

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**DIGESTIÓN ANAERÓBICA DE DESECHOS AGRÍCOLAS POR CONSORCIOS
MICROBIANOS PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS**

Elaborado por: Univ. RICARDO ENRIQUE GRADOS TORREZ

Área: BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

**TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
BIOQUÍMICA**

**LA PAZ – BOLIVIA
2008**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**DIGESTIÓN ANAERÓBICA DE DESECHOS AGRÍCOLAS POR CONSORCIOS
MICROBIANOS PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS**

Elaborado por: Univ. RICARDO ENRIQUE GRADOS TORREZ

**Asesores: MARÍA TERESA ALVAREZ ALIAGA Ph.D.
ALBERTO GIMENEZ TURBA Ph.D.**

Área: BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

**TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
BIOQUÍMICA**

**LA PAZ – BOLIVIA
2008**

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

ABREVIACIONES

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Introducción

1.2 Antecedentes

1.3 Justificación

CAPITULO 2

EL PROBLEMA AMBIENTAL CAUSADO POR LA CONTAMINACIÓN CON PLÁSTICOS NO DEGRADABLES Y LA CONTAMINACIÓN DEBIDA A DESECHOS AGRÍCOLAS.

2.1 El plástico derivado del petróleo .

2.2 El plástico polímero recalcitrante .

2.3 Contaminación debida a los desechos agrícolas .

CAPITULO 3

POLIHIDROXIALCANOATOS: UNA ALTERNATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE PLÁSTICO BIODEGRADABLE.

3.1 Clasificación de los plásticos biodegradables .

3.2 Polihidroxicanoatos (PHAs) .

3.3 Metabolismo de la producción de PHAs por cultivos mixtos .

3.3.1 Sistema MAP/MAG .

3.3.2 Ciclos de inanición .

3.4 Rutas metabólicas para la síntesis de PHAs .

3.5 Genes involucrados en la síntesis de PHAs .

3.6 Biodegradabilidad, propiedades y aplicaciones prácticas de los PHAs.

CAPITULO 4

DIGESTIÓN ANAERÓBICA COMO MÉTODO DE TRATAMIENTO DE RESIDUOS AGRÍCOLAS.

4.1 Digestión anaeróbica.

4.1.1 Hidrólisis.

4.1.2 Acidogénesis.

4.1.3 Acetogénesis.

4.1.4 Metanogénesis.

4.2 Desechos agrícolas.

4.2.1 Composición de los desechos agrícolas.

4.2.1.1 Celulosa.

4.2.1.2 Xilano.

4.2.1.3 Lignina.

CAPITULO 5

OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

5.2 Objetivos específicos.

CAPITULO 6

DISEÑO EXPERIMENTAL.

6.1 Material y métodos.

6.1.1 Material biológico.

6.1.1.1 Consorcios microbianos.

6.1.1.2 Activación de los consorcios.

6.1.1.3 Selección de consorcio productor de ácidos grasos volátiles.

6.1.1.4 Diseño factorial.

6.1.1.5 Cultivo Batch.

6.1.1.6 Selección de microorganismos capaces de producir PHAs.

6.1.1.7 Producción de AGVs.

6.1.1.8 Producción de PHAs.

6.1.1.9 Extracción de PHAs.

6.1.1.10 Preparación de la muestra para barrido espectral .

6.1.2 Determinaciones analíticas.

6.1.2.1 Determinación de AGVs totales.

6.1.2.2 Determinación de la demanda química de oxígeno

6.1.2.3 Determinación de la actividad enzimática

6.1.2.4 Determinación de AGVs individuales por cromatografía
de gases.

6.1.2.5 Tinción de PHAs.

6.1.2.6 Espectro de absorción.

6.2 Esquema general del procedimiento seguido en el trabajo de
investigación.

CAPITULO 7

RESULTADOS.

7.1 Selección de consorcios productores de AGVs .

7.2 Optimización de las condiciones de cultivo (Diseño Factorial).

7.3 Demanda química de oxígeno.

7.4 Actividad enzimática.

7.5 AGVs individuales.

7.6 Tinción de los PHAs.

7.7 Barrido espectral.

CAPITULO 8

DISCUSIÓN.

