV.III Evaluación de las condiciones de la hidrólisis enzimática.....	36
IV.III.I Rendimientos de azúcares y DQO .....	37
IV.III.II Sacarificación y actividad enzimática.....	43
IV.IV Composición del bagazo de <i>Agave</i> después de cada etapa.....	44
IV.V Evaluación de las condiciones de fermentación .....	46
IV.VI Pruebas de fermentación en biorreactor con medio de cultivo modelo.....	48
IV.VII Pruebas de fermentación en biorreactor con hidrolizados.....	49
Capitulo V. Conclusiones .....	53
V.I Perspectivas.....	54
Referencias .....	55
Anexos.....	64
Anexo 1. Clasificación y estructura de las biorrefinerías .....	64
Anexo 2. Clasificación de los pretratamientos.....	66
Anexo 3. Productos potenciales a partir de los hidrolizados del bagazo de <i>Agave</i> ..	68
Anexo 4. Estudios del AP para prevención y tratamiento de enfermedades.....	72
Anexo 5. Curvas estándar de las metodologías .....	73

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de la biomasa de acuerdo a su origen. ....	8
Tabla 2.- Composición del BA nativo.....	34
Tabla 3. Rendimientos de AT obtenidos del BA pretratado y/o hidrolizado enzimáticamente.....	38
Tabla 4. Porcentaje de sacarificación a diferentes condiciones de HE. ....	43
Tabla 5. Actividad enzimática de las celulasas y hemicelulasas a diferentes condiciones.....	44
Tabla 6. Comparación de los azúcares obtenidos después de cada etapa. ....	45
Tabla 7. Comparación de los parámetros cinéticos de la fermentación empleando medio de cultivo modelo en botellas serológicas y en el biorreactor. ....	49
Tabla 8. Comparación de rendimientos de AP con la literatura. ....	51

## Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de la propuesta de biorrefinería.....	8
Figura 2. Estructura de la biomasa lignocelulósica. ....	9
Figura 3. Estructura de la celulosa. ....	10
Figura 4. Bloques de construcción de la hemicelulosa.....	11
Figura 5. Estructura y bloques de construcción de la lignina.....	12
Figura 6. Estructura química del AP.....	18
Figura 7. Vías metabólicas de <i>Propionibacterium acidipropionici</i> CDBB-B-1981.....	21
Figura 8. Estrategia de experimentación para la producción de AP a partir de BA.....	25
Figura 9. Esquema del reactor del pretratamiento por explosión de vapor.....	28
Figura 10. Sistema de producción de AP .....	31
Figura 11. Comparación de los rendimientos de la etapa 1 (blanco) y la etapa 2 (gris) de AT (▨), Glu (▩), Xil (▧), DQO (▣). ....	36
Figura 12. Rendimientos de AT a diferentes concentraciones enzimáticas y porcentajes de sólidos. 1x (18.3 FPU/g <sub>BA</sub> ) 1.5x (27.4 FPU/g <sub>BA</sub> ) y 3x (54.8 FPU/g <sub>BA</sub> )... 37	
Figura 13. Rendimientos de Glu a diferentes concentraciones enzimáticas y porcentajes de sólidos. 1x (18.3 FPU/g <sub>BA</sub> ) 1.5x (27.4 FPU/g <sub>BA</sub> ) y 3x (54.8 FPU/g <sub>BA</sub> )... 39	
Figura 14. Rendimientos de Xil a diferentes concentraciones enzimáticas y porcentajes de sólidos. 1x (18.3 FPU/g <sub>BA</sub> ) 1.5x (27.4 FPU/g <sub>BA</sub> ) y 3x (54.8 FPU/g <sub>BA</sub> )..... 41	
Figura 15. Rendimientos de DQO a diferentes concentraciones enzimáticas y porcentajes de sólidos. 1x (18.3 FPU/g <sub>BA</sub> ) 1.5x (27.4 FPU/g <sub>BA</sub> ) y 3x (54.8 FPU/g <sub>BA</sub> )... 42	
Figura 16. Comparación de la composición después de cada etapa. .... 45	
Figura 17.- Producción de AP con medio de cultivo modelo en botellas serológicas A) Consumo de azúcares reductores B) Producción de AP, consumo de AT y crecimiento bacteriano. Glu (■), Xil (●), Gal y Man (▲), Ara (▼), AT (■), AP (●), peso seco de bacterias (▲). .... 47	
Figura 18. Producción de AP con medio de cultivo modelo en el biorreactor A) Consumo de azúcares reductores B) Producción de AP, consumo de AT y crecimiento bacteriano. Glu (■), Xil (●), Gal y Man (▲), Ara (▼), AT (■), AP (●) y peso seco de bacterias (▲). .... 48	
Figura 19. Producción de AP con hidrolizados de BA en el biorreactor A) Consumo de azúcares reductores B) Producción de AP, consumo de AT y crecimiento bacteriano. Glu (■), Xil (●), Gal y Man (▲), Ara (▼), AT (■), AP (●) y peso seco de bacterias (▲). .... 50	

## Nomenclatura

ABE: Acetona, Butanol y Etanol

AFEX: Explosión de fibra de amoníaco

AP: Ácido propiónico

Ara: Arabinosa

AT: Azúcares totales

BA: Bagazo de *Agave*

BL: Biomasa lignocelulósica

DQO: Demanda química de oxígeno

FPU: Unidad de papel filtro

FS: Factor de severidad

Gal: Galactosa

Glu: Glucosa

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfúrico

HE: Hidrólisis enzimática

HMF: Hidroximetilfurfural

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

IBE: Isopropanol, Butanol y Etanol

LI: Líquido iónico

Man: Manosa

NaOH: Hidróxido de sodio

P(3HB-co-4HB): Poli (3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato)

PHB: Polihidroxi-butirato

PT: Pretratamiento

t<sub>d</sub>: Tiempo de duplicación

Xil: Xilosa

Y<sub>p/s</sub>: Rendimiento producto-sustrato

Y<sub>x/s</sub>: Rendimiento biomasa-sustrato

μ: Velocidad específica de crecimiento

## Resumen

Se evaluó el aprovechamiento de bagazo de *Agave*, un residuo lignocelulósico de industria tequilera, para la producción de ácido propiónico por *Propionibacterium acidipropionici* CDBB-B-1981. Se evaluaron diferentes porcentajes de sólidos en el pretratamiento por explosión de vapor (primera etapa) y en la hidrólisis enzimática (segunda etapa). Las condiciones probadas en el pretratamiento fueron 142°C (4 kg<sub>f</sub>/cm<sup>2</sup>) por 15 min con porcentajes de sólidos de 2.75 y 5% y con porcentajes de sólidos de 2.5, 3.75 y 5% en la hidrólisis enzimática. Adicionalmente, se evaluaron tres concentraciones enzimáticas de Cellic® CTec2 (1x, 1.5x y 3x). Se caracterizó el bagazo de *Agave* después de cada etapa. Los hidrolizados con mayores rendimientos se utilizaron para la producción de ácido propiónico por *Propionibacterium acidipropionici* CDBB-B-1981 a 30°C, pH 6 y 80 rpm en un biorreactor ChemGlass® de 1 L (CG-1949-X-1DM). Adicionalmente, se hicieron pruebas en botellas serológicas y en el reactor utilizando medio de cultivo modelo para la validación de las condiciones de fermentación mencionadas anteriormente. El incremento en el porcentaje de sólidos, tanto en el pretratamiento como en la hidrólisis enzimática, permitió la obtención de mayores concentraciones de azúcares (g/L). Pese a esto, los rendimientos de azúcares (g/g BA) a los diferentes porcentajes de sólidos en el pretratamiento no fueron significativamente diferentes entre sí. Por otro lado, la utilización de la concentración enzimática 3x (54.8 FPU/g BA) en la hidrólisis enzimática con 2.5% de sólidos, permitió obtener los rendimientos más altos de glucosa y xilosa (0.15±0.01 y 0.03±0.01 g/g BA, respectivamente). Por lo anterior, los hidrolizados obtenidos a dichas condiciones fueron utilizados para la producción de ácido propiónico en el fermentador, obteniendo un rendimiento de 0.44 g<sub>AP</sub>/g<sub>AT</sub>, el cual es comparable con los rendimientos obtenidos con medio de cultivo modelo y lo reportado en la literatura. Los resultados obtenidos indicaron que los hidrolizados de bagazo de *Agave* pretratado con explosión de vapor y su posterior hidrólisis enzimática pueden servir como fuente de carbono para la producción de ácido propiónico por *P. acidipropionici* CDBB-B-1981.

## Introducción

En la actualidad existen problemas ambientales derivados del consumo excesivo de recursos naturales y la mala disposición de los residuos agroindustriales, por lo que se ha evaluado la implementación de biorrefinerías para el procesamiento sustentable de residuos, en donde se produzcan biocombustibles y otros bio-productos.

Un potencial bio-producto es el ácido propiónico, que es un ácido graso de cadena corta que puede ser utilizado como conservador, precursor de herbicidas, intermediarios de perfumes, productos farmacéuticos, productos químicos de caucho o emulsiones, entre otras aplicaciones. Su producción mundial es aproximadamente de 450 mil toneladas por año con un crecimiento de 2.7 % por lo que se deben considerar distintas estrategias para cubrir su demanda de manera sustentable (Gonzalez-Garcia et al., 2017).

Las biorrefinerías pueden utilizar distintos tipos de biomásas como: cultivos y residuos de la agricultura; madera, sus productos derivados y residuos; residuos de la industria y de las actividades domésticas (residuos de proceso y desechos); microalgas y algas marinas. Dentro de éstas, se encuentra la biomasa lignocelulósica que es considerada el recurso más disponible de la tierra y presenta la ventaja de no poner en riesgo la seguridad ni soberanía alimentaria (Bajpai, 2016).

En México, el bagazo de *Agave* se ha identificado como un residuo agroindustrial con potencial para ser usado como materia prima en la producción de ácido propiónico, ya que se estima que se producen cerca de 865,640 toneladas por año (Consejo regulador del tequila [CTR], 2021; Cedeño, 1995). Sin embargo, es altamente recalcitrante debido a su composición (celulosa, hemicelulosa y lignina), por lo que para su aprovechamiento se debe llevar a cabo un pretratamiento y una hidrólisis enzimática, con el objetivo de obtener azúcares reductores para su conversión a los productos de interés mediante fermentación.

En este trabajo se utilizó un pretratamiento por explosión de vapor que consiste en poner en contacto la biomasa lignocelulósica con vapor saturado a temperaturas entre de 160 a 240°C durante algunos minutos seguido de una descompresión súbita,



promoviendo la autohidrólisis de hemicelulosa y la ruptura de fibras vegetales (Bajpai, 2016). Posteriormente, se realizó una hidrólisis enzimática donde se favoreció la obtención de azúcares reductores, que fueron consumidos en una fermentación por *P. acidipropionici* para producir ácido propiónico.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de los hidrolizados enzimáticos del bagazo de *Agave* pretratado por explosión de vapor, para la producción de ácido propiónico con *P. acidipropionici* CDBB-B-1981 en reactores a escala laboratorio.

## Capítulo I. Marco teórico

### I.I Potencial de las biorrefinerías

La contaminación ambiental y la sobreexplotación de recursos naturales son problemas mundiales actuales. Primeramente, existe un consumo excesivo de recursos, derivado de la sobrepoblación y de una cultura de consumismo que se encuentra marcada en la sociedad actual. Esto conlleva a una generación excesiva de residuos agroindustriales, y aunque se han llevado a cabo estrategias para su reutilización, éstas no son suficientes para lidiar con las problemáticas. Una de las soluciones interesantes para resolverlas, es la generación de bio-productos hechos a partir de residuos. Por una parte, ayuda a cubrir la demanda de producción de diversos compuestos en la industria de manera sustentable y por otra, fomenta la reutilización eficiente de residuos. Una opción factible para llevar esto a cabo es la implementación de biorrefinerías.

La biorrefinación es el procesamiento sustentable de biomasa para su transformación en un espectro de productos de interés comercial y energía (Jungmeier et al., 2009). Para el diseño de una biorrefinería existen diversas variables a considerar, tales como: producto, biomasa (materia prima), plataforma o proceso. En el Anexo 1, se explica detalladamente las diversas plataformas y estructuras de las biorrefinerías, así como las distintas estrategias para la obtención de productos, biocombustibles y energía.

La propuesta de este estudio es lograr la producción de algún metabolito de interés a partir de un residuo agroindustrial, utilizando como procesos: un pretratamiento termoquímico y un tratamiento bioquímico. En la Figura 1 se encuentra representada la biorrefinería propuesta de 2 plataformas (lignina y azúcares C5 y C6) para la producción de ácido propiónico a partir de biomasa lignocelulósica (BL). En estudios previos se utilizó esta estrategia para la producción de metano, obteniendo resultados comparables con otras estrategias con diferentes materias primas y procesos (Duran-Cruz et al., 2021).

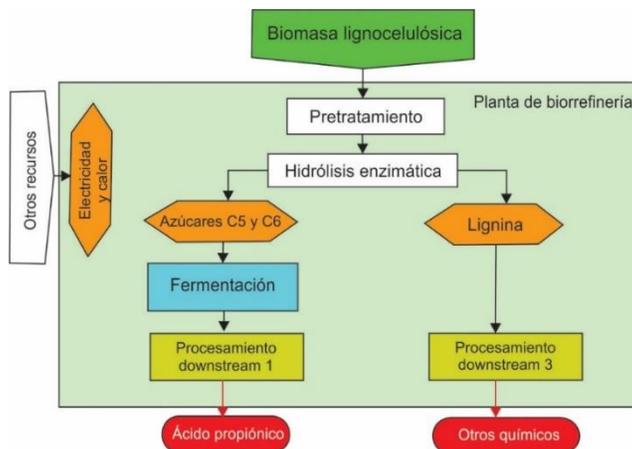


Figura 1. Diagrama de la propuesta de biorrefinería. Elaboración propia basada en: Jungmeier et al., 2009

### I.I.I Biomásas potenciales para la biorrefinería

El término de biomasa es bastante amplio, ya que considera cualquier tipo de materia orgánica que haya tenido origen inmediato de un proceso biológico de organismos recientemente vivos (Salinas & Gasca, 2009). Esto puede considerarse desde un microorganismo (como microalgas), plantas, desechos de animales o residuos de las actividades humanas. Se pueden obtener de: agricultura; silvicultura; industria y actividades domésticas; acuicultura. La biomasa se ha clasificado primordialmente en dos: materia prima dedicada y residuos, que se subdividen como se muestran en la Tabla 1. Los diferentes tipos de biomasa varían en sus componentes básicos (carbohidratos, lignina, proteínas o lípidos), sin embargo, todas son ricas en carbono, hidrógeno y oxígeno (con porcentajes más pequeños de nitrógeno y azufre).

Tabla 1. Clasificación de la biomasa de acuerdo a su origen.

Clasificación	Subclasificación	Ejemplos
<b>Materia prima dedicada</b>	Cultivos de azúcar	• Caña de azúcar • Sorgo dulce
	Cultivos de almidón	• Yuca • Maíz
	Cultivos lignocelulósicos	• Madera • <i>Arundo donax</i>
	Cultivos oleaginosos	• Girasoles • <i>Jatropha curcas</i>
	Hierbas	• Zacate Timothy • <i>Phalaris canariensis</i>
	Biomasa marina	• Microalgas • Sargazo
<b>Residuos</b>	Residuos aceitosos	• Aceites de cocina • Grasa animal de rastros
	Residuos lignocelulósicos	• Bagazo de caña • Olote de maíz
	Residuos orgánicos y otros	• Estiércol • Residuos sólidos orgánicos

## I.I.II Biomasa lignocelulósica como materia prima

Existen una gran diversidad de biomazas para utilizar como materia prima para la producción de biocombustibles y bioproductos, sin embargo, la BL es el recurso más disponible en la tierra, además de que no presenta competitividad con el suministro de alimentos y tiene bajo costo (Bajpai, 2016). Su composición está basada en biopolímeros ricos en energía; celulosa, hemicelulosa y lignina (Singhvi & Gokhale, 2019). Los cuales están distribuidos de manera desigual en la pared celular como esqueleto (celulosa), material de unión (hemicelulosa) y sólidos duros (lignina) como se muestran en la Figura 2. Las microfibras formadas por celulosa, en su espacio interior se encuentran llenas de hemicelulosa amorfa y lignina sólida dura (Wang & Luo, 2017). La conexión de la celulosa con moléculas de hemicelulosa y lignina por lo general se debe a puentes de hidrógeno, mientras que la conexión entre estas últimas dos se debe además a enlaces covalentes (Wang et al., 2017). El contenido de celulosa en la BL varía entre 40-60 %, hemicelulosa de 15-30 % y lignina de 10-25 % (peso/peso) según el tipo de biomasa e inclusive por la especie utilizada. Adicionalmente, contienen en cantidades más pequeñas proteína, extractivos y cenizas. Los extractivos son compuestos no estructurales, que incluyen principalmente parafina, grasa, resina, taninos, almidón y pigmentos, etc. Además, existen algunas sales metálicas inorgánicas, principalmente compuestas por sales de metales alcalinos y alcalinotérreos (Wang & Luo, 2017).

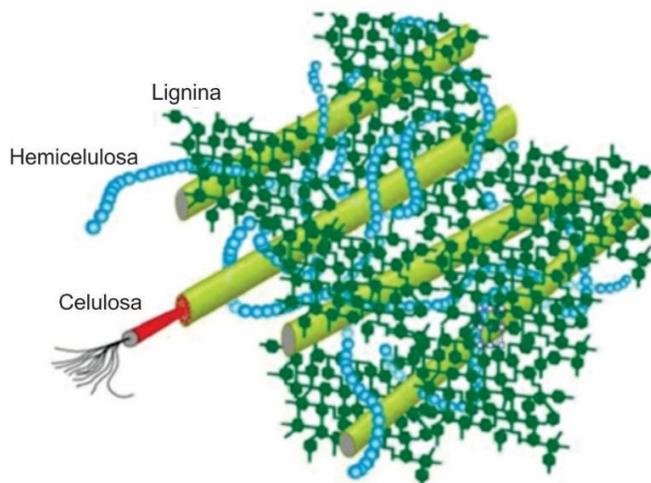


Figura 2. Estructura de la biomasa lignocelulósica. Modificado de: Wang & Luo, 2017.

### I.I.I.I Celulosa

La celulosa es el polisacárido más abundante de la tierra, ya que es el principal componente de la pared celular vegetal que le confiere soporte estructural, además de estar presente en bacterias, hongos y algas (Bajpai, 2016). Está constituida de largas cadenas de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos, las cuales se encuentran unidas entre sí por fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno (por los grupos hidroxilo de la molécula de glucosa) agrupándose de 20 a 300 cadenas formando así microfibrillas, que a su vez se asocian en fibras de celulosa (Figura 3).

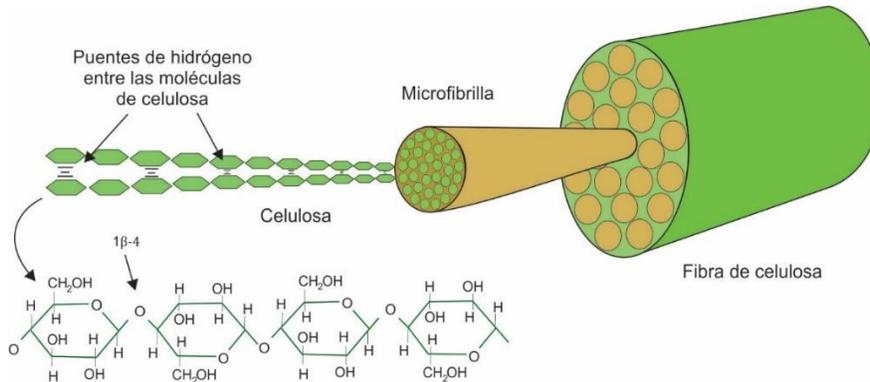


Figura 3. Estructura de la celulosa. Adaptado de: Escuela Nacional Colegio de Ciencias y Humanidades, 2022

A partir de la celulosa se puede obtener D-glucosa mediante la hidrólisis ácida o enzimática que rompe los enlaces  $\beta$ -glucosídicos. En la biomasa, la celulosa se presenta en dos formas: cristalina y amorfa, ésta contiene mayor proporción de celulosa cristalina con un porcentaje pequeño de cadenas de celulosa desorganizadas que forman celulosa amorfa. Este desorden es debido a la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas de manera no lineal, generando bucles o enlaces entre la misma cadena, la cual es la forma más susceptible a la degradación enzimática (Bajpai, 2016).

### I.I.I.II Hemicelulosa

La hemicelulosa tiene una estructura amorfa y ramificada compuesta por heteropolisacáridos de cadena corta (Figura 4). Los monosacáridos constituyentes se clasifican en dos: hexosas y pentosas, las primeras incluyen: glucosa, manosa, galactosa

y fructosa, mientras que las pentosas: xilosa, ramnosa y arabinosa. También suelen contener en la estructura grupos acetilo y algunos ácidos urónicos como: ácido 4-O-metil-d-glucurónico, ácido d-glucurónico y ácido d-galacturónico.

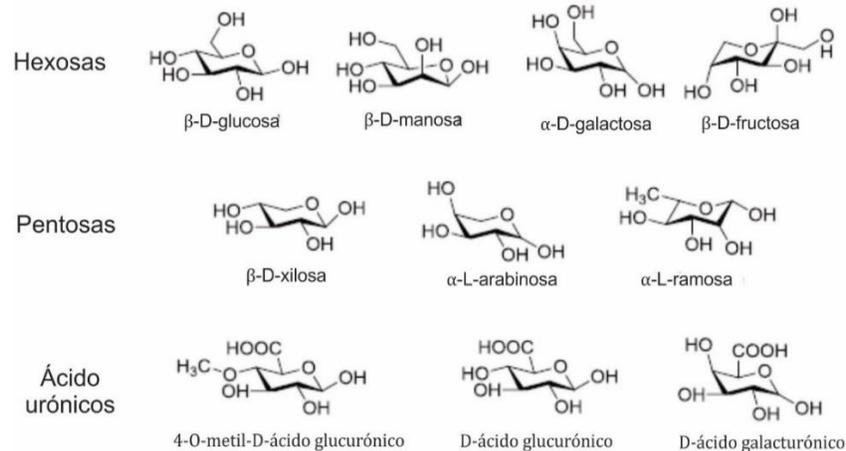


Figura 4. Bloques de construcción de la hemicelulosa. Elaboración propia.