CAPITULO 9

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

AGRADECIMIENTOS

REFERENCIAS

ANEXOS

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura general de los polihidroxicanoatos.	14
Figura 2.	Metabolismo de la producción de PHA en sistemas MAP/MAG .	17
Figura 3.	Rutas de producción de PHA en condiciones de inanición .	18
Figura 4.	Rutas metabólicas para la síntesis de PHAs en <i>R. eutropha</i> .	19
Figura 5.	Genes involucrados en la síntesis de PHAs .	21
Figura 6.	Etapas de la digestión anaeróbica de desechos orgánicos .	24
Figura 7.	Ruta metabólica general de degradación de la glucosa por bacterias acidogénicas.	26
Figura 8.	Complejo multienzimático de unión producido por microorganismos celulolíticos.	30
Figura 9.	Producción de AGVs totales por los consorcios TACANA, ISA y OSCAR utilizando diferentes desechos agrícolas .	43
Figura 10.	Producción de AGVs por el consorcio TACANA a partir de la hidrólisis anaeróbica de la paja de cebada a distintas concentraciones (5,7,9%p/v). a) 37°C b) 8-22°C (Amb) c) 4°C.	44
Figura 11.	Producción de AGVs por el consorcio TACANA a partir de la hidrólisis anaeróbica de la paja de alfa a distintas concentraciones (5,7,9%). a) 37°C b) 8-22°C (Amb) c) 4°C.	45
Figura 12.	Producción de AGVs por el consorcio TACANA a partir de la hidrólisis anaeróbica de la paja de SOYA a distintas concentraciones (5,7,9%). a) 37°C b) 8-22°C (Amb) c) 4°C.	46
Figura 13.	a) Influencia de la temperatura y la concentración de sustrato en la producción de AGVs por el consorcio TACANA a partir de la digestión anaeróbica de la paja de cebada. b) Incremento en la producción de AGVs totales por el consorcio TACANA en un periodo de 35 días.	48
Figura 14.	a) Influencia de la temperatura y la concentración de sustrato en 48 los valores de COD durante la digestión anaeróbica de la paja de cebada por el consorcio TACANA. b) Incremento en la DQO por el consorcio TACANA en un periodo de 30 días de incubación.	49
Figura 15.	Actividad endo/exo celulolítica del la hidrólisis anaeróbica de la cebada al 9% (p/v) por el consorcio TACANA a 37°C.	50
Figura 16.	Actividad endo/exo xilanolítica de la hidrólisis anaeróbica de la cebada al 9% (p/v) por el consorcio TACANA a 37°C.	51

Figura 17.	Cromatograma de los AGVs individuales producidos en la digestión anaeróbica de de paja de cebada al 5% (p/v) por el consorcio TACANA.	52
Figura 18.	Cromatograma de los AGVs individuales producidos en la digestión anaeróbica de de paja de cebada al 9% (p/v) por el consorcio TACANA.	53
Figura 19.	Gránulos de PHAs presentes en el consorcio TACANA a) 100x b) 700x.	53
Figura 20.	a). Espectro de absorción de la solución estándar (ácido crotonico) b). Espectro de absorción de la muestra.	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Generación de residuos sólidos en las principales ciudades de Bolivia.	10
Tabla 2.	Composición de algunos materiales lignocelulósicos.	29
Tabla 3.	Categorización de las variables.	35
Tabla 4.	Diseño de los experimentos batch para la optimización de la hidrólisis en función de la relación de la concentración de sustrato y la temperatura.	35
Tabla 5.	Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la demanda química de oxígeno.	39
Tabla 6.	Procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática.	40

RESUMEN

El presente estudio forma parte del proyecto: "Biodiversidad Microbiana del programa UMSA-SAREC" con cooperación del departamento de Biotecnología de la Universidad de Lund Suecia y forma parte de las líneas de investigación propuestas dentro de este proyecto.

La producción de polihidroxicarboxilatos (plástico biodegradable) se constituye en un campo de estudio a través del establecimiento de biorreactores bajo distintas condiciones físicas y químicas de cultivo, sustratos y consorcios microbianos. El mismo tiene por objeto la producción de polihidroxicarboxilatos mediante un uso apropiado y aprovechable de los desechos agrícolas que se generan en cantidades considerables en distintas zonas geográficas de nuestro país.