La columna vertebral de la hemicelulosa es un homopolímero o un heteropolímero con ramas cortas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos y ocasionalmente  $\beta$ -1,3-glucosídicos (Bajpai, 2016). Debido a su estructura, es considerada termoquímicamente sensible, ya que con el aumento de temperatura se promueve su autohidrólisis. Las plantas de madera dura, madera blanda y herbáceas tienen contenidos de hemicelulosa de 10-15 %, 18-23 % y 20-25 % (p/p), respectivamente (Wang et al., 2017).

### I.II.III Lignina

La lignina se encuentra entrelazada mediante uniones celulosa-hemicelulosa que hace resistente a la BL a alteraciones físicas y biológicas, es un polímero tridimensional que proporciona fuerza y resistencia a la planta contra insectos y patógenos. Su estructura es compleja y desordenada, constituida por polímeros reticulados de monómeros fenólicos (Figura 5), éstos son tres alcoholes fenilpropiónicos: alcohol de coniferílico (guaiacil propanol), alcohol p-cumarílico (p-hidroxifenil propanol) y alcohol sinapílico (alcohol siringílico).

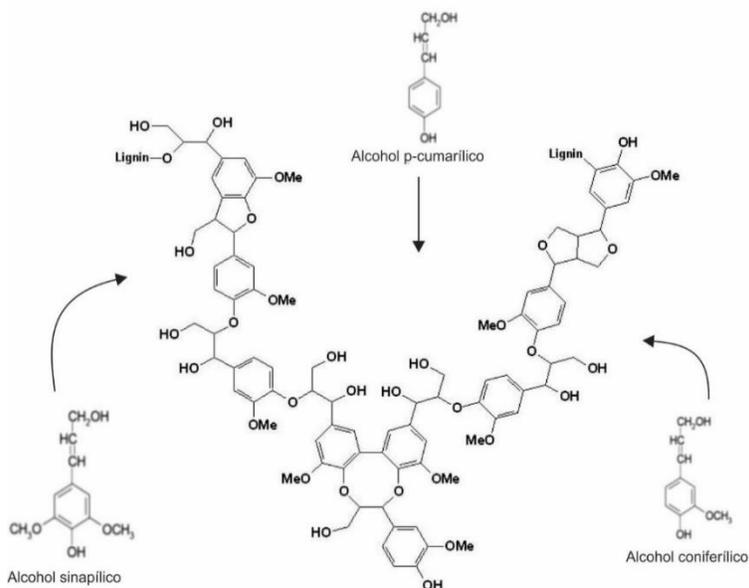


Figura 5. Estructura y bloques deconstrucción de la lignina. Modificado de: Bajpai, 2016.

Los enlaces alquil-arilo, alquil-alquilo y aril-aril éter unen estos monómeros fenólicos entre sí. En general, las plantas herbáceas tienen menor contenido de lignina, mientras que las maderas blandas tienen mayor contenido de lignina, la cual actúa como pegamento que mantiene unidos los componentes de la pared celular, lo que ayuda a conservar su integridad, sin embargo, es considerado como un obstáculo en economía del proceso de biomasa (Bajpai, 2016).

### **I.II Revalorización de residuos lignocelulósicos**

La BL tiene potencial para ser utilizada como materia prima para la generación de biocombustibles y bio-productos. En México, se tienen diversos recursos de biomasa, por ejemplo, se estima que se generan anualmente 30 millones de toneladas de residuos sólidos, 71 millones toneladas de residuos agrícolas y agroindustriales y 3.6 millones toneladas de residuos forestales (Martínez, 2015).

La agroindustria mexicana es muy diversa, genera productos que se industrializan como: verduras, frutas, tubérculos, vainas, semillas, raíces y hojas. Aunque éstos también son transformados en diversos productos procesados, se generan residuos, desde la cosecha, almacenaje, distribución, procesamiento, comercialización hasta su

consumo. En su mayoría los residuos agroindustriales corresponden a BL que, a pesar de su recalcitrancia, es posible la obtención de monosacáridos mediante procesos físicos, químicos, biológicos o combinaciones de ellos.

La acumulación derivada de la generación y mala disposición de residuos agroindustriales, provoca distintas problemáticas ambientales tales como:

- Rápido incremento en la contaminación (Mejías-Brizuela et al., 2016).
  - Aire: contaminantes atmosféricos
    - Emisión de gases de efecto invernadero (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y NO<sub>2</sub>) por la descomposición de los residuos.
    - Emisión por la práctica de quemar los residuos para ocuparlos como fuente de energía y/o calor.
  - Suelo: a través de los residuos sólidos, aguas residuales y productos químicos usados.
  - Agua: contaminación de cauces, acuíferos y mares.
- Problemas de salud derivados de los vertederos a cielo abierto, donde se alienta a la proliferación de vectores epidémicos como lo son la fauna nociva.

### **I.II.I Proceso de producción de tequila**

En México, la industria tequilera es una de las más importantes. El tequila es un producto que se elabora a partir de *Agave tequilana* Weber variedad azul y se distingue por tener denominación de origen, la cual está delimitada por 181 municipios que se encuentran en cinco estados (Jalisco, Guanajuato, Michoacán de Ocampo, Nayarit y Tamaulipas), sin embargo, el mayor porcentaje de producción se encuentra en Jalisco (76.6 %) (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2019). La producción de tequila de 40 % Alc. Vol. en 2021 fue de 527 millones de litros con un aumento del 29 %, respecto al año anterior, teniendo así un consumo de *Agave* por esta industria de 2,018.7 miles de toneladas (CTR, 2022). Donde la composición (p/p) de las pencas del *Agave* tiene un 79.8 % de celulosa, 3-6 % de hemicelulosa y 15.3 % de lignina (Abreu, 2013).

El proceso para la obtención del tequila empieza con el crecimiento del *Agave*, éste tarda de 7 a 10 años, una vez maduro se procede a jimar, que es el corte de las hojas al ras de la base, después viene la cocción, con la finalidad de convertir la inulina en azúcares fermentables, para posteriormente pasar a la molienda para extraer los azúcares. Los extractos son fermentados, destilados y madurados. En el proceso de molienda se genera un residuo de la penca prensada y exprimida llamado bagazo de *Agave* (BA).

### **I.II.II Bagazo de *Agave***

De acuerdo a Cedeño (1995) se estima que el peso húmedo del bagazo representa el 40 % del peso total de la cabeza de *Agave* procesada. Por lo que de acuerdo a lo registrado en 2021 se produjeron aproximadamente 807,480 toneladas de BA. La mala disposición de estos residuos conlleva al aumento de las problemáticas ambientales antes mencionadas en la sección I.II.; Por esta razón se han propuesto acciones para el aprovechamiento de este desecho como su co-procesamiento, producción de composta, productos, sub-productos de alto valor agregado y biocombustibles.

Su composición (p/p) ha sido reportada con  $46\pm 1$  % de celulosa,  $23.1\pm 1$  % de hemicelulosa,  $15.2\pm 1$  % de lignina,  $6.8\pm 1.4$  % de extractos totales,  $4.3\pm 1.2$  % de humedad y  $2.9\pm 1.2$  % de cenizas (Hernández-Vázquez et al., 2020). Debido a su naturaleza recalcitrante al ser un material lignocelulósico, para su aprovechamiento se deben realizar dos etapas de proceso, la primera comprende un pretratamiento y la segunda una hidrólisis enzimática (HE) para obtener azúcares fermentables.

### **I.II.III Pretratamiento**

El pretratamiento (PT) tiene como principales objetivos: aumentar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa y promover su descristalización, el desenrollado de la celulosa y la hemicelulosa, así como la solubilización de la hemicelulosa y la lignina, la modificación estructural de la lignina y aumentar la ruptura enzimática de la biomasa pretratada (Preeti et al., 2018).

De tal manera que para aumentar la digestibilidad de la celulosa se ha propuesto que debe eliminarse al menos el 50 % de la hemicelulosa. Sin embargo, la severidad del

proceso (temperaturas altas, pH bajos o altos) debe optimizarse cuidadosamente para evitar la degradación de azúcares y la formación de compuestos tóxicos o inhibidores (por ejemplo, furfural, hidroximetilfurfural, ácidos orgánicos) que pueden tener efectos negativos en las etapas de HE y fermentación (Bajpai, 2016).

La presencia de lignina limita la HE debido a que produce una barrera física para el acoplamiento de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa, así como la adsorción y bloqueo de la actividad de celulasas de manera no específica e inhibición de enzimas hidrolíticas (Preeti et al., 2018). Por lo que el PT se vuelve el paso fundamental para mejorar la HE, y por ende la generación de azúcares.

Los PT se pueden clasificar en físicos, químicos y biológicos, aunque también se puede tener una combinación de estos métodos que resulta ser más efectiva para mejorar la digestibilidad (Bajpai, 2016). No existe un PT ideal, todos tienen ventajas y desventajas. En general, los PT físicos presentan ventajas en aumentar el área de contacto, que mejora en etapas posteriores la obtención de azúcares, sin embargo, suelen ser costosas y requieren de utilizar PT complementarios. Mientras que los pretratamientos químicos presentan mayor hidrólisis de los componentes de la BL, pero forman inhibidores y requieren de procesos downstream para neutralizar o recuperar los químicos. Y finalmente, los biológicos que, si bien no forman inhibidores y tienen bajo consumo de energía, son procesos lentos. Una discusión más detallada de los diversos pretratamientos, sus características, ventajas y desventajas, se encuentran en el Anexo 2.

#### **I.II.III.I Explosión de vapor**

El PT más estudiado a nivel laboratorio, en plantas de demostración y comerciales es la explosión de vapor. Este se lleva a cabo en un reactor presurizado que contiene en su interior la biomasa y vapor saturado para alcanzar presiones de 5-50 kgf cm<sup>-2</sup> y temperaturas entre 160-250°C durante segundos o minutos (Abraham et al., 2019). Una vez alcanzado las condiciones deseadas se despresuriza el sistema de manera súbita. Con el cambio de presión, el vapor que se encontraba dentro del reactor se despresuriza súbitamente, provocando que las fibras se rompan.

La explosión de vapor promueve la autohidrólisis de la hemicelulosa que se solubiliza en la fase líquida. Dicha hidrólisis se ha asociado a la generación de ácido acético producido a partir de grupos acetilo relacionados a la hemicelulosa durante el PT, dando como resultado la liberación de monosacáridos y oligómeros en los hidrolizados, así como la ruptura de los enlaces éster de la lignina, por lo que ésta se degrada parcialmente (Chen, 2015).

La solubilización óptima e hidrólisis de la hemicelulosa puede ser obtenida a altas temperaturas y bajos tiempos de residencia (270°C, 1 min) o bajas temperaturas y largos tiempos de residencia (190°C, 10 min). Se ha comprobado que las bajas temperaturas y tiempos de residencia largos son prometedores porque evitan la formación de inhibidores (Bajpai, 2016).

Los principales efectos del proceso de explosión de vapor sobre la biomasa son: reducción del grado de polimerización, rotura mecánica de las fibras, deconstrucción de las regiones amorfas, destrucción parcial de las regiones cristalinas, destrucción de los enlaces de hidrógeno y reordenamiento estructural.

Este PT no utiliza productos catalizadores ácidos ni básicos, solo requiere agua para solubilizar y despolimerizar la hemicelulosa en los hidrolizados. Entonces, la explosión de vapor puede considerarse un proceso respetuoso con el medio ambiente (Aguilar et al., 2018). Además, la generación de inhibidores es menor en este caso comparado con los pretratamientos químicos.

Otras ventajas de la explosión de vapor incluyen un impacto ambiental significativamente menor y una menor inversión de capital en comparación con otros pretratamientos líderes. En cambio, la principal desventaja es el requerimiento de energía para lograr las condiciones operativas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el PT por explosión de vapor de BA para la producción de metano es energéticamente factible (Hernández-Vázquez et al., 2020).

### **I.II.IV Hidrólisis enzimática**

Posterior al PT se requiere de una HE, para lo cual se utiliza un coctel enzimático de celulasas y hemicelulasas. Este proceso puede ser llevado a cabo con enzimas comerciales o bien por enzimas producidas por microorganismos para liberar los azúcares para la fermentación.

Las celulasas son las enzimas que hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 en las cadenas de celulosa para convertirla en glucosa. Estas enzimas hidrolíticas están conformadas por endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas. La endoglucanasa corta al azar los enlaces  $\beta$ -1,4 de las cadenas de celulosa, generando nuevos extremos. Las exoglucanasas actúan de manera progresiva en los extremos reductores o no reductores de las cadenas de polisacáridos de celulosa, liberando celobiosa o glucosa como productos principales (Zhang & Percival, 2013). Las  $\beta$ -glucosidasas por su parte, poseen actividad hidrolítica y transglucosidasa.

Debido a la complejidad de la estructura de la hemicelulosa se requieren de un número grande de enzimas para una degradación completa, a causa de que casi todos los enlaces que se tienen en la hemicelulosa tienen una enzima específica responsable de su degradación. Se pueden distinguir tres categorías de hemicelulasas las cuales son: exoenzimas, endoenzimas y esterases. En el caso de las endoenzimas pertenecientes a las hemicelulasas estas atacan las cadenas internas de los polisacáridos con muy poca actividad en oligómeros cortos. Las exoenzimas tienden a actuar en los extremos reductores y no reductores teniendo preferencia, en su mayoría, por las cadenas de substratos cortos, mientras que las esterases son requeridas para hidrolizar los enlaces éster de la hemicelulosa en tejido de plantas (Wyman, 1996; De Souza & Kawaguti, 2021).

### **I.III Ácido propiónico como producto potencial a partir de bagazo de *Agave***

Se realizó un análisis de productos potenciales a obtener de los hidrolizados de BA, con base a los criterios de tipo de respiración celular, capacidad de consumo de diversos azúcares, rendimientos de producción, modificaciones genéticas, riesgos a la salud, tolerancia del microorganismo al producto y su excreción extracelular, se seleccionó

estudiar la producción de ácido propiónico (AP). El análisis detallado de los compuestos considerados y sus características se muestra en el Anexo 3.

El AP es un líquido incoloro con un olor acre que fue descrito por primera vez en 1844 por Johann Gottlieb, pero fue hasta 1878 que Albert Fitz realizó el primer trabajo sobre la producción de AP por una Propionibacteria (Goldberg & Rokem, 2019; Gonzalez-Garcia et al., 2017). Actualmente existe interés en mejorar la productividad y el rendimiento principalmente debido a que su producción mundial es de aproximadamente 450 mil toneladas por año con un crecimiento de 2.7 %, sin embargo, se deben considerar distintas estrategias para aumentar su producción de manera sustentable (Gonzalez-Garcia et al., 2017).

### I.III.I Propiedades de ácido propiónico

El AP (Figura 6) es un ácido graso de cadena corta de tres carbonos con una fórmula semidesarrollada de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ , tiene un peso molecular de 74.08 g/mol, su punto de ebullición es de  $141.1^\circ\text{C}$  y su punto de fusión a  $-21.5^\circ\text{C}$ , con densidad específica de  $0.993\text{ g/cm}^3$  a  $20^\circ\text{C}$ , pKa es de 4.88, presión de vapor es de 3.53 mmHg a  $25^\circ\text{C}$  (390 Pa a  $20^\circ\text{C}$ ), muy soluble en agua ( $1 \times 10^6\text{ mg/L}$  a  $25^\circ\text{C}$ ), ligeramente soluble en cloroformo, soluble en éter, dietil éter y miscible con etanol.

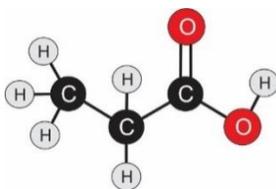


Figura 6. Estructura química del AP. Elaboración propia.

El AP es más lipofílico en comparación con el ácido acético y tiene propiedades de ácido graso (volátil). Se ha aceptado generalmente que el ácido puede atravesar la membrana plasmática en forma no disociada y provoca una acidificación en el citoplasma de la célula viva que conduce al agotamiento de la energía y al crecimiento lento (Dijksterhuis et al., 2019).

### **I.III.II Usos del ácido propiónico**

Debido a sus propiedades antimicrobianas y fungicidas, el AP se usa como conservador de alimentos, ya que inhibe el crecimiento de moho y diversas bacterias (en forma de su sal de sodio o calcio), alimentos para animales (directamente o como su sal de amonio) y granos. Adicionalmente, se utiliza en la síntesis de 2,2-dicloropropionato de sodio (herbicida), hidruro propiónico y ácido cloropropiónico (intermediarios farmacéuticos), como precursor de éter propiónico, propionato de bencilo (aditivos de alimentos y cosméticos) y acetato propionato de celulosa (fibras de celulosa sintética).

Actualmente se han realizado estudios de los efectos del AP en diversas enfermedades humanas como: prevención de la obesidad y diabetes tipo II; enterocolitis necrotizante y la regulación de la nutrición en los recién nacidos; tratamiento del cáncer de cuello uterino; Parkinson; esclerosis múltiple (Al-Lahham et al., 2010; Xia et al., 2017; Pham et al., 2021; Ostendorf et al., 2020; Duscha et al., 2020). En el Anexo 4 se describen a mayor profundidad los estudios antes mencionados.

### **I.III.III Métodos de obtención del ácido propiónico**

En la actualidad, la producción comercial de AP se lleva a cabo principalmente mediante síntesis química a partir de materias primas de petróleo, que son poco amigables al ambiente. Principalmente, se obtiene por una hidrocarboxilación (proceso Reppe), donde se utiliza etileno, monóxido de carbono y vapor de agua ( $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ). Por otro lado, en el proceso Larson se convierte el etanol y monóxido de carbono en propionato en presencia de trifluoruro de boro. Otras técnicas de síntesis menos comunes incluyen la oxidación de propionaldehído o de hidrocarburos, el proceso de Fischer-Tropsch y pirólisis de la madera (Gonzalez-Garcia et al, 2017). Aunque también se produce, en cantidades menores, como subproducto de la fabricación de ácido acético. Sin embargo, este tipo de AP tiene desventajas debido a la variación del precio del petróleo en el mercado, por otro lado, la necesidad de los consumidores por remplazar productos sintetizados químicamente por los obtenidos de manera sustentable. Esto último representa una alternativa atractiva, ya que la producción a partir de microorganismos tiene como ventajas: la capacidad de etiquetar

el producto como un "conservador natural" y la oportunidad de utilizar los residuos agrícolas como sustratos de fermentación, lo que reduce los costos de eliminación, de esta manera, la fermentación a partir de microorganismos adquiere interés. Las vías metabólicas que conducen a la producción de AP se pueden clasificar en tres clases: a) las vías primarias que catabolizan diferentes fuentes de carbono a AP (ciclo de acrilato y Wood-Werkman); b) las vías catabólicas que pueden degradar varios aminoácidos a AP; c) las vías anabólicas asociadas con la producción de precursores de biomasa que a partir de piruvato o dióxido de carbono pueden aprovecharse para producir propionato.

#### **I.III.IV Microorganismos productores**

Existen diversos microorganismos que pueden producir AP. De acuerdo a sus rutas metabólicas, *Clostridia propionicum* y *Megasphaera elsdenii* utilizan la ruta de acrilato, mientras que *Bacteroides fragilis*, *B. ruminicola*, *Veillonella parvula*, *V. alcalescens*, *Propionigenum modestum*, *Selenomonas ruminantium* y *S. sputigena* utilizan la ruta de succinato (Gonzalez-Garcia et al., 2017). También se puede obtener como subproducto a partir de *Salmonella typhimurium* que utiliza la ruta de 1,2-propanediol. Sin embargo, existen bacterias nativas productoras de AP, las cuales son las Propionibacterias que han sido las candidatas debido a su metabolismo único, ya que ocupan la ruta de Wood-Werkman, que es la ruta energéticamente más eficiente que se conoce actualmente (Gonzalez-Garcia et al., 2017). Son bacterias anaerobias facultativas en forma de bastoncillo, grampositivas, inmóviles y no esporulan, estas cepas incluyen: *Propionibacterium thoenii*; *P. freudenreichii*; *P. shermanii*; *P. acidipropionici* y *P. beijingense*.

#### **I.III.V *Propionibacterium acidipropionici* CDBB-B-1981**

Esta cepa tiene sinónimos: *Propionibacterium arabinosum* y *P. pentosaceum*, y como acrónimos: ATCC 4875, DSM 20272, CGMCC 1.2232 y NCIMB 8070. Ha sido ampliamente estudiada para la producción heterofermentativa de AP por sus altos rendimientos y su escalabilidad semi-industrial (10 m<sup>3</sup>) (Gonzalez-Garcia et al., 2017). El genoma de *P. acidipropionici* CDBB-B-1981 ha sido secuenciado y comprende un

cromosoma circular de 3,656,170 pares de bases (pb) con un contenido de guanina y citosina (GC) del 68.8 % y un plásmido de baja copia de 6,868 pb con un contenido de GC del 65.4 % (Parizzi et al., 2012). Se han detectado genes correspondientes a las vías respiratorias aerobias, por lo que esta cepa tiene probable potencial para la industria por su capacidad de resistencia al oxígeno. Sin embargo, se requieren realizar más pruebas al respecto (Parizzi et al., 2012). A partir de esto se reconstruyeron sus vías metabólicas mostradas en la Figura 7, donde en azul se encuentra las vías aerobias, en verde las fermentativas y en naranja la fijación de CO<sub>2</sub>.

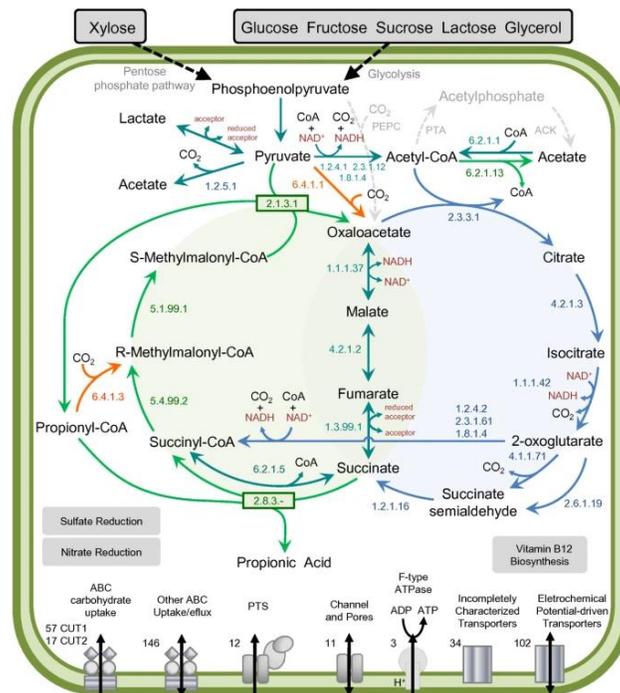


Figura 7. Vías metabólicas de *Propionibacterium acidipropionici* CDBB-B-1981. Obtenido de: Parizzi et al., 2012.

*P. acidipropionici* puede utilizar una amplia variedad de sustratos para la producción heterofermentativa de ácido propiónico, lo cual la convierte en una fuerte candidata para la metabolización de materiales lignocelulósicos. Adicionalmente, tiene alta tolerancia a los ácidos y el estilo de vida microaerofílico (Parizzi et al., 2012). Y finalmente, otra de las ventajas que presenta es la misma producción de AP que tiene acción antifúngica que evita las contaminaciones por otros microorganismos durante la fermentación.

### I.III.VI Condiciones de fermentación

Debido a que *P. acidipropionici* es una bacteria anaerobia facultativa, para mejorar los rendimientos se requiere de mantener la ausencia de oxígeno. Esto se puede lograr con un flujo al medio de N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>. Se ha probado burbujear N<sub>2</sub> durante 20-30 min antes de la inoculación y durante 10 min cada día después (Zhang & Yang, 2009; Wang et al., 2014). También se ha realizado el burbujeo antes de la inoculación y después de cada muestreo (Parizzi et al., 2012).

En el caso de la agitación, una de las estrategias consiste en burbujear N<sub>2</sub> antes de la inoculación sin agitación durante la fermentación. Por otro lado, Duarte et al., (2015) reportó una agitación con 100 rpm en condiciones anaeróbicas (N<sub>2</sub> burbujeante) durante los primeros 15 minutos, mientras que, Wang et al., (2017) que mantuvo la agitación constante a 100 rpm con un flujo de 0.2 vvm de N<sub>2</sub>.

Respecto al pH, se ha reportado mantenerlo en un rango 6-6.5 durante la fermentación. Este debe ser controlado para evitar la acidificación del medio y mantener las condiciones óptimas de crecimiento. Mientras que la temperatura óptima de crecimiento se encuentra reportada en un rango de 30-32°C.

## Capítulo II. Planteamiento del problema

### II.I Hipótesis

Debido a su capacidad metabólica *P. acidipropionici* CDBB-B-1981 podrá utilizar en condiciones anaeróbicas los hidratos de carbono presentes en los hidrolizados enzimáticos del bagazo de *Agave* pretratado con explosión de vapor para la producción de ácido propiónico.

### II.II Justificación

La generación excesiva y la acumulación de los residuos agroindustriales ha incentivado a encontrar alternativas para su favorable aprovechamiento. Una de ellas es la generación de bioproductos a partir de residuos lignocelulósicos que tiene potenciales ventajas como la producción de compuestos de valor agregado, disminución de los impactos ambientales generados por la mala disposición de residuos, bajos costos de materia prima, entre otros. No obstante, el uso de biomasa lignocelulósica conlleva limitaciones debido a su recalcitrancia y, para mejorar la digestibilidad se requiere de dos etapas, un pretratamiento y una hidrólisis enzimática para aumentar la disponibilidad de azúcares fermentables. El pretratamiento con explosión de vapor a bajas temperaturas y tiempos largos tiene como ventaja la baja o nula generación de inhibidores, además de no utilizar catalizadores químicos que lo hace ambientalmente favorable. Por su parte, el uso de cocteles enzimáticos favorece la obtención de azúcares diversos a partir de polímeros debido a la variedad de enzimas. Los hidrolizados obtenidos de la segunda etapa pueden ser aprovechados por *P. acidipropionici* CDBB-B-1981 en una tercera etapa de fermentación para la producción de ácido propiónico, dicho compuesto tiene aplicaciones como conservador de alimentos, entre otros. Actualmente existe interés en su obtención a partir de microorganismos, debido a que le confiere una ventaja mercadotécnica como conservador natural. Además, recientemente se han encontrado beneficios al utilizar AP producido biológicamente en el tratamiento de enfermedades como el Parkinson, el cáncer cervicouterino y esclerosis múltiple (Pham et al., 2021; Ostendorf et al., 2020;

Duscha et al., 2020). Se han realizado estudios de la producción de ácido propiónico a partir de hidrolizados de rastrojo de maíz (Wang et al., 2017). Sin embargo, actualmente no hay estudios realizados a partir de los hidrolizados de bagazo de *Agave*, por lo cual, existe un potencial innovador al respecto.

### II.III Objetivo general

- Evaluar el potencial de los hidrolizados enzimáticos del bagazo de *Agave* pretratado por explosión de vapor para la producción de ácido propiónico con *P. acidipropionici* CDBB-B-1981 en reactores escala laboratorio de 1 L.

### II.IV Objetivos particulares

- Caracterizar del bagazo de *Agave* inicial, post pretratamiento y post hidrólisis enzimática.
- Validar las condiciones de pretratamiento para la obtención de hidratos de carbono fermentables.
- Determinar las mejores condiciones de hidrólisis enzimática para la obtención de hidratos de carbono fermentables.
- Validar las condiciones de operación del reactor a escala laboratorio para la producción de ácido propiónico.
- Determinar la eficiencia de producción de ácido propiónico utilizando los hidrolizados enzimáticos del bagazo de *Agave* pretratado.

## Capítulo III. Materiales y métodos

Este capítulo describe la estrategia de experimentación, así como las condiciones de pretratamiento e hidrólisis enzimática, las condiciones de producción de AP y las metodologías empleadas para la determinación de distintos compuestos.

### III.I Estrategia de experimentación

La estrategia de experimentación para la producción de AP a partir de BA está compuesta de tres etapas (Figura 8). La primera consiste en el PT con explosión de vapor del BA, donde se obtienen dos fracciones (sólida y líquida). En la etapa 2 se utilizaron ambas fracciones y se realizó la HE con Cellic CTec2, donde se obtuvieron los hidrolizados enzimáticos y la fracción sólida agotada. Finalmente, en la etapa 3 se realizó la fermentación de los hidrolizados con *P. acidipropionici* CDBB-B-1981. Continuando con el concepto de biorrefinería, la fracción sólida agotada podría ser procesada por gasificación, pirólisis o combustión para la producción de syngas, electricidad y calor, ceras, biocombustibles, fenoles, entre otros. Sin embargo, los alcances de este estudio solo se centrarán en las tres etapas para la producción de AP.

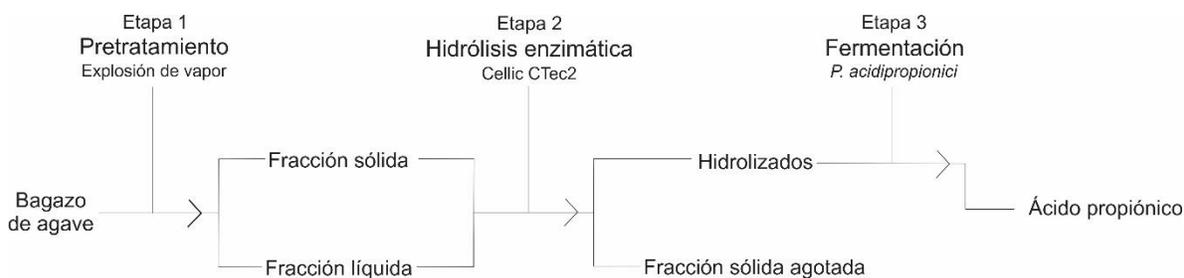


Figura 8. Estrategia de experimentación para la producción de AP a partir de BA

### III.II Biomasa

Como material de estudio se utilizó bagazo de *Agave tequilana* Weber variedad azul obtenido de una casa tequilera ubicada en la localidad de Huaxtla, en el municipio de El Arenal, Jalisco. Su caracterización se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección III.II.I

### III.II.I Caracterización de la biomasa

Para la caracterización del BA se determinaron:

1. Sólidos totales: se eliminó la humedad de la muestra de BA colocada en crisoles a peso constante en una estufa a 110 °C por 5 h de acuerdo a la metodología de NREL/TP-150-42621.
2. Cenizas: los crisoles con BA sin humedad (utilizados en la determinación de sólidos totales) fueron colocados en la mufla (Felisa, FE-340) a 550°C por 5 h acorde al NREL/TP-150-42622.
3. Extractivos: se colocó una muestra de BA en un equipo Soxhlet, donde se realizó la primera extracción con agua a 90-100°C durante 16 h, posteriormente se hizo una segunda extracción con etanol a 70°C por 18 h, los licores obtenidos fueron concentrados en un rotavapor (BUCHI, R-100), finalmente se hizo la diferencia de pesos del matraz conforme al NREL/TP-150-42619.
4. Hemicelulosa: se adicionó NaOH al 4 % a una muestra de BA durante 24 h a 130 rpm y se filtró al vacío, el extracto se acidificó a pH 5 y se congeló para formar precipitados, posteriormente se descongeló y se centrifugó a 3,300 rpm por 20 min, se conservaron los sólidos, mientras que el sobrenadante fue recuperado en otro tubo y se le adicionó etanol en una relación 1:1 (v/v), se congeló, descongeló y centrifugó a 3,300 rpm por 20 min, el sobrenadante se desechó y los sólidos de ambos tubos se secaron en un horno a 60°C por 24 h (Hernández-Vázquez et al., 2019).
5. Lignina: se realizó una hidrólisis ácida al BA con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 % a 30°C durante 1 h, se neutralizó con agua, se colocó en una autoclave a 121°C por una hora y se filtró al vacío, de este paso se obtiene el licor de lignina y sólidos. Para la lignina insoluble en ácido, los sólidos se lavaron con agua destilada, se secaron a 105°C por 5 horas y posteriormente se llevaron a una mufla a 525°C por 24 h conforme al NREL/TP-150-42618. Mientras que para la lignina soluble en ácido se utilizó el licor de lignina, se midió la absorbancia a 240 nm y se realizó la curva estándar de acuerdo al NREL/TP-150-42617.

6. Carbohidratos estructurales: se utilizó el licor de lignina y se cuantificaron por HPLC (Varian ProStar 210) empleando una columna Aminex HPX-87H a 50°C, con un flujo de 0.6 mL/min de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM como fase móvil y un detector índice de refracción (IR) (Knauer, modelo 2300) de acuerdo al NREL/TP-150-42618.

### III.II.II Caracterización de las fases líquidas

Para la caracterización de la fracción líquida del PT y los hidrolizados de la HE se determinaron: **a)** azúcares totales (AT) por la metodología de fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956) y cuantificado con espectrofotometría a 485 nm (Biotraza, modelo 752); **b)** demanda química de oxígeno (DQO) con viales de digestión por el método Hach 8000 (HACH, 2021) usando un digestor Hach DRB200 y cuantificado con espectrofotometría a 620 nm (Biotraza, modelo 752); **c)** glucosa (Glu) y xilosa (Xil) con un analizador bioquímico YSI-2700; **d)** Glu, Xil, manosa (Man), galactosa (Gal) y arabinosa (Ara) utilizando HPLC (Varian ProStar 210) con las condiciones mencionadas en la sección III.II.I.

### III.III Pretratamiento

El PT con explosión de vapor se realizó en un reactor enchaquetado de acero inoxidable como se muestra en la Figura 9. Éste tiene un tanque con volumen de trabajo de 4 L, donde es colocada una canasta con malla con el BA, posteriormente se adicionó agua destilada y fue cerrado herméticamente (Figura 9 flecha roja). Después, a través de la chaqueta se hace pasar vapor alimentado por una caldera de 3 HP (flechas azules), que aumenta la temperatura y a su vez la presión dentro del tanque, convirtiendo el agua destilada en vapor. Una vez alcanzadas las condiciones deseadas, se realizó una descompresión súbita por medio de una válvula en la parte inferior del reactor (Figura 9, flecha verde), se recolectó el vapor del tanque del reactor en un tanque de expansión, donde debido al cambio de volumen el vapor se condensa, obteniendo la fracción líquida, mientras que la fracción sólida (bagazo pretratado húmedo) permaneció dentro del tanque y se recuperó abriéndolo.

Para la conservación de la fracción sólida se procedió a secarla a 34°C, mientras que la fracción líquida se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso en la HE. Ambas fracciones fueron caracterizadas como se menciona en la sección III.II.I y III.II.II.

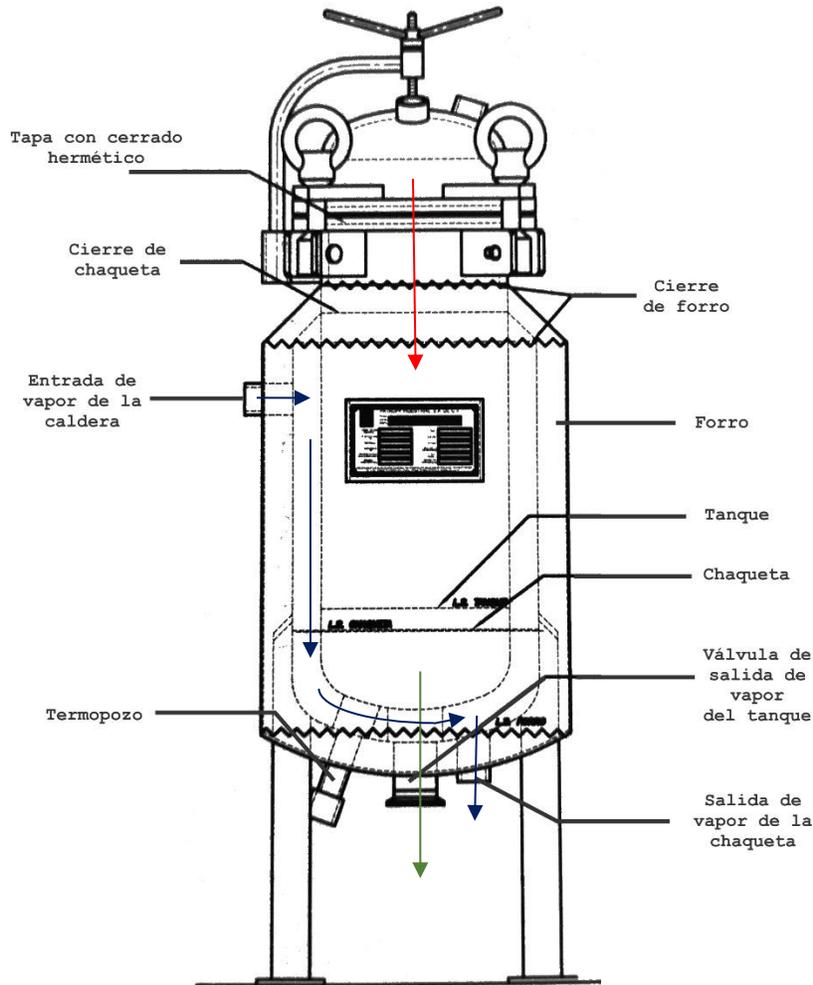


Figura 9. Esquema del reactor del pretratamiento por explosión de vapor.

Para realizar las pruebas se colocaron dentro del tanque 55 g de BA seco con 2 L de agua destilada, posteriormente se probó aumentar la carga a 110 g de biomasa, teniendo así porcentajes de sólidos: 2.75 y 5.5 %.

En un estudio previo se evaluaron las condiciones de operación de 2, 4 y 6 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 y 20 min, donde se encontró que las condiciones con mayores rendimientos fueron a 4 kgf/cm<sup>2</sup> (142°C) durante 15 min (Duran-Cruz et al., 2021). Por lo que en este estudio se utilizaron dichas condiciones que son equivalentes a un factor de severidad (FS) de

2.41, descrito en la Ecuación 1. El FS incluye los parámetros operativos de temperatura y tiempo de PT por lo que tienen relación con los requerimientos energéticos. Dicha ecuación está basada en una cinética de primer orden y obedece a la ley de Arrhenius (Pielhop et al., 2017).

$$FS = \text{Log} \left( t * e^{\frac{T-100}{14.75}} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde T es temperatura (°C) y t es tiempo (min).

### III.IV Hidrólisis enzimática

La HE se realizó a ambas fracciones resultantes del PT con el cóctel enzimático Cellic CTec2 donado por Novozymes con una concentración enzimática de 366 FPU/mL (la actividad enzimática se determinó de acuerdo al protocolo NREL/TP-510-42628) a 50°C y 120 rpm durante 31 h en una incubadora (New Brunswick, G25). El pH fue ajustado a 5 con NaOH 0.1 M sin que se encontraran cambios significativos durante la HE. De igual manera que en la sección anterior, la concentración enzimática utilizada se fijó con base a los resultados previos, se decidió evaluar la concentración enzimática de 2.4 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>BA</sub> que corresponde a 18.3 FPU/g<sub>BA</sub> (1x) y dos aumentos 24.7 y 54.8 FPU/g<sub>BA</sub> (1.5x y 3x, respectivamente). Adicionalmente se probaron tres porcentajes de sólidos de BA seco en la HE; 2.5, 3.75 y 5 %.

Los experimentos se realizaron por triplicado, los controles negativos consistieron en pruebas sin a adición de cóctel enzimático y el control fue realizado con bagazo sin pretratar en buffer de citratos pH 5 a las mismas condiciones.

### III.V Microorganismo y medio de cultivo

La cepa *P. acidipropionici* CDBB-B-1981 fue adquirida de la colección de microorganismos del Centro de investigación y de Estudios Avanzados (CINESTAV) del Instituto Politécnico Nacional. La bacteria se creció inicialmente en botellas serológicas con medio YPG (Extracto de levadura 10 g/L, peptona de caseína 20 g/L y glucosa 20

g/L) ajustado a pH 6, en condiciones anaeróbicas a 30°C. Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial, se conservó en stock de glicerol al 20 % (v/v) y se almacenó a -20 °C.

Para los experimentos de producción de AP se utilizó el medio YPG a las condiciones anteriormente mencionadas para el cultivo semilla. El medio bacteriano utilizado para las pruebas de fermentación de AP contenía 13.9 g/L de extracto de levadura, 0.98 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.48 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 g/L  $\text{MnSO}_4$  (Wang et al., 2017). Se realizaron controles en botellas serológicas y en el biorreactor, en donde se utilizó medio modelo que tenían concentraciones de 3.55 g/L de Glu, 0.8 g/L Xil, 0.35 g/L de Ara, 0.4 g/L de Man y Gal similares a las concentraciones de azúcares contenidas en los hidrolizados enzimáticos del BA pretratado con explosión de vapor a FS 2.41. Para las pruebas de los hidrolizados enzimáticos se adicionaron las fuentes de nutrientes (N, S y P) y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.

### **III.V.I Preparación del inóculo**

Los cultivos semillas fueron realizados a partir de los stocks de glicerol, donde se incubaron 50 mL de medio YPG en botellas de serológicas a 30 °C y 150 rpm durante 48 h en condiciones anaerobias de acuerdo a Wang et al., (2017). Se realizó una sedimentación de las células con el fin de lavar los metabolitos y los azúcares no consumidos mediante centrifugación Eppendorf, 5810 R a 10,000 rpm durante 10 min y finalmente se resuspendieron en medio fresco a una densidad óptica inicial de 0.7 a 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ). Posteriormente se usaron para inocular (10 %, v/v) el medio de fermentación.

### **III.V.II Fermentación**

Las pruebas control se realizaron en botellas serológicas de 100 mL, con un volumen de trabajo de 50 mL a 30°C y 120 rpm en una incubadora con agitación (New Brunswick, i26) durante 72 h. Previo a la inoculación se ajustó el pH a 6 sin realizar un control

durante las cinéticas y se burbujeo  $N_2$  al medio para mantener las condiciones anaerobias al inicio de la prueba.

Las pruebas en el reactor a escala laboratorio se llevó a cabo en un biorreactor ChemGlass® (CG-1949-X-1DM) (Figura 10, parte central) con un volumen de trabajo de 1L, el cual contiene un agitador que se mantuvo en 80 rpm. El biorreactor se conectó a un pH Meter (B&C electronics, pH 7635) mostrado en la Figura 10 parte derecha, éste ajusto el pH a 6 con la adición de NaOH 0.5 M, mientras que la temperatura fue controlada en 30-32 °C por medio de un recirculador con agua (VIVO, RT4) que se hizo pasar a través de la chaqueta del biorreactor. Finalmente, el sistema también contenía una conexión a un tanque de  $N_2$  (parte central inferior), el cual permitía el burbujeo por 10 min al inicio de la prueba y cada 24 h con el fin de mantener las condiciones anaerobias.



Figura 10. Sistema de producción de AP

### III.V.III Métodos analíticos

Las muestras de las pruebas de fermentación se colectaron cada 2 h durante 72 h, fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 10 min y congeladas hasta su análisis. El crecimiento de celular se midió a partir de la  $DO_{600}$  a 600 nm (Biotraza, modelo 752), la  $DO_{600}$  se contrastó con el peso seco de las bacterias (g/L) y se realizó una curva estándar mostrada en Anexo 5. Se cuantificó Glu, Xil, Ara, Man, Gal, AT y DQO. El ácido propiónico (AP) fue determinado con HPLC (Varian ProStar 210) empleando una columna Aminex HPX-87H a 50°C, con un flujo de 0.6 mL/min de  $H_2SO_4$  5 mM como fase móvil y un detector índice de refracción (IR) (Knauer, modelo 2300).

### III.VI. Cálculos de rendimientos y análisis de datos

Con el fin de estandarizar los resultados, se calcularon los rendimientos de azúcares y DQO a partir de la masa de BA en base seca como se muestra en la ecuación 2.

$$\text{Rendimiento} = \frac{[\text{azúcares}(\frac{g}{L})] * \text{Volumen (L)}}{\text{Biomasa en peso seco}(g_{BA})} \quad \text{Ecuación 2}$$

El rendimiento de sacarificación se determinó a partir de la ecuación 3 (NREL/TP-150-42630).

$$\% \text{Sacarificación} = \frac{[\text{Glucosa}(\frac{g}{L})] + 1.053[\text{celobiosa}(\frac{g}{L})]}{1.111 f [\text{biomasa}(\frac{g}{L})]} * 100 \% \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde f: fracción de celulosa en base seca (g/g), 1.053: factor de conversión de celobiosa a glucosa.