En el presente trabajo se establecieron cultivos anaeróbicos discontinuos o Batch. El trabajo se realizó en dos etapas: En la primera etapa se evaluó la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) por los consorcios TACANA, ISA y OSCAR a partir de desechos agrícolas: cebada (*Hordeum vulgare*), quinua (*Chenopodium quinoa*), soya (*Glycine max*), avena (*Avena sativa*), trigo (*Triticum sativum*), alfa (*Medicago sativa*), cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), y basura orgánica vegetal, donde la mayor cantidad de AGVs (6.85 g/L) se obtuvo de la digestión anaeróbica de paja de cebada por el consorcio TACANA. Al optimizar las condiciones de cultivo, la producción de AGVs se incrementó en más de un 50% (10.62 g/L). El análisis cromatográfico reveló que los principales AGVs producidos en la digestión anaeróbica fueron: el ácido acético (0.0722 M) y el butírico (0.0621 M). La actividad enzimática de los cultivos en Batch mostró que la actividad exocelulolítica (1,661 UI/mL) y exoxilanolítica (0.491 UI/mL) fueron mayores con relación a las actividades endocelulolítica (0.517 UI/mL) y endoxilanolítica (0.042 UI/mL).

En la segunda etapa los consorcios fueron sometidos a periodos de inanición de 4, 8 y 12 horas, utilizando como fuente de carbono los AGVs producidos en la primera etapa. La tinción con Negro Sudán mostró que el consorcio TACANA presenta una mayor cantidad de microorganismos capaces de acumular PHAs. Finalmente se realizó la extracción de los PHAs con cloroformo y se comparó el espectro de absorción con un estándar comercial.

PALABRAS CLAVE: Polihidroxicarboxilatos, digestión anaeróbica, ácidos grasos volátiles.

ABSTRACT

The present work has been performed in two steps: (1) the volatile fatty acids (VFAs) production by TACANA, ISA and OSCAR consortia from agricultural waste such as: barley (*Hordeum vulgare*), quinoa (*Chenopodium quinoa*), soybean (*Glycine max*), oats (*Avena sativa*), wheat (*Triticum sativum*), alfa (*Medicago sativa*) and rice husk (*Oryza sativa*), of these a highest concentration of VFAs (6.85g/L) was obtained from anaerobic digestion of barley straw with TACANA consortia, the optimization of the conditions gave an increasement of the VFAs production in more than a 60% (10.62 g/L), besides that the enzyme activity from batch cultures showed a clear increasement in the exocellulolitic activity (6.85g/L), this is related with the high VFAs production. (2) The consortia were subjected to 4, 8 and 12 hrs of feast/famine periods having VFAs as the only carbon source. This assay was performed trough a Sudan Black staining showing that TACANA consortia had the highest number of microorganisms able to accumulate PHAs.

In this way, the PHAs production from mixed cultures instead of using pure strains to its use in industrial scale.

KEY WORDS: Polyhydroxy alcanoates, anaerobic digestion, volatile fatty acids.

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
AGVs	Ácidos grasos volátiles
ASDI/SAREC	Agencia sueca para el desarrollo
ATP	Adenosin trifosfato
c	concentrado
c.s.p.	cantidad suficiente para
°C	grados centígrados
g	gramo
g/L	gramos por litro
h	horas
H ₂ O d	agua destilada
IIFB	Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.
L	litro
m	metro
M	molar
mg/L	miligramos por litro
min	minutos
mL	mililitro
mm	milimetro
N	normal
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
nm	nanómetros
p.a.	pro análisis
p/v	peso/volumen
rpm	revoluciones por minuto
Ton	tonelada
Ton/día	Tonelada/día
ug/mL	microgramos/mililitro
UI/mL	unidades internacionales/mililitro
uL	microlitro
um	micrómetros
umol/min	micro moles/minuto

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Introducción

El plástico es un polímero al que se le ha dado variados usos en la industria, la farmacéutica y el transporte entre otros, convirtiéndose en la base de la mayoría de los productos de consumo habituales, este polímero se produce mayormente a partir de productos petroquímicos, perdura en la naturaleza por largos periodos de tiempo, no es biodegradable y se acumula, produciendo grandes cantidades de sustancias tóxicas que afectan notablemente el medio ambiente (Wendlandt *et al.*; 2005).