La determinación de la actividad enzimática se realizó a partir de la conversión de la concentración másica de glucosa (g/L) a concentración molar ( $\mu\text{mol}$ ) dividiéndolo por el tiempo de hidrólisis enzimática expresándola en  $\mu\text{mol} / \text{min}$  (U).

Los cálculos de rendimientos de biomasa-sustrato ( $Y_{x/s}$ ) y producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones:

$$Y_{x/s} = \frac{[Biomasa\ final\ (\frac{g}{L})] - [Biomasa\ inicial\ (\frac{g}{L})]}{[AT\ inicial\ (\frac{g}{L})] - [AT\ final\ (\frac{g}{L})]} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$Y_{p/s} = \frac{[AP\ final\ (\frac{g}{L})] - [AP\ inicial\ (\frac{g}{L})]}{[AT\ inicial\ (\frac{g}{L})] - [AT\ final\ (\frac{g}{L})]} \quad \text{Ecuación 5}$$

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se calculó a partir de la en la fase exponencial de crecimiento.

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu * t \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde X: Concentración de bacterias en el tiempo t (g/L),  $X_0$ : Concentración de biomasa inicial (g/L), t: tiempo.

Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un nivel de significación de  $p < 0.05$  utilizando el software IBM SPSS.

## Capítulo IV. Resultados y discusión

### IV.I Caracterización de la biomasa inicial

La composición porcentual inicial del BA nativo (sin procesar) se muestra en la Tabla 2. La celulosa corresponde al mayor porcentaje (30.7 %), seguido de la hemicelulosa (21.8 %) y la lignina (20.4 %). El material no estructural (extractivos) fue de 6.9 % y de material inorgánico (cenizas) de 6.6 %.

Tabla 2.- Composición del BA nativo.

Componente	%
<b>Celulosa</b>	30.7 ± 4.4
<b>Hemicelulosa</b>	21.8 ± 1.4
<b>Lignina</b>	20.4 ± 1.6
<b>Extractivos</b>	6.9 ± 1.0
<b>Cenizas</b>	6.6 ± 0.3

La composición reportada para la BL varía del 30-50 % de celulosa, del 15-35 % de hemicelulosa y del 10-30 % de lignina, mientras que para el BA la celulosa esta entre los 31-43%, la hemicelulosa entre 11-21% y la lignina en 11-20% (Krasznai et al., 2018; Palomo-Briones et al., 2017). La composición de la biomasa utilizada en este estudio se encuentra dentro de lo reportado para el BA y la BL. Sin embargo, la cantidad de celulosa se encuentra por el límite inferior, mientras que la hemicelulosa y lignina son evidentemente altas. Esto provoca que sea más recalcitrante en comparación a la utilizada en estudios anteriores (Hernández-Vázquez et al., 2020). Esta alta presencia de lignina (5.2% mayor) limita la segunda etapa del proceso debido a que produce una barrera física para el acoplamiento de las enzimas, lo cual es perjudicial para la obtención de azúcares. La diversidad en la composición puede deberse a factores ambientales y de crecimiento del *Agave*, así como del proceso de elaboración del tequila, ya que la temperatura, el tiempo de cocción del *Agave* y el prensado del mismo pueden variar dependiendo de la fábrica, inclusive hasta de los lotes de producción.

En comparación con otros tipos de biomasa, el BA contiene un porcentaje más alto de celulosa que el pasto varilla (5-20%) y puede tener menor porcentaje de lignina (10-40%), lo cual lo hace una biomasa menos recalcitrante y con mayor porcentaje de carbohidratos recuperables (Rajendran et al., 2017). El bagazo de caña de azúcar tiene mayor porcentaje de celulosa (42-48%) que el BA, pero su recalcitrancia es mayor con un contenido de lignina del 20-42% (Rajendran, et al., 2017). El BA de este estudio, a pesar de su alto contenido de lignina, tiene mayor potencial en comparación de las BL anteriormente mencionadas para la obtención azúcares a partir de la explosión de vapor y la HE.

#### **IV.II Evaluación de las condiciones de pretratamiento**

Los rendimientos de AT, Glu, Xil y DQO obtenidos con 2.75 y 5.5% de sólidos se muestran en la Figura 11. Se observó que la contribución del PT (Etapa 1) en los rendimientos de Glu y Xil fue marginal, mientras que en la Etapa 2 (HE) representó un aumento entre el 56 y 100%.

Por otro lado, en la etapa 1, el incremento a 5.5% de sólidos no tuvo efecto, aunque las concentraciones de azúcares puedan ser mayores, los rendimientos de AT, Glu, Xil y DQO normalizados a gramo de bagazo seco, fueron estadísticamente similares para las condiciones estudiadas. Mientras que, en la Etapa 2 el efecto del porcentaje de sólidos fue inverso, la mayor relación probada (5.5%) resultó en la disminución de los rendimientos de AT, Glu, Xil y DQO en un 33, 79, 62 y 25%, respectivamente. Por lo tanto, el porcentaje de sólidos de 2.75% fue seleccionado para las pruebas posteriores. A esta condición se obtuvieron rendimientos de  $0.06 \text{ g}_{\text{AT}}/\text{g}_{\text{BA}}$  y  $0.10 \text{ g}_{\text{O}_2}/\text{g}_{\text{BA}}$  en la Etapa 1 y de  $0.27 \text{ g}_{\text{AT}}/\text{g}_{\text{BA}}$ ,  $0.11 \text{ g}_{\text{Glu}}/\text{g}_{\text{BA}}$ ,  $0.03 \text{ g}_{\text{Xil}}/\text{g}_{\text{BA}}$  y  $0.32 \text{ g}_{\text{O}_2}/\text{g}_{\text{BA}}$  en la Etapa 2.

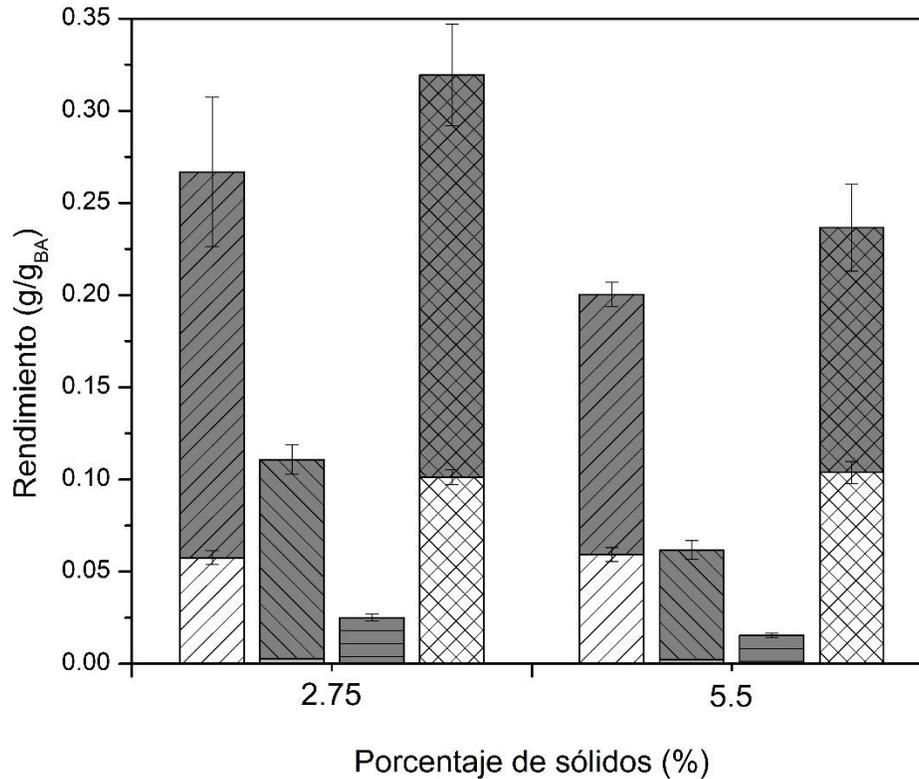


Figura 11. Comparación de los rendimientos de la etapa 1 (blanco) y la etapa 2 (gris) de AT ( ) , Glu ( ) , Xil ( ) , DQO ( ) .

El rendimiento de Glu y Xil con 2.75% de sólidos después del PT fue comparable con lo anteriormente reportado (Duran-Cruz et al., 2021). Sin embargo, se encontró que el rendimiento de AT después de la HE fue 50% menor. Como ya se mencionó, esto puede ser atribuido a la diferencia entre la composición de la biomasa, ya que, el porcentaje de lignina contenido en el presente estudio es mayor, lo cual limita la HE debido a que produce la adsorción y bloqueo de la actividad de celulasas de manera no específica e inhibición de enzimas hidrolíticas.

#### IV.III Evaluación de las condiciones de la hidrólisis enzimática

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de las tres concentraciones enzimáticas y tres concentraciones de biomasa, donde se compararon: los rendimientos de azúcares y DQO; la sacarificación; las actividades enzimáticas de

las celulasas y hemicelulasas para la determinación de las mejores condiciones para la producción de AP.

#### IV.III.I Rendimientos de azúcares y DQO

La determinación de rendimientos de AT, Glu, Xil y DQO de las pruebas a diferentes concentraciones enzimáticas y de biomasa en la HE se encuentran reportadas en las Figuras 12, 13, 14 y 15 respectivamente.

El mayor rendimiento de AT fue obtenido con la menor concentración enzimática y el menor porcentaje de sólidos, siendo de  $0.27 \pm 0.04$  g<sub>AT</sub>/g<sub>BA</sub>. No se encontraron diferencias significativas entre los rendimientos del mismo porcentaje de sólidos (2.5%) con aumentos de enzimas de 1.5 y 3x. No obstante, sí hubo diferencias con todos los rendimientos de AT obtenidos a 3.7 y 5% de sólidos. Por otro lado, en la HE no se observó un efecto favorable en el rendimiento de AT debido al incremento en la concentración de biomasa como se puede observar en la Figura 12.

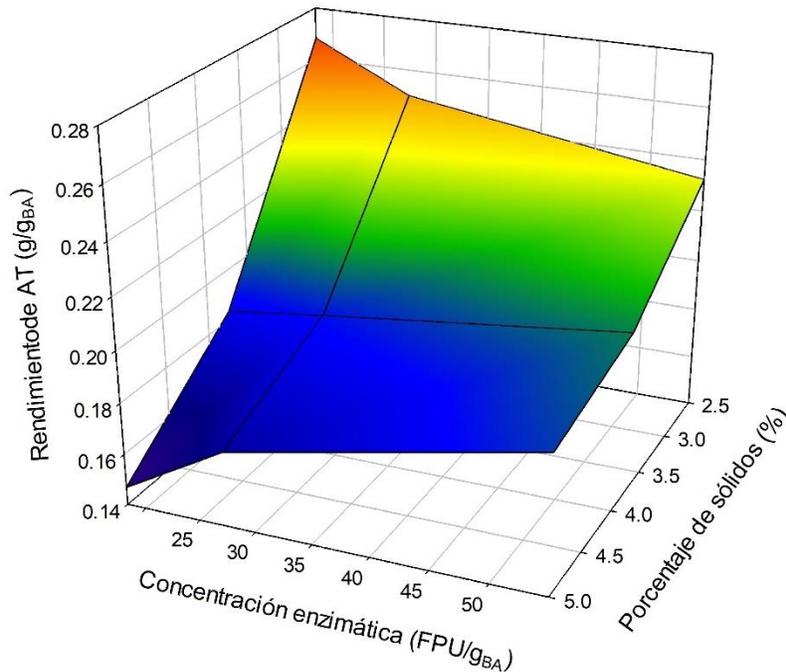


Figura 12. Rendimientos de AT a diferentes concentraciones enzimáticas y porcentajes de sólidos. 1x (18.3 FPU/g<sub>BA</sub>) 1.5x (27.4 FPU/g<sub>BA</sub>) y 3x (54.8 FPU/g<sub>BA</sub>).

En la Tabla 3 se encuentra la comparación de rendimientos de AT obtenidos con diferentes PT e HE. El rendimiento de AT obtenido en el actual trabajo fue mayor a los estudios donde únicamente se realizó una HE con concentraciones enzimáticas similares. En el estudio reportado por Montoya-Rosales (2019) se observó un rendimiento similar. Sin embargo, se utilizó mayor concentración enzimática y dos cócteles, lo que nos indica que el PT con explosión de vapor es un paso fundamental para la obtención de AT, ya que evita la utilización de mayor concentración enzimática para obtener rendimientos similares a  $0.27 \text{ g}_{\text{AT}}/\text{g}_{\text{BA}}$ .

Tabla 3. Rendimientos de AT obtenidos del BA pretratado y/o hidrolizado enzimáticamente.

Rendimiento ( $\text{g}_{\text{AT}}/\text{g}_{\text{BA}}$ )	Pretratamiento	Hidrólisis enzimática	Fuente
$0.27 \pm 0.04$	Explosión de vapor SF 2.41	Cellic CTec2 ( $18.3 \text{ FPU}/\text{g}_{\text{BA}}$ )	Este estudio
$0.13 \pm 0.001$	NA	Cellulase 50XL ( $14.3 \text{ FPU}/\text{g}_{\text{BA}}$ )	(Tapia-Rodriguez et al., 2019)
$\sim 0.15 \pm 0.02$	NA	Celluclast 1.5 L ( $18 \text{ FPU}/\text{g}_{\text{BA}}$ )	(Montiel & Razo-Flores, 2018)
$0.18 \pm 0.01$	NA	Cellulase 50XL ( $12.54 \text{ FPU}/\text{g}_{\text{BA}}$ )	(Valencia-Ojeda et al., 2021)
$0.19 \pm 0.02$	Peróxido de hidrógeno alcalino	Celluclast 1.5 L ( $20 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{BA}}$ )	(Galindo-Hernández et al., 2018).
0.27	NA	Celluclast 1.5 L ( $23 \text{ FPU}/\text{g}_{\text{BA}}$ ) y Viscozyme L ( $10.5 \text{ U}/\text{g}_{\text{BA}}$ )	(Montoya-Rosales et al., 2019)
0.39	Hidrólisis ácida HCl 5% (p/v)	NA	(Breton-Deval et al., 2018)
0.54	LI [Ch][Lys]	Cellic CTec2 ( $8 \text{ FPU}/\text{g}_{\text{BA}}$ )	(Perez-Pimienta et al., 2020)

[Ch][Lys]: Cholinium L lysinate

Otros estudios, en los que se utilizaron dos etapas (PT e HE) se encontró que utilizando peróxido de hidrógeno alcalino se obtuvo un rendimiento de AT menor al presente estudio, lo cual puede deberse a la pérdida de azúcar debido a la oxidación no selectiva (Bajpai, 2016). Sin embargo, en recientes estudios como Breton-Deval et al., (2018) y Perez-Pimienta et al., (2020) se encontraron rendimientos 30 y 50% más altos utilizando hidrólisis ácida y líquidos iónicos (LI), respectivamente. Los PT químicos tienen como ventaja la obtención de mayores rendimientos de azúcares, pero también

se forman mayores concentraciones de inhibidores que pueden afectar la obtención de bio-productos en la etapa de la fermentación.

En la Figura 13 se observa que el rendimiento de Glu disminuye con la menor concentración enzimática y aumentando el porcentaje de sólidos. A diferencia del caso de AT, el aumento en la concentración enzimática favoreció la obtención de Glu, con un rendimiento de  $0.15 \pm 0.01$  g<sub>Glu</sub>/g<sub>BA</sub> con 3x de enzimas y 2.5% de sólidos. Este rendimiento fue significativamente mayor a los obtenidos con 1 y 1.5x de enzimas. Lo anterior puede deberse a que las celulasas pueden llegar a ser inhibidas por la celobiosa, tal puede ser el caso de los rendimientos a 2.5% de sólidos y 1x de enzimas, ya que la concentración de AT es 2 veces mayor que la concentración de Glu. Esta diferencia puede deberse principalmente a la presencia de celobiosa, lo que provoca que las enzimas dejen de hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1,4 para formar glucosa y se tengan menores rendimientos (Gómez, 2008).

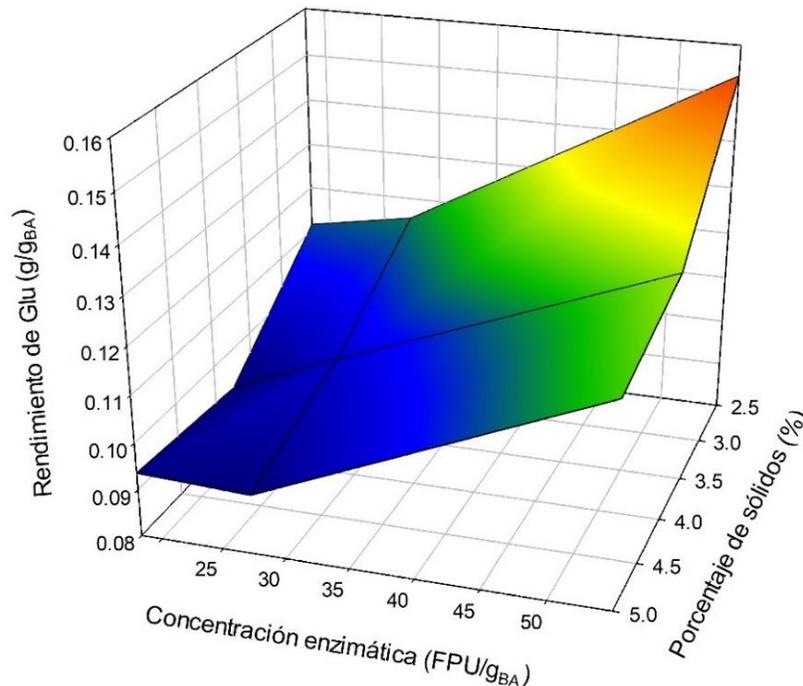


Figura 13. Rendimientos de Glu a diferentes concentraciones enzimáticas y porcentajes de sólidos. 1x (18.3 FPU/g<sub>BA</sub>) 1.5x (27.4 FPU/g<sub>BA</sub>) y 3x (54.8 FPU/g<sub>BA</sub>).

El rendimiento de Glu es comparable con el obtenido con el PT de autohidrólisis (180°C por 30 min) e HE con Cellic CTec2 and HTec2 (40 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>glucano</sub> y 4 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>xilano</sub>, respectivamente). Sin embargo, es 46 y 52% menor que los estudios donde se utiliza AFEX y LI e HE con Cellic CTec2 (70 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>AB</sub>), respectivamente (Perez-Pimienta et al., 2016; Perez-Pimienta et al., 2018). Un impacto negativo en el PT con AFEX es el costo elevado y las preocupaciones ambientales por el olor del amoníaco, lo cual provoca una desventaja de este proceso, mientras que los LI presentan altos costos y la generación de inhibidores (Bajpai, 2016). Por lo anterior, además de tener mejores rendimientos de Glu, el PT con explosión de vapor (SF 2.41) tiene ventajas ambientales, económicas y presenta una menor formación de inhibidores (Hernández-Vázquez et al., 2020).

Respecto a los rendimientos de Xil, hubo un comportamiento similar a los de Glu, ya que con 2.5% de sólidos y 3x de enzimas se obtuvo el mayor rendimiento con 0.03±0.01 g<sub>Xil</sub>/g<sub>BA</sub>. Este fue similar al obtenido con 1.5x de enzimas y 3.75% de sólidos, pero diferente al resto. En la Figura 14 se observa que el efecto de aumentar la concentración enzimática tiene repercusiones negativas en los rendimientos cuando se tienen porcentajes altos de sólidos, en cambio, al disminuir el porcentaje de sólidos con la mayor concentración enzimática se mejora la obtención de Glu y Xil.

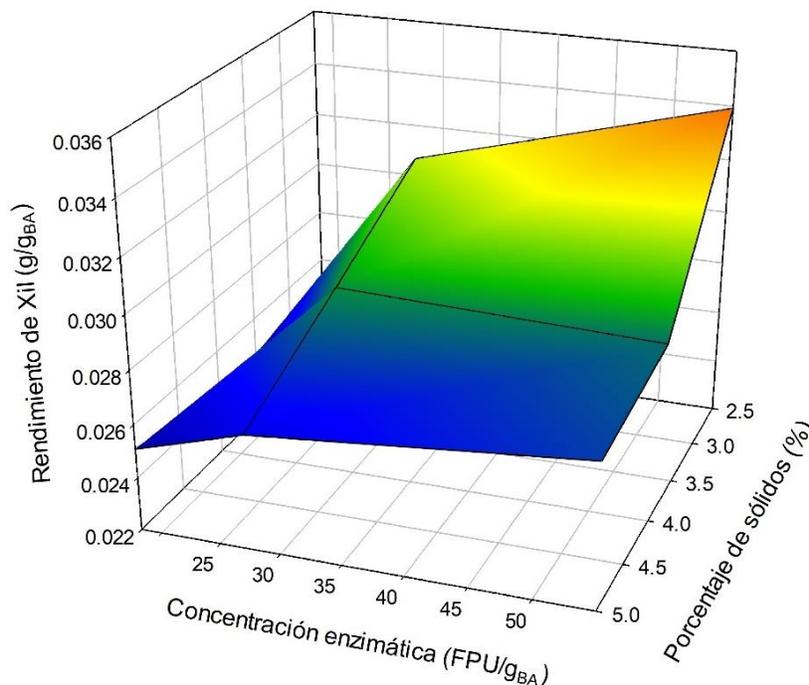


Figura 14. Rendimientos de Xil a diferentes concentraciones enzimáticas y porcentajes de sólidos. 1x (18.3 FPU/g<sub>BA</sub>) 1.5x (27.4 FPU/g<sub>BA</sub>) y 3x (54.8 FPU/g<sub>BA</sub>).

El rendimiento de Xil de este estudio es comparable con el obtenido con autohidrólisis (180°C por 30 min) e HE con Cellic CTec2 and HTec2 (40 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>glucano</sub> y 4 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>xilano</sub>, respectivamente), pero 79% menor que utilizando AFEX e HE con Cellic CTec2 (70 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>BA</sub>) (Perez-Pimienta et al., 2016). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, éstos últimos tratamientos no son ambientalmente atractivos.

Referente al rendimiento de DQO, en la Figura 15 se observa que hay un incremento al utilizar el menor porcentaje de sólidos (2.5%) y la mayor concentración enzimática (3x), obteniendo así el mayor rendimiento de DQO de  $0.37 \pm 0.02$  g<sub>O2</sub>/g<sub>BA</sub>. Este rendimiento se vio influenciado directamente por la obtención de Glu y Xil, debido a que, con las condiciones antes mencionadas, se registraron los mayores rendimientos de estos azúcares. Las moléculas de Glu y Xil son altamente oxidables, por lo que, un incremento en la concentración de azúcares repercute directamente en la cantidad de DQO en el medio, y, por lo tanto, en su rendimiento.

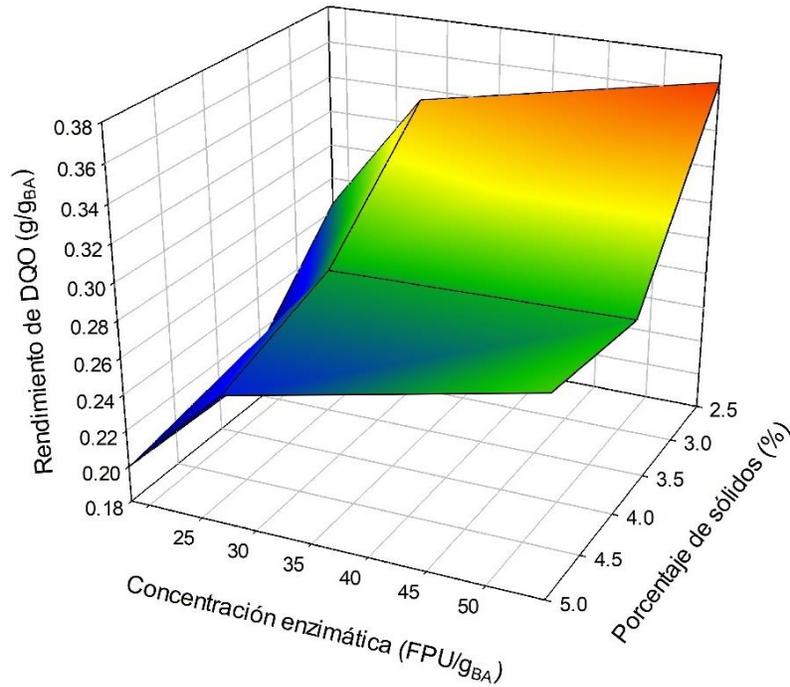


Figura 15. Rendimientos de DQO a diferentes concentraciones enzimáticas y porcentajes de sólidos. 1x (18.3 FPU/g<sub>BA</sub>) 1.5x (27.4 FPU/g<sub>BA</sub>) y 3x (54.8 FPU/g<sub>BA</sub>).

El rendimiento de DQO fue estadísticamente similar a los obtenidos con la HE con Cellulase 50XL (12.54 y 14.3 FPU/g<sub>BA</sub>) (Valencia-Ojeda et al., 2021; Tapia-Rodriguez et al., 2019). Sin embargo, fue menor que en los estudios de Lopez-Gutierrez et al. (2021) y Tapia-Rodriguez et al. (2019) donde se obtuvieron 0.46 y 0.65 g<sub>O2</sub>/g<sub>BA</sub> utilizando Cellulase 50XL (293 EGU/g<sub>BA</sub>) y Stonezyme (50.7 FPU/g<sub>BA</sub>), respectivamente.

El aumento en la concentración de biomasa tuvo repercusiones negativas en todos los rendimientos analizados debido principalmente a la limitación de movimiento del medio líquido por la saturación de fibras de BA. Esto dificulta el mezclado y por lo tanto la homogeneidad, lo que provoca problemas de transferencia de masa disminuyendo el contacto de las enzimas con el sustrato. Adicionalmente, el exceso de sustrato puede llegar a retardar el tiempo de reacción hasta llegar al punto de la inhibición (Gómez, 2008).

### IV.III.II Sacarificación y actividad enzimática

La sacarificación obtenida a las diferentes condiciones de la etapa 2 se presentan en la Tabla 4. Se encontró que el porcentaje de sacarificación más alto fue de 40% que corresponde a las condiciones sólidos al 2.5% y 3x de enzimas. Esto coincide con los resultados discutidos en la sección anterior. De igual manera, los porcentajes de sacarificación más bajos se obtuvieron con 1x sólidos y con 3.75 y 5% de sólidos, por lo que el aumento de concentración de biomasa no beneficia la obtención de azúcares.

Tabla 4. Porcentaje de sacarificación a diferentes condiciones de HE.

Concentración enzimática	Porcentaje de sólidos (%)		
	2.5	3.75	5
<b>1x</b>	28.9	23.9	24.5
<b>1.5x</b>	30.1	26.5	24.2
<b>3x</b>	<b>40.0</b>	33.6	32.1

En comparación con la literatura, la sacarificación obtenida a 2.5% de sólidos y 3x de enzimas fue más alta que en el estudio de Contreras-Dávila et al. (2017), donde se obtuvo 28% de sacarificación al utilizar HE con Celluclast 1.5 L. Galindo-Hernández et al. (2020) utilizaron peróxido de hidrógeno alcalino con HE secuencial y se obtuvo un porcentaje de sacarificación comparable al del presente estudio. No obstante, la sacarificación de este estudio fue menor que los obtenidos con hidrólisis ácida (52%) y LI e HE con Cellic CTec2 (80%) (Breton-Deval et al., 2018; Perez-Pimienta et al., 2020). Sin embargo, ambos PT generan concentraciones de inhibidores que pueden representar un paso extra para la desintoxicación del medio para procesos biológicos posteriores.

A pesar de que en la sacarificación, los rendimientos de azúcares y DQO a las condiciones de 3x de enzimas y 2.5% de sólidos fueron los más altos, las actividades enzimáticas de las celulasas y hemicelulasas para la obtención de Glu y Xil, respectivamente, fueron mayores con 5% de sólidos y concentración enzimática de 3x (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad enzimática de las celulasas y hemicelulasas a diferentes condiciones.

Porcentaje de sólidos (%)	2.5	3.75	5	2.5	3.75	5
Concentración enzimática	Glu			Xil		
	Actividad enzimática ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )					
<b>1x</b>	24,796	30,704	41,904	5,618	8,178	11,229
<b>1.5x</b>	25,716	33,949	41,439	6,832	9,553	11,765
<b>3x</b>	34,243	43,157	54,906	7,558	9,418	12,265

A 5 % de sólidos y 3x de concentración enzimática se obtuvieron las mayores actividades enzimáticas de las celulasas y hemicelulasas fueron de 54,906 y 12,265  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , respectivamente, lo que indicó una mayor concentración de azúcares en comparación a las obtenidas con 2.5% de sólidos y a la misma concentración enzimática. Sin embargo, con el aumento de sólidos, la sacarificación disminuyó 7.9% (Tabla 4), mientras que los rendimientos de Glu y Xil se redujeron un 20%. Por lo que el aprovechamiento del BA es menor a las condiciones donde se obtuvieron las mayores actividades enzimáticas, esto se puede atribuir a una inhibición por productos, ya que las glucanasas son inhibidas por la celobiosa, lo que disminuye la velocidad de reacción y por lo tanto el rendimiento ( $\text{g}/\text{g}_{\text{BA}}$ ) (Ovando-Chacón & Waliszewski, 2005). Debido a lo anterior, se decidió para la siguiente parte experimental seguir trabajando con las condiciones con mayores rendimientos de azúcares y de sacarificación (3x de enzimas y 2.5% de sólidos).

#### **IV.IV Composición del bagazo de *Agave* después de cada etapa.**

El cambio de composición de la biomasa después de cada etapa se reporta en la Figura 16. La primera etapa generó cambios, ya que la hemicelulosa se redujo 5.5%, mientras que la celulosa y la lignina aumentaron 9.3% y 2.4%, respectivamente. Esto debido a que la explosión de vapor solubiliza e hidroliza la hemicelulosa, por lo cual hay tal disminución.

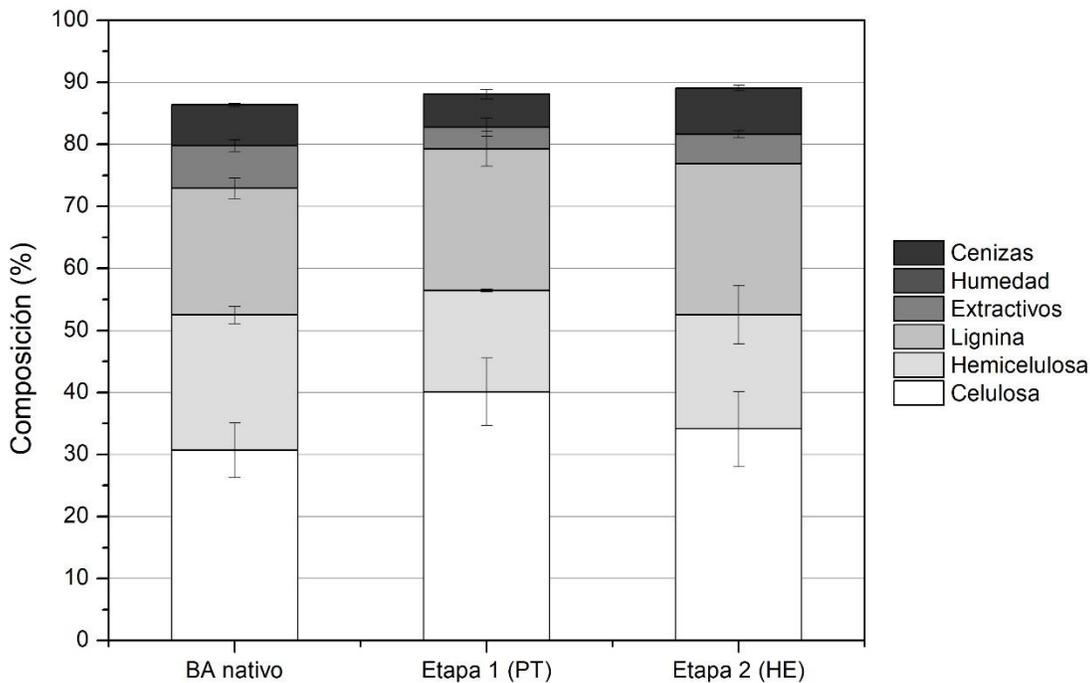


Figura 16. Comparación de la composición después de cada etapa.

Posteriormente, en la HE disminuyó 6% la celulosa, y aumentó 2.1 y 1.5% la hemicelulosa y la lignina, respectivamente. Esto es principalmente por la hidrólisis de la celulosa, ya que se obtuvo mayor concentración de Glu que de otros azúcares reductores como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de los azúcares obtenidos después de cada etapa.

Etapa	Glu	Xil	Gal y Man	Ara
	(g/L)			
PT	0.06±0.01	0.01±0.00	0.67±0.06	0.00±0.00
HE	3.34±0.01	0.71±0.02	0.77±0.08	0.10±0.00

En la Tabla 6, se muestran las concentraciones de azúcares reductores obtenidos después de cada etapa. En el PT la concentración de Gal y Man fue mayor, estos azúcares son pertenecientes a la hemicelulosa, lo cual es consistente con lo mencionado anteriormente sobre los efectos de la explosión de vapor.

Posteriormente, en la HE se obtuvo mayor concentración de Glu debido a las celulasas, no obstante, también aumentaron las concentraciones de Xil, Gal, Man y Ara, azúcares generados a partir de la hemicelulosa, por lo que nos lleva a concluir que también hubo hidrólisis con hemicelulasas.

Se encontraron residuos de celulosa y hemicelulosa al final del proceso de la etapa 2, debido a una digestión incompleta de estos polímeros. Para mejorar el aprovechamiento del BA y reducir el porcentaje final se podría realizar: una molienda previa a la explosión de vapor para aumentar la superficie de contacto; una humectación del BA para el hinchamiento de las fibras y favorecer su ruptura mecánica en el PT. Sin embargo, estos procesos requerirían mayor inversión, implican más tiempo y costos en el proceso, el objetivo es simplificar el proceso, por lo que es de interés continuar trabajando con el proceso de tres etapas propuesto en este estudio.

#### **IV.V Evaluación de las condiciones de fermentación**

Las condiciones de fermentación en botellas serológicas se evaluaron al inocular el medio con *P. acidipropionici* al 7% (v/v) a 0.6 (DO<sub>600</sub>) (Wang et al., 2017). Dichas condiciones no presentaron crecimiento de bacterias, ni consumo de azúcares en las 30 h posteriores de la inoculación, por lo que se aumentó la concentración de inóculo inicial a 10% (v/v) y 0.7 de DO<sub>600</sub>.

El consumo total de Glu fue a las 72 h, de Xil a las 56 h y de Ara a las 42, con tasas de consumo de 0.06, 0.02 y 0.01 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, siendo la Glu el azúcar preferencial del microorganismo. Por otro lado, hubo un consumo del 27% de Gal y Man, que dejó de ser utilizado por la cepa a partir de las 46 h, como se observa en la Figura 17 A. El consumo de AT de 0.07 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> se mantuvo constante hasta la hora 48, coincidiendo con el consumo de Glu, a la hora 72 el microorganismo dejó de consumir azúcares, a pesar de tener disponible Gal y Man.

En Figura 17 B se observa que la concentración de AP se mantuvo constante después de la hora 50. El crecimiento de bacterias tuvo su fase exponencial entre las 12 y 19 h. Es notable también la capacidad de la cepa de utilizar simultáneamente varias fuentes de carbono, en la fase exponencial de crecimiento consume preferencialmente Glu y Xil.

Adicionalmente, hubo un descenso de pH, iniciando en 6 y al concluir la fermentación de 4, este cambio se atribuyó a la acidificación del medio por la producción de AP, lo que provoca ralentización en el metabolismo y en el crecimiento de la cepa al no estar en las condiciones óptimas.

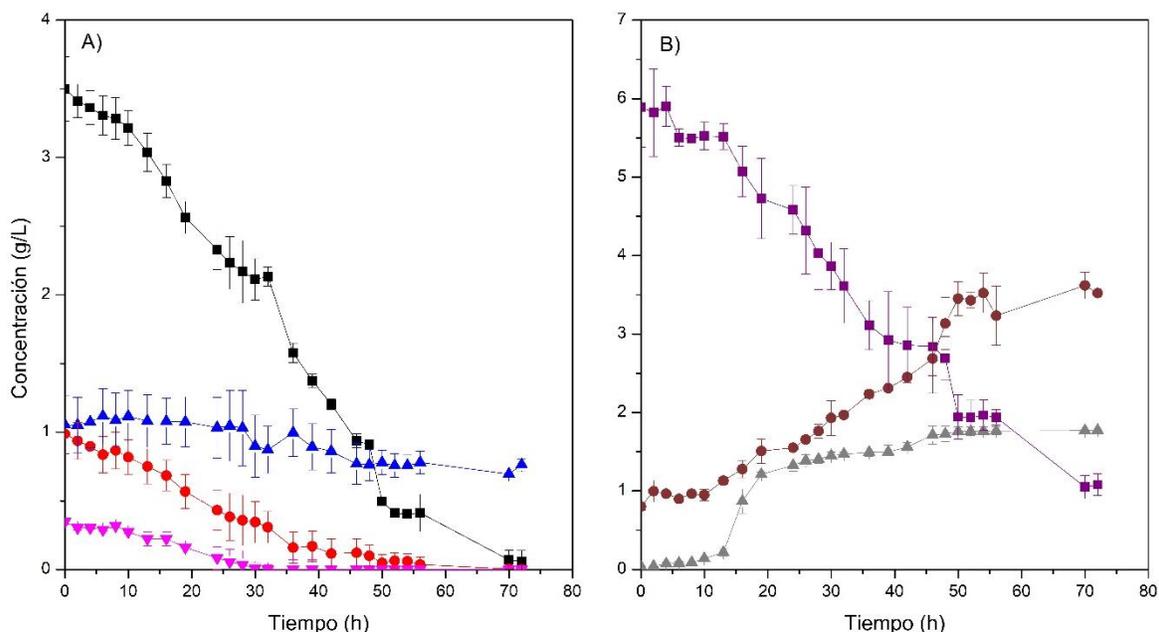


Figura 17.- Producción de AP con medio de cultivo modelo en botellas serológicas A) Consumo de azúcares reductores B) Producción de AP, consumo de AT y crecimiento bacteriano. Glu (■), Xil (●), Gal y Man (▲), Ara (▼), AT (■), AP (●), peso seco de bacterias (▲).

Se obtuvieron 3.52 g/L de AP a la hora 72, con un  $Y_{p/s}$  de  $0.57 \pm 0.08$   $g_{AP}/g_{AT}$  con  $\mu$  de  $0.25$   $h^{-1}$ . El rendimiento producto sustrato es 22% mayor al obtenido con *P. freudenreichii* en botellas serológicas con glucosa (Ammar et al.2020). Al utilizar *P. acidipropionici* ACT-1 con glucosa el rendimiento es comparable. Sin embargo, es 13% menor cuando la fuente de carbono se cambia por galactosa (Yang et al., 2017).

Se encontró que, a pesar de la disminución del pH y que no se consumieron en su totalidad la Gal y Man, el rendimiento fue similar e incluso mayor a lo obtenido en la literatura utilizando glucosa con otras bacterias productoras de AP, por lo que se procedió a escalar el proceso a 1 L, con el fin de controlar el pH y mantener las condiciones óptimas de crecimiento.

## IV.VI Pruebas de fermentación en biorreactor con medio de cultivo modelo

### modelo

El escalamiento de botellas serológicas al biorreactor de 1L con control de pH dio como resultado una disminución del 52% en el tiempo de fermentación, ya que el consumo total de Glu, Xil, Gal, Man y Ara fue a la hora 34 (Figura 18 A). El crecimiento exponencial de bacterias se mantuvo entre las 10 y 16 horas (Figura 18 B), donde las fases de adaptación y de crecimiento exponencial fueron más cortas. Al entrar en fase estacionaria, se alcanzaron 1.67 g/L mientras que a la misma hora en las pruebas de botellas serológicas se tenía la mitad de concentración de bacterias. También se encontró que la Gal y Man fueron consumidas mayoritariamente en la fase exponencial y en su totalidad al cabo de 20 h, en comparación con las botellas serológicas. Esto fue debido a que se mantuvo el pH entre 6-6.2, lo que proporciona a las bacterias un crecimiento en condiciones óptimas.

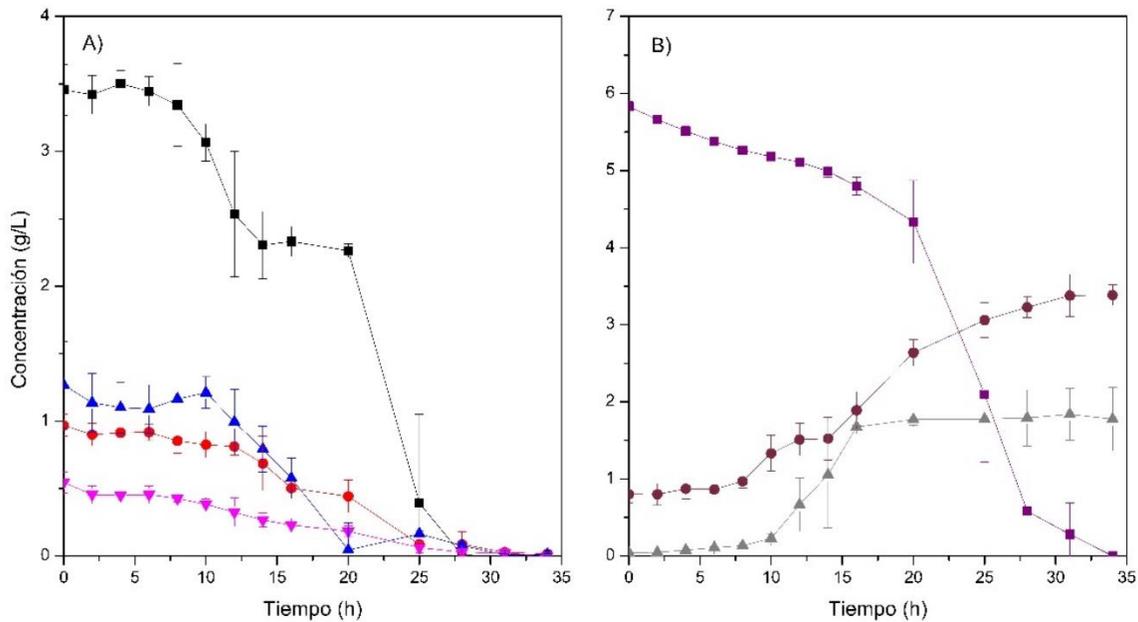


Figura 18. Producción de AP con medio de cultivo modelo en el biorreactor A) Consumo de azúcares reductores B) Producción de AP, consumo de AT y crecimiento bacteriano. Glu (■), Xil (●), Gal y Man (▲), Ara (▼), AT (■), AP (●) y peso seco de bacterias (▲).

La producción de AP se mantuvo en aumento hasta la hora 30, en donde alcanzó su máximo con 3.38 g/L con un rendimiento de 0.44 g/g<sub>AT</sub> (Tabla 7). Este parámetro fue menor que en las botellas serológicas debido a que el crecimiento bacteriano fue más rápido, ya que cuando hay un crecimiento celular significativo y formación de biomasa el rendimiento de AP es mucho menor (Zhang & Yang, 2009).

Tabla 7. Comparación de los parámetros cinéticos de la fermentación empleando medio de cultivo modelo en botellas serológicas y en el biorreactor.

Parámetro	BS	Biorreactor	Unidades
$Y_{x/s}$	0.34±0.08	0.30±0.05	$g_x g_{AT}^{-1}$
$Y_{p/s}$	0.57±0.08	0.44±0.02	$g_{AP} g_{AT}^{-1}$
$\mu$	0.25	0.26	$h^{-1}$
$t_d$	2.7	2.6	h

BS: Botellas serológicas

Aunque el control de pH favoreció el crecimiento más rápido aumentando la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) un 3%, los rendimientos  $Y_{x/s}$  y  $Y_{p/s}$  se vieron disminuidos un 12 y 23%, respectivamente. Sin embargo, a pesar de los rendimientos, los recursos energéticos y de operación son menores al disminuir el tiempo de fermentación.