El plástico biodegradable surgió como alternativa a esta problemática medioambiental y en contraste con el plástico convencional, este se puede producir a partir de fuentes renovables de energía y puede ser biodegradado produciendo agua y dióxido de carbono. Existe una gran variedad de plásticos biodegradables: los plásticos naturales como el almidón y la celulosa, los plásticos producidos por micro organismos como los polihidroxialcanoatos (PHAs) y los plásticos sintéticos como los polilactatos (PLAs), ambos por sus altas tasas de biodegradabilidad y sus excelentes propiedades físico - mecánicas han resultado ser los de mayor aplicación en la actualidad (Braunegg *et al.*, 1998).

Los ácidos grasos volátiles producidos como metabolitos secundarios en la digestión anaeróbica de desechos agrícolas, son los sustratos preferidos para la producción de PHAs, ya que muchos microorganismos tienen la capacidad de transformar los ácidos grasos volátiles (AGVs) en PHAs, estos forman gránulos en el citoplasma bacteriano, actuando como reserva de carbono y pueden ser extraídos para la producción de plástico biodegradable. Por otro lado la composición de estos AGVs puede influenciar en la producción de PHAs alterando las propiedades físicas y mecánicas del producto final (Bengtsson *et al.*; 2008).

La producción de PHAs por cultivos mixtos es favorable económicamente debido a que las condiciones de esterilización y manipuleo son más simples que con un cultivo puro. Además que en los cultivos mixtos existe un gran número de microorganismos diferentes, en los cuales el producto metabólico de unos puede servir de sustrato para

otros y de esta manera hacen que el proceso global sea más eficiente (Sanchez *et al.*, 1994).

El presente trabajo se realizó dos etapas: la primera etapa fue la selección de consorcios hidrolíticos con la capacidad de producir la mayor cantidad de AGVs a partir de diferentes sustratos orgánicos provenientes de los desechos agroindustriales como la cebada (*Hordeum vulgare*), quinua (*Chenopodium quinoa*), soya (*Glycine max*), avena (*Avena sativa*), trigo (*Triticum sativum*), alfa (*Medicago sativa*), cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) y basura orgánica vegetal. La segunda etapa fue la utilización de los AGVs obtenidos, para la producción de PHAs por diferentes cultivos mixtos.

1.2 Antecedentes

Los PHAs son almacenados en forma de gránulos por las bacterias. La observación de los gránulos como cuerpos refractarios en células bacterianas bajo el microscopio data del año 1988. La primera determinación de la composición de los PHAs tuvo que esperar hasta 1927 con el trabajo de Lemoigne (1927).

Durante los siguientes treinta años, el interés en los P(3HB) fue escaso y casi restringido a la descripción de la detección, a los métodos de estimación del contenido celular y las condiciones de cultivo que dirigen su síntesis y degradación dentro de las células del *Bacillus*. Una propuesta convincente para el rol funcional del P(3HB) vino primero de Macrae y Wilkinson en 1958, quienes observaron que el *B. megaterium* almacenaba el homopolímero rápido especialmente cuando las fuentes de nitrógeno y glucosa en el medio estaban altas, y la subsecuente degradación por el *B. cereus* y *B. megaterium* ocurría rápidamente en la ausencia de carbono exógeno y fuente de energía. Ellos concluyeron que el P(3HB) era un material de reserva de carbono y energía (Lenz, 1995).

En los siguientes quince años se vio una intensa investigación sobre los desarrollos importantes de las características y el tema en el conocimiento acerca de los polímeros ampliamente distribuidos en los microorganismos diferentes al *Bacillus* incluyendo a las bacterias del género *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Cyanobacterium* y muchos otros.

El campo de los PHAs fue así bien desarrollado a los finales de 1973, pero el interés de los biopolímeros se mantuvo casi únicamente en su significancia fisiológica como

sustancias microbiológicas. Se consideró poco el posible uso de estos como materiales (Braunegg *et al.*, 1998).

1.3 Justificación

La industria en Bolivia es la causante, en parte, de la contaminación de los ríos, la generación de residuos sólidos y peligrosos y de la contaminación atmosférica. Al igual que en muchos países en desarrollo la industria se encuentra ubicada en los principales centros urbanos del país (La Paz, Cochabamba, Santa Cruz y El Alto) siendo estos los más afectados (Benavides 1994). De acuerdo a una estimación propia el volumen de residuos generado por día se habría incrementado en 193 % entre 1993 y 2004 (Tabla 1), solamente como efecto del crecimiento poblacional.

Tabla 1. Generación de residuos sólidos en las principales ciudades de Bolivia.