Utilizando la misma cepa en un biorreactor de 500 mL y medio de cultivo modelo (Glu, Xil y Ara) se obtuvo una  $\mu$  de 0.15  $h^{-1}$ , siendo ésta, menor a la obtenida, adicionalmente, el rendimiento de AP fue comparable con el obtenido en el presente estudio (Wang et al., 2017).

Debido a que la cepa a condiciones óptimas y con el escalamiento mantiene estable su crecimiento y logró el consumo total de los diversos azúcares en el medio de cultivo modelo, se procedió a utilizar los hidrolizados con los mayores rendimientos de azúcares como medio de cultivo para la producción de AP.

#### IV.VII Pruebas de fermentación en biorreactor con hidrolizados

Para concluir con la parte experimental propuesta, se procedió a realizar las pruebas de fermentación en el biorreactor con los hidrolizados de BA. La conversión de los hidrolizados por *P. acidipropionici* (Figura 19) indicó que el consumo de AT fue del 97%

en 36 h (Figura 19 B), mientras que el consumo total de Glu fue a las 20 h, de Ara a las 24 h, de Xil, Gal y Man a las 36 h (Figura 19 A), con una producción de AP de 2.5 g/L y un rendimiento de 0.44 g<sub>AP</sub>/g<sub>AT</sub>.

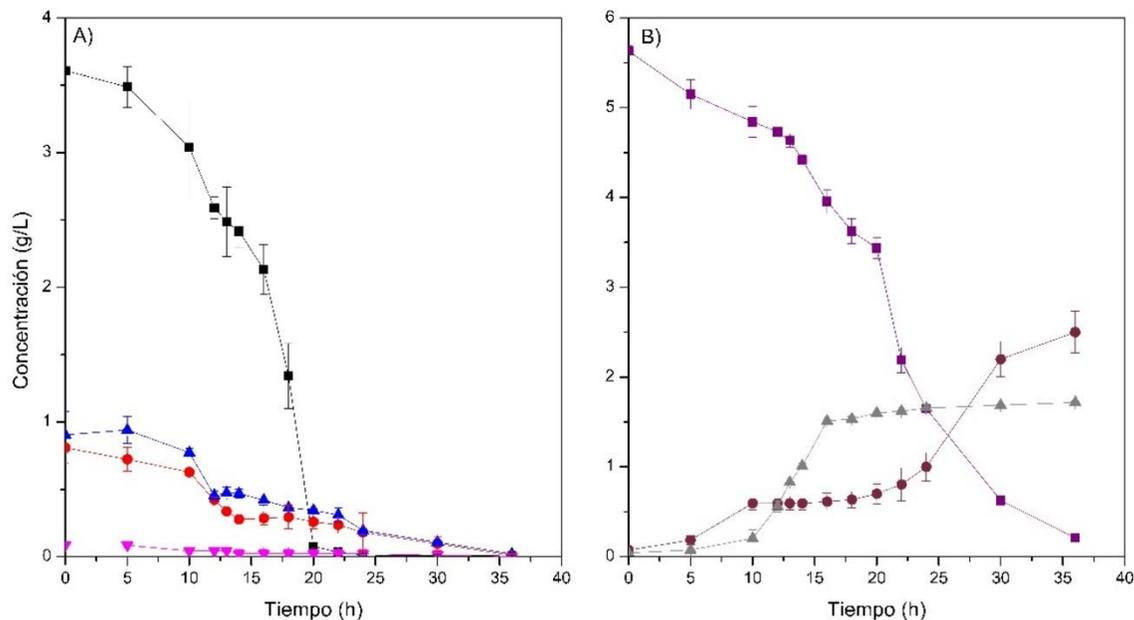


Figura 19. Producción de AP con hidrolizados de BA en el biorreactor A) Consumo de azúcares reductores B) Producción de AP, consumo de AT y crecimiento bacteriano. Glu (■), Xil (●), Gal y Man (▲), Ara (▼), AT (■), AP (●) y peso seco de bacterias (▲).

En comparación con el medio de cultivo modelo, se observó que el rendimiento de AP, el tiempo de fase estacionaria y exponencial fueron estadísticamente similares, mientras que el consumo de Glu fue 22% más rápido con los hidrolizados. Adicionalmente, la producción de AP comenzó 10 h antes con el medio de cultivo modelo, por lo cual se puede inferir que las bacterias tuvieron un periodo de adaptación a los hidrolizados debido, posiblemente a la presencia de inhibidores como fenoles, furfural, HMF y ácido acético, ya que en estudios previos se reportó su generación a concentraciones de 0.16, 1.75, 4.34 y 113.8 mg/L, respectivamente, que, aunque no son consideradas inhibitorias de la actividad microbiana, sí se encuentran presentes en la fase líquida del PT (Hernández-Vázquez et al., 2019; Hernández-Vázquez et al., 2020).

En la Tabla 8 se presentan los rendimientos de AP reportados en la literatura, para diversos tipos de biomasa, PT, HE, cepas bacterianas. Se puede observar que los rendimientos son similares indicando que la especie *P. acidipropionici* tiene la capacidad de utilizar distintos hidrolizados (Wang et al., 2017; Castro et al., 2020; Yang et al., 2017).

Tabla 8. Comparación de rendimientos de AP con la literatura.

$Y_{p/s}$ (g/g <sub>AT</sub> )	Biomasa	Condiciones de PT	Condiciones de HE	Fermentación	Referencia
<b>0.44±0.2</b>	BA	Explosión de vapor 142°C y 15 min	Cellic CTec2 (54.8 FPU/g <sub>biomasa</sub> )	<i>P. acidipropionici</i> CDBB-B-1981 (ATCC 4875) Biorreactor 1 L	Este estudio
<b>0.44-0.48</b>	Rastrojo de maíz	PT ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 160°C y 10 min	Cellic CTec2 (NE)	<i>P. acidipropionici</i> ATCC 4875 Biorreactor 1.2 L	Wang et al., 2017
<b>0.42</b>	Bagazo de sorgo	PT ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 121°C y 45 min	NA	<i>P. acidipropionici</i> CICC 10019 Biorreactor 1 L	Castro et al., 2020
<b>0.46</b>	Melaza de soya	PT ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) ebullición por 10 min	$\alpha$ -galactosidasa ( <i>A. niger</i> ) ~0.1% (w/v) (10,500 GalU/g)	<i>P. acidipropionici</i> ACT-1 Biorreactor 500 mL	Yang et al., 2017
<b>0.45</b>	Bagazo de sorgo dulce	PT ácido (HPO <sub>4</sub> ) 50°C y 43 min	Cellic CTec2 (40 FPU/g <sub>Biomasa</sub> )	<i>P. freudenreichii</i> DSM 4902 Biorreactor 3.5 L	Ammar et al., 2020
<b>0.59</b>	Bagazo de sorgo dulce	PT ácido (HPO <sub>4</sub> ) 50°C y 43 min	Cellic CTec2 (40 FPU/g <sub>Biomasa</sub> )	<i>P. freudenreichii</i> DSM 4902 Biorreactor 3.5 L Glicerol (1:1)	Ammar et al., 2020

<b>0.56</b>	Tallos de maíz	Agua caliente líquida a 10 MPa y 20 min	Celulasa NE (30 FPU/ g <sub>Biomasa</sub> )	<i>P. freudenreichii</i> CICC 10019 Biorreactor 5 L	Wang et al.,2020
-------------	----------------	---	---	---	------------------

NE: No especificado, NA: No aplica

La producción de AP en este estudio fue equiparable con la obtenida con bagazo de sorgo dulce con *P. freudenreichii*, pero 21% menor a la reportada al utilizar residuos de tallo de cultivos (Ammar et al., 2020; Wang et al, 2020). Adicionalmente, el rendimiento de 0.59 g<sub>AP</sub>/g<sub>AT</sub>, para una relación 1:1 de glicerol con hidrolizados de bagazo de sorgo dulce fue significativamente mayor al de este estudio (Ammar et al., 2020). Lo anterior es debido a que se ha reportado que el uso de glicerol beneficia el crecimiento del microorganismo y la producción de AP dado a que su uso como fuente de carbono permite que el potencial redox permanezca equilibrado, suprimiendo la producción de metabolitos adicionales al AP, por lo que podría ser un parámetro a evaluar para próximos estudios (Ammar et al., 2020).

## Capítulo V. Conclusiones

Los incrementos en el porcentaje de sólidos en el PT y la HE resultaron en mayores concentraciones de azúcares (g/L) en los hidrolizados, pero no favorecieron los rendimientos de Glu, Xil y DQO (g/g<sub>BA</sub>). Por otro lado, el aumento de la concentración enzimática a 3x favoreció los rendimientos de AT, Glu y Xil siendo de  $0.23 \pm 0.01$ ,  $0.15 \pm 0.01$  y  $0.03 \pm 0.01$  g/g<sub>BA</sub>, respectivamente. De esta forma, las condiciones de PT e HE de 2.75% de sólidos en el PT, 2.5% de sólidos y 54.8 FPU/g<sub>BA</sub> de concentración enzimática en la HE que son las que permitieron obtener los más altos rendimientos.

El BA utilizado en este estudio se caracterizó en las distintas etapas obteniendo un cambio en la composición, donde los efectos observados del PT y la HE fueron la remoción de hemicelulosa y celulosa, respectivamente, constatando lo reportado en la literatura.

Por otro lado, se logró validar las condiciones de fermentación con *P. acidipropionici* reportadas en la literatura a escala laboratorio. El control de pH mostró una reducción del 52% en los tiempos de fermentación, mientras que el escalamiento del proceso al biorreactor de 1L redujo el rendimiento de AP ( $0.44 \pm 0.02$  g<sub>AP</sub>/g<sub>AT</sub>) con el medio de cultivo modelo, sin embargo, este fue similar a lo reportado en la literatura.

La producción de AP a partir de los hidrolizados se logró con éxito obteniendo un rendimiento de 0.44 g/g<sub>BA</sub> en 36 h con un consumo del 97% de AT. El rendimiento de AP fue comparable con el obtenido utilizando medio de cultivo modelo y las reportadas en la literatura, utilizando la misma especie y subespecie del microorganismo. Por lo cual, se evidenció el potencial de los hidrolizados para ser utilizados para la producción sustentable de AP.

La hipótesis planteada en este trabajo se cumplió, ya que *P. acidipropionici* CDBB-B-1981 tuvo la capacidad metabólica para consumir en su totalidad los azúcares reductores de los hidrolizados enzimáticos del BA pretratado con explosión de vapor para la producción de AP en condiciones anaerobias.

## V.I Perspectivas

El incremento de temperatura y tiempo durante el PT puede mejorar la obtención de azúcares, debido a que la composición del BA utilizado en este estudio contiene un alto porcentaje de hemicelulosa, por lo que se requieren condiciones de explosión de vapor más severas a las utilizadas en este estudio para aumentar la digestibilidad de la biomasa.

Se sugiere también realizar pruebas con mayor aumento en la concentración enzimática y probar distintos porcentajes de sólidos, con el fin de aumentar los rendimientos de azúcares.

Adicionalmente, se puede realizar un PT físico como la molienda para aumentar la superficie de contacto de las fibras del BA, con el objetivo de mejorar los efectos del PT, así como de la obtención de azúcares.

*P. acidipropionici* tiene un amplio metabolismo de consumo de azúcares reductores, por lo cual se podría probar distintos tipos de BL, así como de realizar pruebas de tolerancia a inhibidores como el HMF y furfural.

El uso de glicerol residual de otros procesos sustentables (como en la producción de biodiesel) en la fermentación con *P. acidipropionici* de los hidrolizados de BA pretratado con explosión de vapor podría aumentar la producción de AP y, por lo tanto, el rendimiento.

## Referencias

- Abraham, A., Mathew, A., Park, H., Choi, O., Sindhu, R., Parameswaran, B., Pandey, A., Han Park, J. & Sang, B.-I. (2019). Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 301: 122725. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122725>.
- Abreu, J. (2013). Aprovechamiento de bagazo de *Agave tequilana* Weber para la producción de bio-hidrógeno. México: Instituto Potosino de Ciencia y Tecnológica.
- Aguilar, D., Rodríguez-Jasso, R., Zanuso, E., Jasso de Rodríguez, D., Amaya-Delgado, L., Sanchez, A. & Ruiz, H. (2018). Scale-up and evaluation of hydrothermal pretreatment in isothermal and non-isothermal regimen for bioethanol production using agave bagasse. *Bioresour Technol*, 263:112–119. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.100>.
- Al-Lahham, S., Peppelenbosch, M., Roelofsen, H., Vonk, R. & Venema, K. (2010). Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801 (11): 1175-1183. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.07.007>.
- Ammar, E., Martin, J., Brabo-Catala, L. & Philippidis, G. (2020). Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* using sweet sorghum bagasse hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 9619–9629.
- Annamalai, N. & Sivakumar, N. (2016). Production of polyhydroxybutyrate from wheat bran hydrolysate using *Ralstonia eutropha* through microbial fermentation. *J Biotechnol*, 237:13-17. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.09.001.
- Aulitto, M., Fusco, S., Bartolucci, S., Franzén, C. & Contursi, P. (2017). *Bacillus coagulans* MA-13: a promising thermophilic and cellulolytic strain for the production of lactic acid from lignocellulosic hydrolysate. *Biotechnol Biofuels*, 7;10:210. doi: 10.1186/s13068-017-0896-8.
- Bajpai, P. (2016). Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production. Singapore: Springer.
- Breton-Deval, L., Mendez-Acosta, H., Gonzalez-Alvarez, V., Snell-Castro, R., Gutierrez-Sanchez, D. & Arreola-Vargas, J. (2018). *Agave tequilana* bagasse for methane production in batch and sequencing batch reactors: Acid catalyst effect, batch optimization and stability of the semi-continuous process. *Journal of Environmental Management*, 224: 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.053>.

- Cao, W., Cao, W., Shen, F., Luo, J., Yin, J., Qiao, C. & Wan, Y. (2020). Membrane-assisted  $\beta$ -poly(L-malic acid) production from bagasse hydrolysates by *Aureobasidium pullulans* ipe-1. *Bioresour Technol*, 295:122260. doi:10.1016/j.biortech.2019.122260.
- Castro, P., Maeda, R., Rocha, V., Fernandes, R. & Pereira, N. (2020). Improving propionic acid production from a hemicellulosic hydrolysate of sorghum bagasse by means of cell immobilization and sequential batch operation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68 (6): 1120-1127. <https://doi.org/10.1002/bab.2031>.
- Cedeño, M. (1995). Tequila Production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15 (1): 1-11. <https://doi.org/10.3109/07388559509150529>.
- Cesário, M., Raposo, R., M D de Almeida, M., van Keulen, F., Ferreira, B., Telo, J. & R da Fonseca, F. (2014). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *Int J Biol Macromol*, 71:59-67. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054.
- Chen, H. (2015). Lignocellulose biorefinery feedstock engineering. En H. Chen, *Lignocellulose Biorefinery Engineering: Principles and Applications* (págs. 37-86). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Cherubini, F., Jungmeier, G., Wellisch, M., Willke, T., Skiadas, I., Van Ree, R. & de Jong, E. (2009). Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuels, Bioprod. Bioref*, 3:534-546 <https://doi.org/10.1002/bbb.172>.
- Cimini, D., Zaccariello, L., D'Ambrosio, S., Lama, L., Ruoppolo, G., Pepe, O., Faraco, V. & Schiraldi, C. (2019). Improved production of succinic acid from *BASFia succiniciproducens* growing on *A. donax* and process evaluation through material flow analysis. *Biotechnol Biofuels*, 12: 22. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1362-6>.
- Consejo regulador del tequila [CTR]. (2 de diciembre de 2022). Información estadística. Obtenido de <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>
- Contreras-Davila, C., Mendez-Acosta, H., Arellano-Garcia, L., Alatraste-Mondragon, F. & Razo-Flores, E. (2017). Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chemical Engineering Journal*, 313(1): 671-679. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.084>.
- De Souza T. & Kawaguti H. (2021) Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. *Food and Bioprocess Technology*, 14:1446-1477. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02678-z>

- Deng, Y., Li, S., Xu, Q., Gao, M. & Huang, H. (2012). Production of fumaric acid by simultaneous saccharification and fermentation of starchy materials with 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Rhizopus oryzae*. *Bioresour Technol*, 107:363-7. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.117.
- Dijksterhuis, J., Meijera, M., van Doorn, T., Houbraken, J. & Bruinenberg, P. (2019). The preservative propionic acid differentially affects survival of conidia and germ tubes of feed spoilage fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 306: 108258. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108258>.
- Du, C., Li, Y., Zhao, X., Pei, X., Yuan, W., Bai, F. & Jiang, Y. (2019). The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(6):2845-2855. doi: 10.1007/s00253-019-09625-1.
- Duarte, J., Valença, G., Moran, P. & Rodrigues, A. (2015). Microbial production of Propionic and Succinic acid from Sorbitol using *Propionibacterium acidipropionici*. *AMB Expr*, 5: 13. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0095-6>.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 28:350-356 <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Duran-Cruz, V., Hernández, S. & Ortíz, I. (2021). Evaluation of Steam Explosion Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis Conditions for *Agave* Bagasse in Biomethane Production. *BioEnergy Research*, <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10245-9>.
- Duscha, A., Gisevius, B., Hirschberg, S., Yissachar, N., Stangl, G., Eilers, E., Bader, V., Haase, A., Kaisler, J., David, C., Schneider, R., Troisi, R., Zent, D., Hegelmaier, T., Dokalis, N., Gerstein, S., Del Mare-Roumani, S., Amidror, S., Staszewski, O., Poschmann, G., Stühler, K., Hirche, F., Balogh, A., Kempa, S., Träger, P., Zaiss, M., Holm, J., Massa, M., Nielsen, H., Faissner, A., Lukas, C., Gatermann, S., Scholz, M., Przuntek, H., Prinz, M., Forslund, S., Winklhofer, K., Müller, D., Linker, R., Gold, R. & Haghikia, A. (2020). Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism *Cell*, 180(6): 1067-1080.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.035.
- Ehsanipour, M., Suko, A. & Bura, R. (2016). Fermentation of lignocellulosic sugars to acetic acid by *Moorella thermoacetica*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 43:807-816. DOI 10.1007/s10295-016-1756-4.
- Escuela Nacional Colegio de Ciencias y Humanidades. (07 de septiembre de 2022). Polisacáridos. Obtenido de Portal Académico: <https://e1.portalacademico.cch.unam.mx/alumno/quimica2/unidad2/carbohidratos/polisacaridos>

- Flores-Gómez, C., Escamilla, E., Zhong, C., Dale, B., da Costa, L. & Balan, V. (2018). Conversion of lignocellulosic agave residues into liquid biofuels using an AFEX™-based biorefinery. *Biotechnol Biofuels*, 11(1):7. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0995-6>.
- Fu, H., Yang, S., Wang, M., Wang, J. & Tang, C. (2017). Butyric acid production from lignocellulosic biomass hydrolysates by engineered *Clostridium tyrobutyricum* overexpressing xylose catabolism genes for glucose and xylose co-utilization. *Bioresource Technology*, 234: 389-396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.073>.
- Galindo-Hernández, K., Tapia-Rodríguez, A., Alatríste-Mondragón, F., Celis, L., Arreola-Vargas, J. & Razo-Flores, E. (2018). Enhancing saccharification of *Agave tequilana* bagasse by oxidative delignification and enzymatic synergism for the production of hydrogen and methane. *Int J Hydrog Energy*, 43:22116–22125. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.071>.
- Gérando, H., Fayolle-Guichard, F., Rudant, L., Millah, S., Monot, L., Lopes Ferreira, N. & López-Contreras, A. (2016). Improving isopropanol tolerance and production of *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 by random mutagenesis and genome shuffling. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(12):5427-36. DOI: 10.1007/s00253-016-7302-5.
- Goldberg, I. & Rokem, J. (2019). Organic and Fatty Acid Production, *Microbial Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)*, 358-382. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13083-3>.
- Gómez, F. (2008). Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano. Tesis de maestría Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., 17-21.
- González-Fandos, E., Maya, N. & Pérez-Arnedo, I. (2015). Effect of propionic acid on *Campylobacter jejuni* attached to chicken skin during refrigerated storage. *International Microbiology*, 18:171-175. doi:10.2436/20.1501.01.247.
- Gonzalez-Garcia, R., McCubbin, T., Navon, L., Stowers, C., Nielsen, L. & Marcellin, E. (2017). Microbial Propionic Acid Production. *Fermentation*, 3, 21; doi:10.3390/fermentation3020021.
- Guragain, Y. (2015). Sustainable bioprocessing of various biomass feedstocks: 2,3-butanediol production using novel pretreatment and fermentation. Manhattan: Kansas State University.
- HACH, C. (2021). Oxygen Demand, Chemical-Reactor Digestion COD Method 8000 ULR, LR, HR, HR plus+. Ed 13.