Ciudad	Residuos sólidos 1993 (Ton/día)	Residuos sólidos 2004 (Ton/día)
La Paz	333	751
El Alto	210	479
Oruro	77	180
Potosí	45	155
Cochabamba	170	429
Sucre	83	190
Tarija	63	271
Santa Cruz	550	1982
Trinidad Y Cobija	31	210
TOTAL	1562	4647

Fuente: 1993: Asociación Boliviana de Entidades de Aseo Municipal (1993). 2004 Estimación propia en base a tasa de crecimiento poblacional.

El impacto ambiental de los residuos sólidos incluye impactos sobre la salud, visuales y de malos olores. Los impactos sobre la salud son los más importantes y están relacionados al tiempo de exposición y naturaleza de los residuos.

Los residuos se clasifican en dos grandes categorías: orgánicos (residuos de alimentos, heces fecales) e inorgánicos (plásticos, vidrios, metales, áridos). Los problemas del sistema de recolección, transporte y ubicación de basura en muchas zonas de las ciudades de Bolivia, particularmente en El Alto, prolongan el tiempo de exposición a esta. Además, aunque la mayoría de los residuos que se genera son orgánicos, existen zonas industriales que generan residuos inorgánicos que introducen un riesgo adicional a la salud, que en algunos casos sólo son perceptibles en el largo plazo (Escóbar y Muñoz, 1997).

Los principales cultivos en las regiones indígenas y de las zonas agrícolas en Bolivia generan variedades de residuos agrícolas, como los derivados de cereales (arroz, cebada, maíz, quinua, sorgo, trigo), frutas (banano/plátano, durazno, mandarina, naranja), hortalizas (arveja, haba), industriales (algodón, caña de azúcar, girasol, maní, soya), tubérculos (papa, yuca), los cuales constituyen una fuente óptima de nutrición para ciertos microorganismos implicados en el proceso de la digestión anaeróbica (Chambi *et al.*, 2007). Debido a que las regiones agrícolas (rurales) de nuestro país están siendo contaminadas por sus subproductos y que en las áreas urbanas existe contaminación ambiental por la acumulación de desechos recalcitrantes, se considera importante la aplicación de la tecnología del plástico biodegradable.

Por todas estas razones mencionadas, se hace necesario sustituir los plásticos sintéticos convencionales presentes en los residuos sólidos que permanecen por largos periodos de tiempo en el medio ambiente, por plásticos biodegradables, sobre todo para el uso en los envases no recuperables, para este propósito se utilizan fuentes renovables de energía como los residuos agrícolas que forman parte de los residuos orgánicos producidos en la actividad agroindustrial de nuestro país y que constituyen la opción de suministro más prometedora, porque no solo son baratos sino que su conversión a plástico biodegradable resuelve otros problemas medioambientales convirtiendo estos desechos en productos útiles.

**EL PROBLEMA AMBIENTAL CAUSADO POR LA CONTAMINACIÓN CON
PLÁSTICOS NO DEGRADABLES Y LA CONTAMINACIÓN DEBIDA A
DESECHOS AGRÍCOLAS.**

2.1 El plástico derivado del petróleo

Los plásticos son materiales sintéticos obtenidos mediante fenómenos de polimerización o multiplicación artificial de los átomos de carbono en las largas cadenas moleculares de compuestos orgánicos derivados del petróleo y otras sustancias naturales. El polietileno sintético, obtenido del craqueo de petróleo que, tratado posteriormente, permite obtener diferentes monómeros como el cloruro de polivinilo y el poliestireno que son tradicionalmente utilizados en la fabricación de plásticos. Los plásticos petroquímicos no degradables se acumulan en el medio ambiente en una proporción de 25 millones de toneladas por año (Lee et al, 1991).

Debido a que los plásticos son polímeros sintéticos, sus estructuras pueden ser químicamente manipuladas para obtener un amplio rango de durezas y formas. Tienen pesos moleculares que varían desde 50.000 a 1000000 Da, pueden ser fácilmente moldeados dentro de cualquier forma deseada incluyendo fibras y películas delgadas y tienen una alta resistencia química (Reddy et al., 2003).