- Hernández-Vázquez, A., Hernández, S. & Ortíz, I. (2020). Hydrothermal pretreatment of *Agave* bagasse for biomethane production: Operating conditions and energy balance. *Biomass and Bioenergy*, 142: 105753. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105753>.
- Hernández-Vázquez, A., Ortíz, I. & Hernández, S. (2019). Pretratamiento por explosión de vapor de bagazo de agave para la obtención de azúcares fermentables para su posterior conversión a biocombustibles gaseosos. CDMX: Idonéa comunicación de resultados. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Hingsamer, M. & Jungmeier, G. (2018). Biorefineries. En C. Lago, N. Caldés, & Y. Lechón, *The Role of Bioenergy in the Emerging Bioeconomy: Resources, Technologies, Sustainability and Policy* (págs. 179-221). Academic Press.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2019). *Conociendo la Industria del Tequila y Mezcal*. México: Colección de estudios sectoriales y regionales.
- Jaramillo, J. & Cardona, C. (2011). análisis de la producción de biobutanol en la fermentación acetobutilica con *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564. *Rev.fac.ing.univ. Antioquia*, 58: 36-45.
- Jungmeier, G., Cherubini, F., Dohy, M., de Jong, E., Jørgensen, H. & Mandl, M. (2009) Definition and classification of biorefinery systems? The approach in IEA Bioenergy Task 42 Biorefineries. In: Presentation held at the Biorefinery Course Adding Value to the Sustainable Utilisation of Biomass. Ghent, Belgium.
- Kestur, S., Flores-Sahagun, T., Pereira, L., Dos Santos, J., Mazzaro, I. & Mikowski, A. (2013). Characterization of blue agave bagasse fibers of Mexico. *Composites: Part A*, 45: 153–161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesa.2012.09.001>.
- Krasznai, D., Champagne Hartley, R., Roy, H., Champagne, P. & Cunningham, M. (2018). Compositional analysis of lignocellulosic biomass: conventional methodologies and future outlook. *Crit Rev Biotechnol*, 38(2): 199-217. doi: 10.1080/07388551.2017.1331336.
- Li, M. & Wilkins, M. (2021). Fed-batch polyhydroxybutyrate production by *Paraburkholderia sacchari* from a ternary mixture of glucose, xylose and arabinose. *Bioprocess Biosyst Eng*, 44(1):185-193. doi: 10.1007/s00449-020-02434-1.
- Liu, L., Liu, L., Zhu, Y., Li, J., Wang, M., Lee, P., Du, G. & Chen, J. (2012). Microbial production of propionic acid from propionibacteria: Current state, challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4): 374–381. DOI: 10.3109/07388551.2011.651428.
- Liu, S., Bischoff, K., Leathers, T., Qureshi, N., Rich, J. & Hughes, S. (2013). Butyric acid from anaerobic fermentation of lignocellulosic biomass hydrolysates by

- Clostridium tyrobutyricum* strain RPT-4213. *Bioresour Technol*, 143:322-9. doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.015.
- Lopez-Gutierrez, I., Montiel-Corona, V., Calderon-Soto, L., Palomo-Briones, R., Mendez-Acosta, H., Razo-Flores, E., Ontiveros-Valencia, A. & Alatraste-Mongragon, F. (2021). Evaluation of the continuous methane production from an enzymatic *Agave* bagasse hydrolysate in suspended (CSTR) and granular biomass systems (UASB). *Fuel*, 304: 121406. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121406>.
- Martínez , E. (2015). Biorrefinerías Sustentables: Integración es la clave. *Ciencia y Desarrollo*, 277.
- Mejías-Brizuela, N., Orozco-Guillen, E. & Galáan-Hernández, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2 (6): 27-41.
- Montiel, V. & Razo-Flores, E. (2018). Continuous hydrogen and methane production from *Agave tequilana* bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresour Technol*, 249:334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>.
- Montoya-Rosales, J., Olmos-Hernandez, D., Palomo-Briones, R., Montiel-Corona, V., Mari, A. & Razo-Flores, E. (2019). Improvement of continuous hydrogen production using individual and binary enzymatic hydrolysates of agave bagasse in suspended-culture and biofilm reactors. *Bioresource Technology*, 283: 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.072>.
- Ostendorf, F., Metzdorf, J., Gold, R., Haghikia, A. & Tönges, L. (2020). Propionic Acid and Fasudil as Treatment Against Rotenone Toxicity in an In Vitro Model of Parkinson's Disease. *Molecules*, 25(11):2502. doi:10.3390/molecules25112502.
- Ovando-Chacón, S. & Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21 (42): 111-120.
- Palomo-Briones, R., López-Gutiérrez, I., Islas-Lugo, F., Galindo-Hernández, K., Munguía-Aguilar, D., Rincón-Pérez, J., Córtes-Carmona, M., Alatraste-Mondragón, F. & Razo-Flores, E. (2017). *Agave* bagasse biorefinery: processing and perspectives. *Clean Techn Environ Policy*, 20 (7): 1423-1441. DOI 10.1007/s10098-017-1421-2.
- Parizzi, L., Grassi, M., Llerena, L., Carazzolle, M., Queiroz, V., Lunardi, I., Zeidler, A., Teixeira, P., Mieczkowski, P., Rincones, J. & Pereira, G. (2012). The genome sequence of *Propionibacterium acidipropionici* provides insights into its

- biotechnological and industrial potential. *BMC Genomics*, 13:562. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-562>.
- Perez-Pimienta, J., Flores-Gómez, C., Ruiz, H., Sathitsuksanoh, N., Balan, V., Costa, S., Dale, B., Singh, S. & Simmons, B. (2016). Evaluation of agave bagasse recalcitrance using AFEXTM autohydrolysis, and ionic liquid pretreatments. *Bioresour Technol*, 211:216–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.103>.
- Perez-Pimienta, J., Icaza-Herrera, J., Mendez-Acosta, H., Gonzalez-Alvarez, V., Mendoza-Perez, J. & Arreola-Vargas, J. (2020). Bioderived ionic liquid-based pretreatment enhances methane production from *Agave tequilana* bagasse. *RSC Adv*, 10: 14025. DOI: 10.1039/d0ra01849j.
- Perez-Pimienta, J., Mojica-Álvarez, R., Sánchez-Herrera, L., Mittal, A. & Sykes, R. (2018). Recalcitrance assessment of the agroindustrial residues from five agave species: ionic liquid pretreatment, saccharification and structural characterization. *Bioenerg Res*, 11:551–561. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9920-5>.
- Pham, C., Lee, J., Yu, J., Lee, S., Yu, K., Hong, J., Cho, N., Kim, S., Kang, D., Lee, S. & Yoo, H. (2021). Anticancer Effects of Propionic Acid Inducing Cell Death in Cervical Cancer Cells. *Molecules*, 26(16): 4951. doi:10.3390/molecules26164951.
- Pielhop, T., Amgarten, J., Studer, M. & von Rohr, P. (2017). Pilot-scale steam explosion pretreatment with 2-naphthol to overcome high softwood recalcitrance. *Biotechnol Biofuels*, 10:130 <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0816-y>.
- Preeti, V., Kumar, A. & Singh, S. (2018). Biomass breakdown: A review on pretreatment, instrumentations and methods. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 10(1): 155-174. DOI: 10.2741/E815.
- Rajendran, K., Drielak, E., Varma, V., Muthusamy, S. & Kumar, G. (2017). Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production—a review. *Biomass Conv Bioref*, 8:471–483. DOI: 10.1007/s13399-017-0269-3.
- Rodríguez-López, J., Sánchez, A., Gómez, D., Romaní, A. & Parajó, J. (2011). Fermentative production of fumaric acid from *Eucalyptus globulus* wood hydrolyzates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(7):1036-1040 <https://doi.org/10.1002/jctb.2729>.
- Salinas, E. & Gasca, V. (2009). Los biocombustibles. *El cotidiano*, 157: 75-82.
- Sedlar, K., Kolek, J., Gruber, M., Jureckova, K., Branska, B., Csaba, G., Vasylykivska, M., Zimmer, R., Patakova, P. & Provaznik, I. (2019). A transcriptional response of *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 to a butanol shock. *Biotechnol Biofuels*, 12:243. DOI: 10.1186/s13068-019-1584-7.

- Singhvi, M. & Gokhale, D. (2019). Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103:9305–9320. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10212-7>.
- Tapia-Rodriguez, A., Ibarra-Faz, E. & Razo-Flores, E. (2019). Hydrogen and methane production potential of agave bagasse enzymatic hydrolysates and comparative technoeconomic feasibility implications. *Int J Hydrog Energy*, 44:17792–17801. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.087>.
- Tenorio, N. (2019). Producción de 2,3-butanodiol a partir del hidrolizado de bagazo de agave por fermentación con la cepa bacteriana *Enterobacter aerogenes* CDBB-B-958. CDMX. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Valencia-Ojeda, C., Montoya-Rosales, J., Palomo-Briones, R., Montiel-Corona, V., Celis, L. & Razo-Flores, E. (2021). Saccharification of agave bagasse with Cellulase 50 XL is an effective alternative to highly specialized lignocellulosic enzymes for continuous hydrogen production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4):105448. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105448>.
- Wang, P., Shen, C., Li, L., Guo, J., Cong, Q. & Lu, J. (2020). Simultaneous production of propionic acid and vitamin B12 from corn stalk hydrolysates by *Propionibacterium freudenreichii* in an expanded bed adsorption bioreactor. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1734942>.
- Wang, S. & Luo, Z. (2017). *Pyrolysis of Biomass*. Hangzhou, China: De Gruyter.
- Wang, S., Dai, G., Yang, H. & Luo, Z. (2017). Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 62: 33-86. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2017.05.004>.
- Wang, X., Salvachúa, D., Sánchez, V., Michener, W., Bratis, A., Dorgan, J. & Beckham, G. (2017). Propionic acid production from corn stover hydrolysate by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol Biofuels*, 10:200. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0884-z>.
- Wang, Z., Jin, Y. & Yang, S.-T. (2014). High Cell Density Propionic Acid Fermentation with an Acid Tolerant Strain of *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol Bioeng*, 9999: 1–10.
- Wyman, C. (1996). *Handbook on bioethanol: Production and utilization*. Boca Raton: CRC Press.
- Xi, Y., Dai, W., Xu, R., Zhang, J., Chen, K., Jiang, M., Wei, P. & Ouyang, P. (2013). Ultrasonic pretreatment and acid hydrolysis of sugarcane bagasse for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 36(11):1779-85. doi: 10.1007/s00449-013-0953-z.

- Xia, Z., Han, Y., Wang, K., Guo, S., Wu, D., Huang, X., Li, Z. & Zhu, L. (2017). Oral administration of propionic acid during lactation enhances the colonic barrier function. *Lipids Health Dis*, 16:62. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0452-3>.
- Yang, H., Wang, Z., Lin, M. & Yang, S.-T. (2017). Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresource Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.016>.
- Zhang, A. & Yang, S.-T. (2009). Engineering *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid tolerance and fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 104: 766–773. DOI 10.1002/bit.22437.
- Zhang, C., Li, T. & He, J. (2018). Characterization and genome analysis of a butanol-isopropanol-producing *Clostridium beijerinckii* strain BGS1. *Biotechnol Biofuels*, 11:280. doi: 10.1186/s13068-018-1274-x.
- Zhang, X. & Percival, Y. (2013). Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. En S.-T. Yang, H. El-Enshasy, & N. Thongchul, *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers* (págs. 131-146). U.S.: John Wiley & Sons, Inc.
- Zhang, Y. & Vadlani, P. (2013). D-Lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng*, 36:1897–1904. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0965-8>.

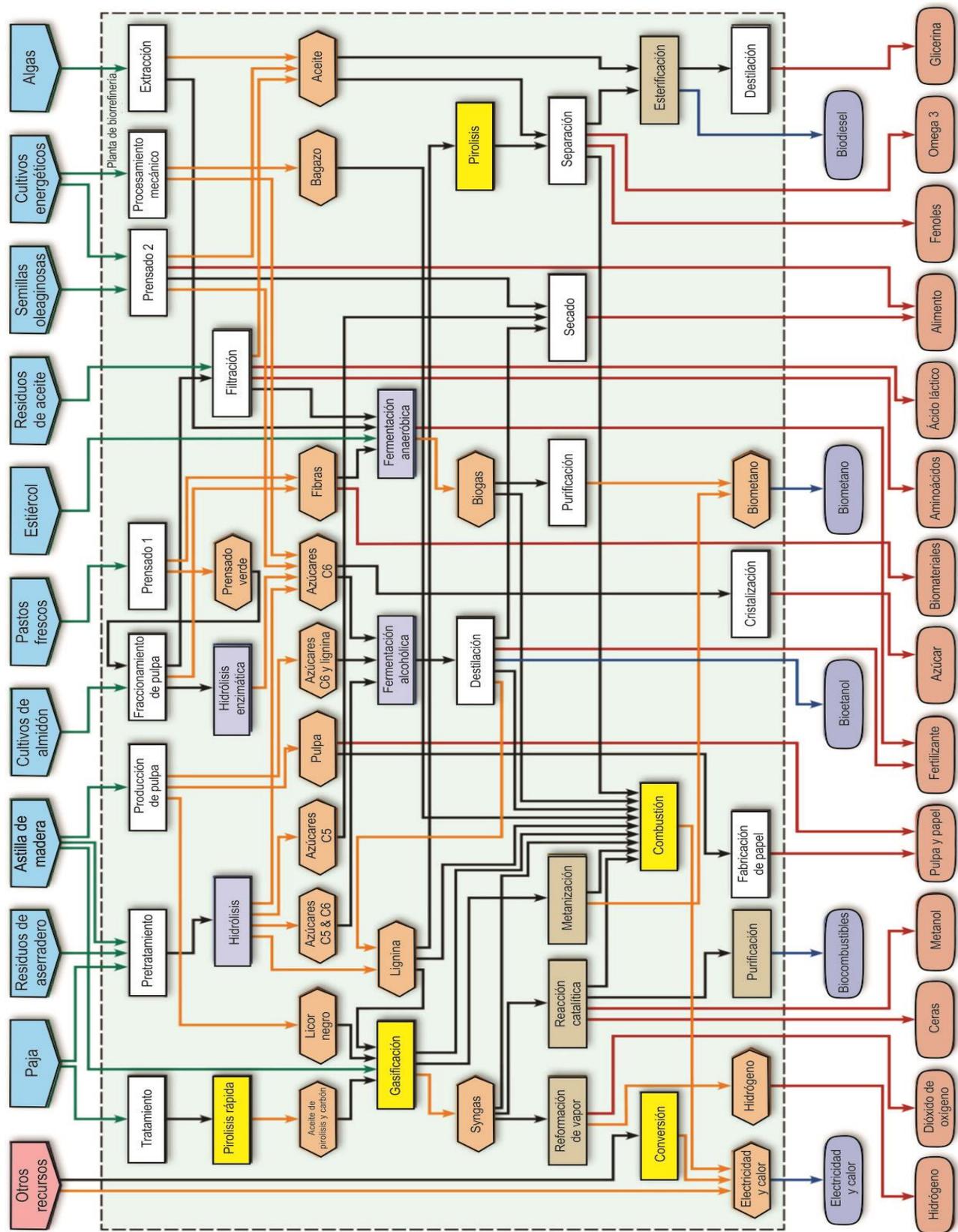
## Anexos

### Anexo 1. Clasificación y estructura de las biorrefinerías

La clasificación de las biorrefinerías consta de la combinación de cuatro principales características: Plataforma, productos, materias primas y procesos. Las plataformas son consideradas la característica más importante, estas son productos intermedios que pueden transformarse en otros productos intermedios o finales como: Azúcares C5 (pentosas), C6 (hexosas), lignina, aceites, líquidos pirolíticos, proteínas, fibras, etc. Los procesos están divididos en termoquímicos, bioquímicos, procesos químicos y mecánicos/físicos. Mientras que los productos se clasifican en dos; energéticos (biodiesel, bioetanol, biometano, biocombustibles sintéticos, electricidad y calor) y materiales (comida, comida para animales, fertilizantes, glicerina, biomateriales, químicos, bloques de construcción, polímeros, resinas y biohidrógeno) (Cherubini et al., 2009).

En el caso de los biocombustibles, se clasifican dependiendo de su generación, la primera utiliza biomasa de cultivos dedicados con alto contenido de almidón, azúcares y aceites; la segunda ocupa residuos, tanto agrícolas como forestales y desechos urbanos; la tercera usa cultivos energéticos o microalgas; la cuarta se basa en utilizar bacterias modificadas con capacidad de aprovechar el CO<sub>2</sub> para la obtención del producto.

Dependiendo de la biomasa, existen diversas alternativas de procesamiento para la obtención de productos, biocombustibles y/o energía, como se muestra en el Anexo 1. Por ejemplo, al utilizar la paja (BL) como materia prima se tienen dos opciones de proceso, tratamiento (pirólisis rápida) y pretratamiento (hidrólisis), de las cuales se pueden obtener las siguientes plataformas respectivamente: aceite de pirólisis y carbón; lignina, azúcares C5 y C6. Siguiendo las líneas de producción se puede obtener electricidad y calor, biocombustibles, metanol, ceras, dióxido de oxígeno, fertilizantes, alimento, entre otros.



Anexo 1. Estructura de las biorrefinerías. Modificado de: Hingsamer & Jungmeier, 2018.

## Anexo 2. Clasificación de los pretratamientos

En el Anexo 2 se presentan la clasificación de los diferentes pretratamientos, las ventajas y desventajas, donde se puede comparar con la explosión de vapor, que es un PT fisicoquímico que presenta una ventaja ambiental y energética en comparación de los PT físicos y químicos, respecto a los biológicos, la explosión de vapor es un proceso más rápido, aunque puede presentarse complementario a procesos enzimáticos.

Anexo 2. Clasificación de los pretratamientos, sus ventajas y desventajas.

Clasificación	Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
<b>Físico</b>	Molienda	Reducción de la cristalinidad de la celulosa y tamaño de partícula, incremento de área de contacto.	Alta demanda de electricidad y necesidad de utilizar otro pretratamiento complementario.
	Irradiación	Disrupción de puentes de hidrógeno y cristalinidad de la celulosa, incremento de área de contacto y rápida transferencia de calor.	Son en su mayoría intensivos en energía, lentos, costosos y con problemas de escalabilidad
<b>Fisicoquímico</b>	Explosión de vapor	Uso limitado de productos químicos, requiere poca entrada de energía sin costo de reciclaje o ambiental	Riesgo de condensación y precipitación de los componentes solubles de la lignina que hacen que la biomasa sea menos digerible
<b>Químico</b>	Ácido	Hidrólisis de hemicelulosa y celulosa, altos rendimientos.	Formación de inhibidores, requiere neutralización, y disminución de tamaño de partícula, también puede haber corrosión.
	Alcalino	Hidrólisis de lignina, bajas temperaturas y presiones, baja degradación de azúcares comparado con el pretratamiento ácido.	Menor efectividad a medida que aumenta el contenido de lignina y la conversión de álcali en sales irre recuperables y/o la incorporación de sales a la biomasa durante las reacciones de pretratamiento.
	Peróxido de hidrógeno	Fraccionamiento de la biomasa a presión ambiente y bajas temperaturas.	El alto costo de los oxidantes es una limitación importante para escalar a niveles industriales y formación de inhibidores.



---

<b>Biológico</b>	Microbiológico	Hidrólisis de lignina y hemicelulosa, no formación de inhibidores, bajo consumo de energía	Lento proceso, pérdida de carbones, necesidad de esterilizar
	Enzimático	Alteración de la estructura, delignificación, rápido proceso, parcial hidrólisis de hemicelulosa y bajo consumo de energía	Alto costo de enzimas y continua adición.

---

### **Anexo 3. Productos potenciales a partir de los hidrolizados del bagazo de *Agave***

La generación de bioproductos se realiza a partir de la fermentación de los azúcares reductores obtenidos de la HE. Estos pueden ser biocombustibles, bioplásticos, metabolitos secundarios, subproductos o bloques de construcción. En el Anexo 3 se encuentran ejemplos de distintos tipos de productos potenciales obtenidos a partir de residuos lignocelulósicos. También se mencionan los microorganismos utilizados, ventajas, desventajas y aportaciones que se podrían tener al seleccionarlos.

Algunos de los productos potenciales son: biocombustibles, ácidos orgánicos, bioplásticos, entre otros. Algunos como el etanol y el ácido acético que, si bien son útiles en la vida diaria, tienen costos bajos en el mercado, por lo que representan una desventaja al utilizar residuos lignocelulósicos debido a los procesos que se deben llevar a cabo. Por ejemplo, la producción de 2,3 butanodiol con *Enterobacter aerogenes* CDBB-B-958 tiene como principal que la cepa se encuentra en la UAM-C, sin embargo, conlleva un riesgo biológico utilizarla. Algunos microorganismos como *Rhizopus arrhizus* DSM 5772 y *Aureobasidium pullulans* ipe-1 también representan riesgos a la salud, por lo que han sido descartados para la producción de ácido fumárico y  $\beta$  Poli (L-ácido málico) respectivamente.

La fermentación IBE tiene una gran ventaja sobre la fermentación ABE, debido a que la producción de acetona es despreciable, por lo que el producto final no es corrosivo y se puede ocupar en conjunto como aditivo para motores de chispa. Sin embargo, los microorganismos utilizados son anaerobios estrictos, lo que representa un aumento a los costos por el constante flujo de gases como CO<sub>2</sub> o N<sub>2</sub>.

La producción de biopolímeros como el PHB y P(3HB-co-4HB) tienen como atractivo la creación de bioplásticos biodegradables para la sustitución de plásticos derivados del petróleo, no obstante, presentan como desventaja los bajos rendimientos a comparación de otros productos o el uso de precursores.

Otro producto potencial es el ácido propiónico con *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875, ya que presenta ventajas de utilizar glucosa, xilosa y arabinosa, además de

la producción de ácido láctico y succínico. En el estudio realizado por Wang et. al. (2017) se presenta la producción con diferentes condiciones que dan un panorama amplio de la fermentación.

Anexo 3. Productos potenciales a partir de biomasa lignocelulósica.