Las siguientes son características de la mayoría de los plásticos,

- Tienen un bajo costo en el mercado.
- Tienen una baja densidad.
- Existen materiales plásticos permeables e impermeables.
- Son aislantes eléctricos.
- Son aislantes térmicos, aunque la mayoría no resisten temperaturas muy elevadas.
- Su quema es muy contaminante.
- Son resistentes a la corrosión y a la intemperie.
- Resisten muchos factores químicos (Hocking et al., 1997)

En la actualidad los plásticos derivados del petróleo se han convertido en uno de los materiales más usados y aplicados, debido a su versatilidad, sus propiedades físicas y químicas y bajo costo, principalmente en el uso como material de embalaje

aumentando el problema relacionado con los desechos sólidos. En respuesta a la problemática y a los efectos perjudiciales de los desechos plásticos sobre el medio ambiente, hay un considerable interés en el desarrollo de plásticos biodegradables (Panda *et al.*, 2006).

2.2 El plástico polímero recalcitrante

Lo que hace a los plásticos indeseables es la dificultad en su desecho, siendo estos xenobióticos y recalcitrantes a la degradación microbiana. El excesivo tamaño molecular parece ser el principal responsable para la resistencia de estos químicos a la biodegradación y su persistencia en el suelo por largo tiempo. En años recientes, ha habido un incremento en la preocupación pública sobre los efectos perjudiciales de los materiales plásticos derivados del petróleo en el medio ambiente. (Salehizadeh *et al.*, 2004)

El 40 % de los 75 billones de libras de plástico producido cada año es desechado sobre los vertederos. Varios cientos de miles de toneladas de plásticos son desechados sobre los medios ambientales marinos cada año y acumulados en las regiones oceánicas. La incineración ha sido una opción en el tratamiento de los plásticos no degradables, pero este procedimiento es a la vez peligroso y caro. Químicos nocivos como el cloruro de hidrógeno y cianuro de hidrógeno son liberados durante la incineración. El reciclaje también presenta desventajas, como la dificultad en la clasificación de la amplia variedad de plásticos y los cambios que se producen en el plástico después del reciclaje que limita su futura aplicación (Braunegg *et al.*, 1998).

La sustitución de este plástico por el plástico biodegradable es de interés, tanto por los consumidores, como por las industrias. Haciendo productos que no contaminen el medio ambiente, estos bioplásticos pueden ayudarnos a superar el problema de la contaminación causada por los plásticos no biodegradables. De esta manera es importante mejorar los métodos de producción, selección de materiales de desecho, reciclaje, conversión de ciertos desechos en formas adecuadas, para no añadir ningún material de desecho al medio ambiente que la naturaleza no pueda procesar (Reddy *et al.*, 2003).

2.3 Contaminación debida a los desechos agrícolas

Cada año se genera toneladas de residuos agrícolas, y solo un pequeño porcentaje es usado como forraje o en la producción de energía (biogás, bioetanol). Existe una gran cantidad de residuos con potencial interés industrial y energético, que localmente pueden tener alguna utilidad, pero cuya eliminación constituye un problema en las labores de explotación agrícola (Quispe *et al.*, 2005) afectando el medio ambiente en todas las regiones del mundo (Diorio *et al.*, 2003), especialmente en aquellas regiones con alta actividad en agricultura.

POLIHIDROXIALCANOATOS: UNA ALTERNATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE PLÁSTICO BIODEGRADABLE.

3.1 Clasificación de los plásticos biodegradables

Los tres tipos de plásticos biodegradables conocidos son: Plásticos fotodegradables, semibiodegradables y biodegradables. Los plásticos fotodegradables tienen grupos sensibles a la luz incorporados directamente en la matriz del polímero como aditivos. La radiación ultravioleta extensiva (de varias semanas a meses) puede desintegrar la estructura polimérica dejando la estructura abierta para la degradación bacteriana en una segunda etapa. Sin embargo en los lugares donde no llega la luz este polímero se mantiene en su estado no degradable (Flechter, 1993)

En los plásticos semibiodegradables están los plásticos ligados al almidón, donde el almidón es incorporado para mantener juntos los fragmentos cortos de polietileno. La idea de los plásticos ligados al almidón es que una vez descartado el plástico, las bacterias presentes en el suelo pueden atacar el almidón y liberar los fragmentos poliméricos que pueden ser degradados por otras bacterias. Las bacterias atacan el almidón pero son incapaces de utilizar los fragmentos de polietileno, los cuales por tanto se mantienen como desechos no degradables (Reddy *et al.*, 2003).