Producto	Microorganismo	Tipo de organismo	Observaciones	Aportación	Referencia
<b>Etanol</b>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CICC 1727-5	Anaeróbica facultativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción de Xilitol</li> <li>• Requiere de aireación, pero baja rendimientos de etanol</li> <li>• Muy estudiado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy poco rentable por baja concentración de azúcares</li> <li>• Cepas con metabolización de Glu, Xil y Ara</li> <li>• Afinidad por Xil</li> </ul>	Du et al., 2019
	<i>Spathaspora passalidarum</i> ATCC MYA-4345				
<b>2, 3 Butanodiol</b>	<i>Bacillus licheniformis</i> DMS8785	Anaeróbica facultativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja disponibilidad de oxígeno</li> <li>• Generación de otros productos</li> <li>• Cepa muy poco estudiada</li> <li>• Riesgo biológico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntesis más respetuosa al ambiente</li> <li>• Producto muy utilizado industrialmente</li> </ul>	GURAGAIN, 2015
	<i>Enterobacter aerogenes</i> CDBB-B-958				Tenorio, 2019
<b>ABE (acetona, butanol y etanol)</b>	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	Anaeróbica estricta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Super productora</li> <li>• Bastante estudiada</li> <li>• Análisis transcripcionales en su mayoría.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acetona muy corrosiva</li> <li>• Requiere de separación</li> <li>• Producción de biocombustibles y solventes</li> </ul>	Jaramillo & Cardona, 2011
	<i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B-598				Sedlar et al., 2019
<b>IBE (isopropanol, butanol y etanol)</b>	<i>Clostridium beijerinckii</i> BGS1	Anaeróbica estricta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy poco estudiada</li> <li>• Consume ácido láctico producido por contaminaciones en la EH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción de biocombustibles para motor de chispa</li> <li>• No requiere separación de los productos</li> </ul>	Zhang et al., 2018
	<i>Clostridium beijerinckii</i> DSM 6423 (NRRL B-593)				Gérando et al., 2016
<b>Ácido fumárico</b>	<i>Rhizopus oryzae</i> ME-F12	Aeróbica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ha sido estudiada</li> <li>• Patente china de mutación</li> <li>• Fed-batch</li> <li>• Patógeno oportunista</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 g en \$1,200 MXN</li> <li>• 0.3-0.4 g/g</li> <li>• Utilizado industrialmente, mayormente en productos alimenticios.</li> </ul>	Deng et al., 2012
	<i>Rhizopus arrhizus</i> DSM 5772				Rodríguez-López et al., 2011)

				<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fermentación líquida.</li> <li>• Obtención de algunas cepas a partir de fruta.</li> </ul>	
<b>β Poli (L-ácido málico)</b>	<i>Aureobasidium pullulans</i> ipe-1 (CGMCC no. 3337)	Aeróbica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exposición crónica provoca neumonitis</li> <li>• Alta concentración de glucosa y poca producción.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biopolímero nuevo, poco estudiado y con aplicaciones biomédicas.</li> </ul>	Cao et al., 2020
<b>Ácido butírico</b>	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> DSMZ 2637	Anaeróbica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido acético, hidrógeno y CO<sub>2</sub>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Componente valioso para la producción de productos químicos y materiales</li> <li>• Se produce a partir del petróleo.</li> </ul>	Fu et al., 2017
	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> RPT-4213		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Butanol</li> </ul>		Liu et al., 2013
<b>Ácido acético</b>	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	Anaeróbica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy comercial</li> <li>• Pocos estudios al respecto</li> <li>• Cepa consumidora de CO<sub>2</sub>, Glu, Xil, Fru.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy poco rentable por baja concentración de azúcares</li> <li>• Producto generado por el pretratamiento.</li> </ul>	Ehsanipour et al., 2016
<b>Ácido D-Láctico</b>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 9649	Anaeróbica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altos rendimientos 0.81 g/g azúcar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polímeros de polilactato (PLA) bioplástico biodegradable y biocompatible.</li> <li>• 167 artículos al respecto.</li> </ul>	Zhang & Vadlani, 2013
	<i>Bacillus coagulans</i> MA-13		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy poco estudiada</li> </ul>		Aulitto et al., 2017
<b>Ácido propiónico</b>	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4875	Anaeróbica facultativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glu. Xil y Ara.</li> <li>• Ácido láctico.</li> <li>• Estudio muy completo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es un conservante e intermedio químico en las industrias</li> <li>• Separación de los ácidos orgánicos.</li> </ul>	Wang et al., 2017
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> DSM 49027		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido acético, ácido succínico.</li> <li>• No consumió Xil, a pesar de su capacidad.</li> </ul>		Ammar et al., 2020
<b>Ácido succínico</b>	<i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113	Anaeróbica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido fórmico y acético</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso en solventes verdes y plásticos</li> </ul>	Xi et al., 2013

	<i>Basfia succiniciproducens</i> BPP7		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido láctico.</li> <li>• Fed batch.</li> <li>• Adición de Glu.</li> </ul>	biodegradables e ingredientes para estimular el crecimiento de las plantas. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rendimientos altos (0.8-0.9 g/g)</li> </ul>	Cimini et al., 2019
<b>PHB (Polihidroxi butirato)</b>	<i>Paraburkholderia sacchari</i> DSM 17165	Aeróbica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fed batch</li> <li>• Rendimiento de 0.2 g/g</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plástico biodegradable</li> <li>• Propiedades físicas y químicas similares a las de los plásticos</li> </ul>	Li & Wilkins, 2021
	<i>Ralstonia eutropha</i> NCIMB 11599		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rendimiento de 0.3 g/g</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resistente al agua</li> <li>• 100% biodegradable</li> <li>• Bastante estudiado por su potencial</li> </ul>	Annamalai & Sivakumar, 2016
<b>P (3HB- co -4HB) (poli (3-hidroxi butirato- co -4-hidroxi butirato))</b>	<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	Aeróbica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precursores: 1,4-butanediol y Gamma-butirolactona.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variedad de propiedades mecánicas desde plástico cristalino duro hasta caucho muy elástico.</li> <li>• Aplicación en los campos médico y farmacéutico.</li> </ul>	Cesário et al., 2014

#### **Anexo 4. Estudios del AP para prevención y tratamiento de enfermedades**

En su uso como conservador se ha reportado que inhibe el crecimiento de *Aspergillus flavus*, *proliferans* y *chevalieri*, *Bacillus* aeróbicos, *Salmonella*, entre otros (Liu et al., 2012; Dijksterhuis et al., 2019). A parte de estos microorganismos, también se encuentra inhibición eficaz de crecimiento de *Campylobacter jejuni*, este es un patógeno asociado al pollo, además fue eficaz para reducir los recuentos de psicrótrofos y *Pseudomonas* durante el almacenamiento (González-Fandos et al., 2015).

Adicionalmente, se han realizado estudios para analizar los beneficios del AP en la flora intestinal del ser humano, ya que podría considerarse beneficioso en el contexto de la prevención de la obesidad y la diabetes tipo 2. Además, reduce el contenido de ácidos grasos en el hígado y el plasma, reduce la ingesta de alimentos, ejerce acciones inmunosupresoras y probablemente mejora la sensibilidad a la insulina de los tejidos (Al-Lahham et al., 2010).

Se han realizado pruebas en ratas siete días antes de destetarlas, donde se suplementaban con AP, los resultados obtenidos llevaron a la conclusión del valor potencial del AP para la prevención y el tratamiento de enfermedades intestinales, como la enterocolitis necrotizante y la regulación de la nutrición en los recién nacidos (Xia et al., 2017).

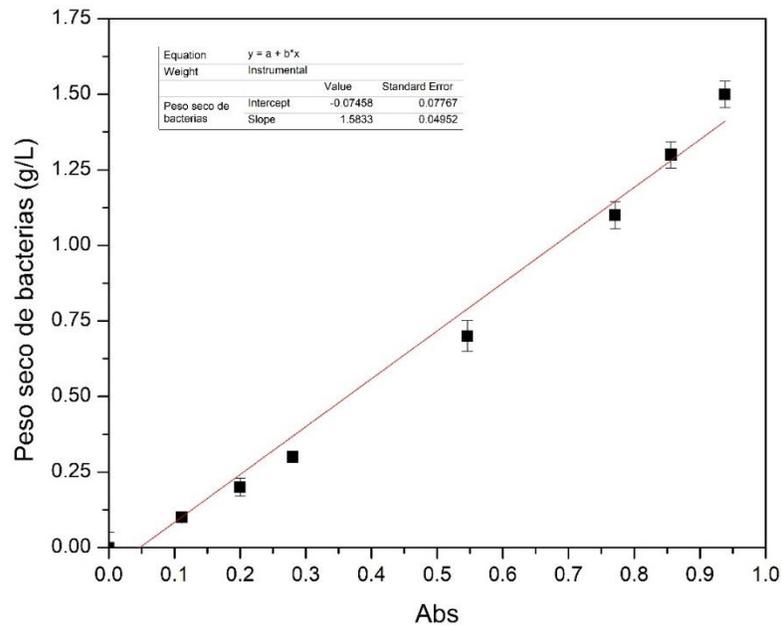
Actualmente, se ha encontrado que el AP producido por fermentación bacteriana tiene efectos oncoprotectores, que podría servir como una opción terapéutica potencialmente efectiva para el tratamiento del cáncer de cuello uterino (Pham et al., 2021). Así también se han realizado estudios para el Parkinson *in vitro*, con el fin de determinar los efectos del AP como neuroprotector, donde se muestra un potencial beneficioso en las células mesencefálicas primarias lesionadas por rotenona (Ostendorf et al., 2020).

Adicionalmente se llevó a cabo un estudio en pacientes con esclerosis múltiple, donde concluyeron que el AP puede servir como un potente complemento inmunomodulador (mejora la respuesta inmunitaria) para los medicamentos contra la esclerosis múltiple

(Duscha et al., 2020). Debido a los diversos usos y sus relevancias en estudios clínicos, se encuentra potencial en su bioproducción.

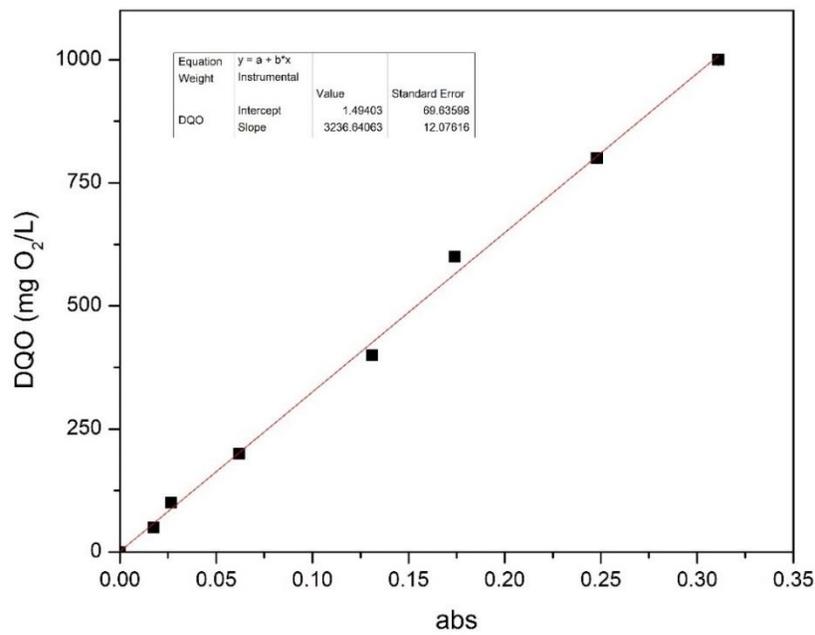
## Anexo 5. Curvas estándar de las metodologías

### Curva estándar de peso seco de las bacterias (g/L) y absorbancia (600 nm).



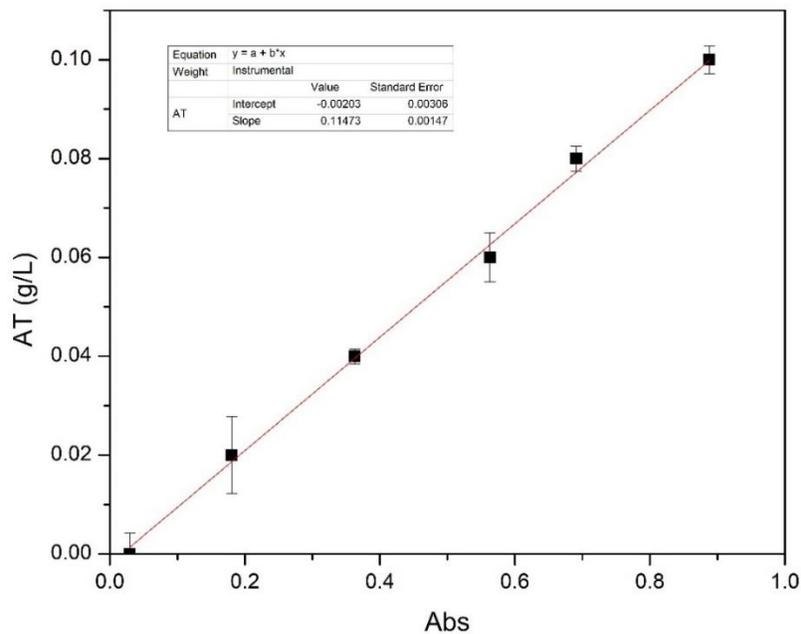
Anexo 4. Curva estándar de la concentración de las bacterias.

### Curva estándar de concentración de DQO y absorbancia (620 nm)



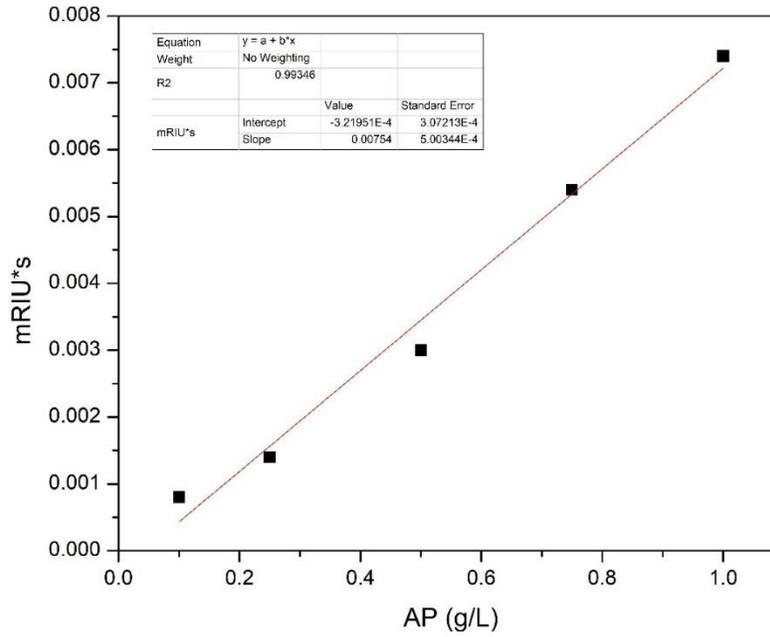
Anexo 5. Curva estándar de DQO.

### Curva estándar de concentración de AT y absorbancia (485 nm)



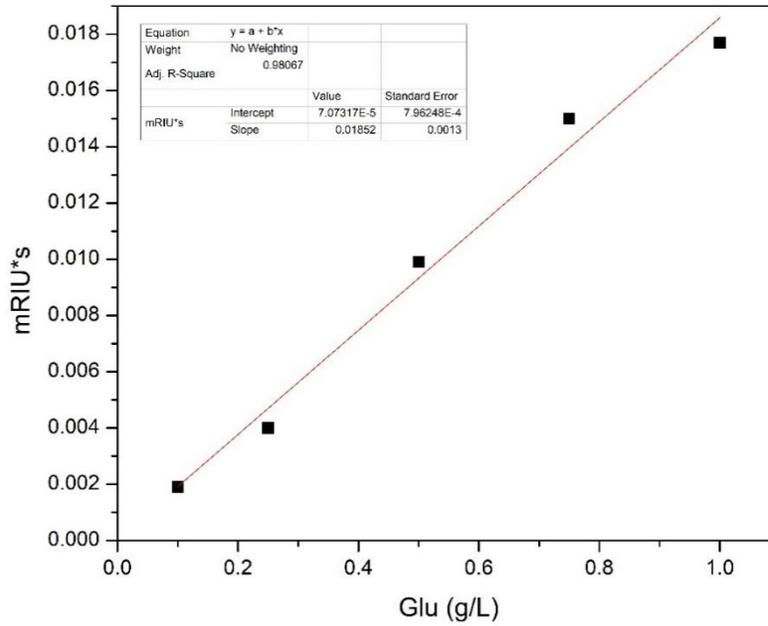
Anexo 6. Curva estándar de AT.

**Curva estándar de AP en HPLC. Concentración de AP vs área bajo la curva (mRIU\*s)**



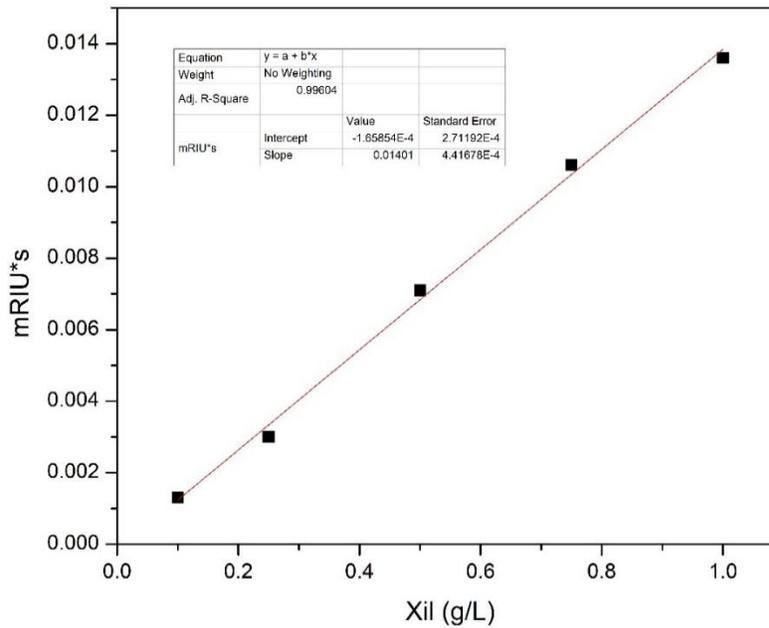
Anexo 7. Curva estándar de AP.

**Curva estándar de Glu en HPLC. Concentración de Glu vs área bajo la curva (mRIU\*s)**



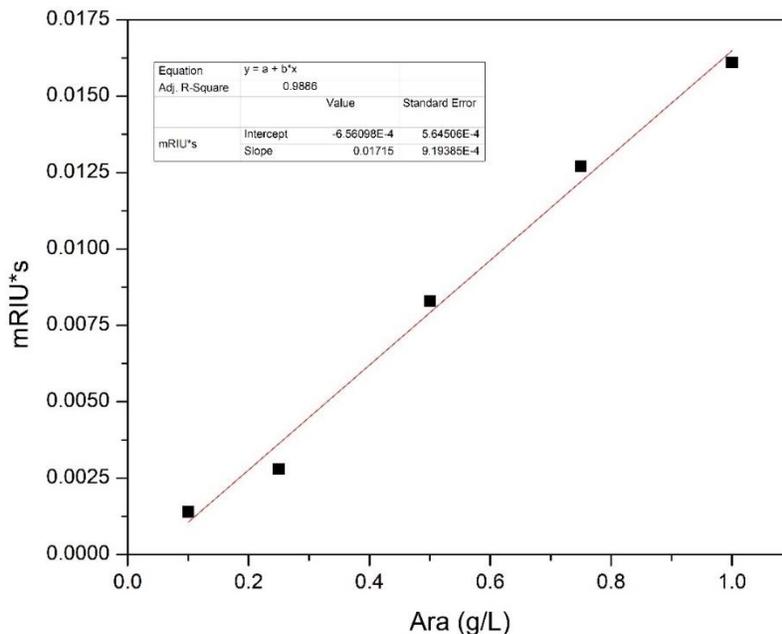
Anexo 8. Curva estándar de Glu.

**Curva estándar de Xil en HPLC. Concentración de Xil vs área bajo la curva (mRIU\*s)**



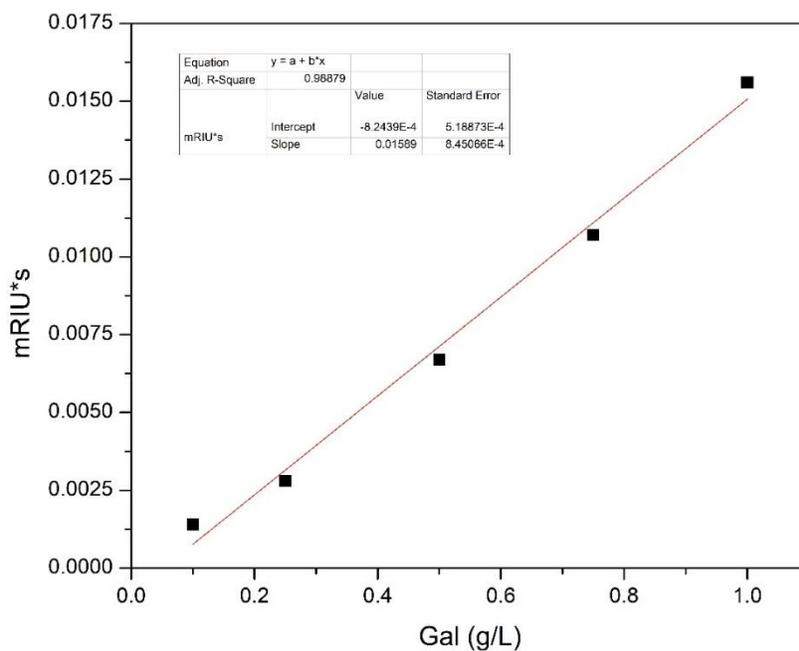
Anexo 9. Curva estándar de Xil

### Curva estándar de Ara en HPLC. Concentración de Ara vs área bajo la curva (mRIU\*s)



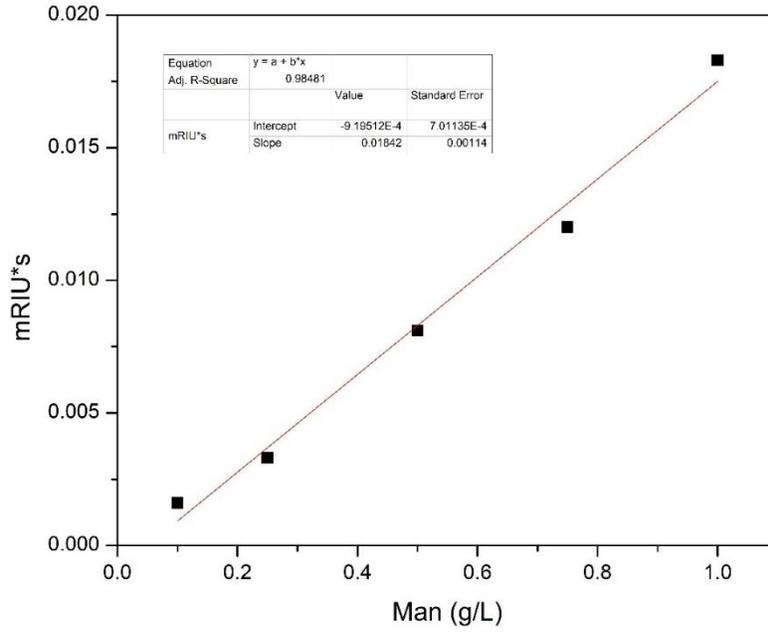
Anexo 10. Curva estándar de Ara.

### Curva estándar de Gal en HPLC. Concentración de Gal vs área bajo la curva (mRIU\*s)



Anexo 11. Curva estándar de Gal.

### Curva estándar de Man en HPLC. Concentración de Man vs área bajo la curva (mRIU\*s)



Anexo 12. Curva estándar de Man.