El tercer tipo de plástico biodegradable es el más prometedor por la utilización de bacterias para formar un biopolímero. En este grupo se incluyen los PHAs, los polilactatos (PLA), poliésteres alifáticos, polisacáridos, copolímeros, etc. (Lemos *et al.*, 2006)

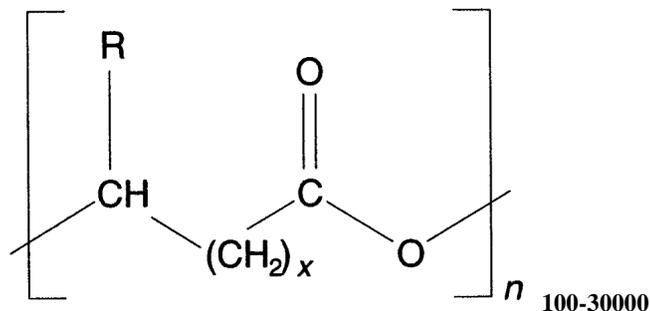
3.2 Polihidroxicanoatos (PHAs)

Los polihidroxicanoatos son homo o heteropolímeros de varios hidroxicanoatos sintetizados y almacenados intracelularmente como gránulos, cuando hay un componente esencial limitante del crecimiento como el nitrógeno, fosfatos, sulfuros, oxígeno o magnesio en presencia de exceso de fuente de carbono, por numerosas células procariontas, (bacterias Gram positivas y Gram negativas) de al menos 75 diferentes géneros (Salehizadeh *et al.*, 2004). Estos polímeros son acumulados intracelularmente hasta niveles que alcanzan el 90% del peso celular seco bajo

condiciones de estrés nutricional y actúan como reserva de carbono y energía (Madison *et al.*, 1999)

Los PHAs pueden ser producidos a partir de fuentes renovables a través de procesos de fermentación en condiciones particulares de cultivo y pueden ser extraídos por un número de métodos físicos y químicos a partir de la biomasa productora. Los PHAs tienen propiedades similares al polietileno, así, combinado con el hecho de que son rápida y totalmente biodegradados bajo las condiciones apropiadas, se ha generado un alto interés en ellos como sustituyentes de los polímeros derivados del petróleo (Braunegg *et al.*, 1998).

Desde que el Polihidroxiobutirato (PHB) fue el primero en encontrarse en 1926, más de 100 diferentes unidades monoméricas han sido identificadas como constituyentes de los PHAs almacenados (Figura 1), en más de 300 diferentes microorganismos (Ojumu *et al.*, 2004). Esta variabilidad depende del sustrato provisto y crea una gran posibilidad para producir diferentes tipos de polímeros biodegradables con un amplio rango de propiedades. El peso molecular de los PHAs está en el rango de 50000 a 1000000 Da y varía según el productor de PHA. Las unidades monoméricas están todas en la configuración D (-) debido a la estereoespecificidad de las enzimas biosintéticas (Reddy *et al.*, 2003).



X=1	R=hidrogeno	poly(-3-hidroxiopropionato)
	Metil	poly(-3-hidroxiobutirato)
	Etil	poly(-3-hidroxi valerato)
	Popil	poly(-3-hidroxi hexanoato)
	Pentil	poly(-3-hidroxi octanoato)
	Nonil	poly(-3-hidroxi dodecanoato)
X=2	R=Hidrógeno	poly(-4-hidroxi butirato)
X=3	R=Hidrógeno	poly(-5-hidroxi valerato)

Figura 1. Estructura general de los polihidroxi alcanoatos (Braunegg *et al.*, 1998, Ojumu *et al.*, 2004).

El PHB y otros PHAs producidos por bacterias tienen un peso molecular lo suficientemente alto para tener características poliméricas que son similares al plástico convencional como el polietileno (PE) y polipropileno (PP) (Salehizadeh *et al.*, 2004). Copolímeros del PHB pueden ser formados por co-alimentación y puede resultar en la formación de polímeros conteniendo monómeros de 3-hidroxicaproato (3HV) o 4-hidroxibutirato (4HB). La incorporación de 3HV dentro del PHB resulta en un poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxicaproato) P (3HB-3HV) que es menos rígido y más quebradizo que el P(3HB) (Eggink *et al.*, 1995), además que es un material menos permeable al oxígeno que el polietileno y polipropileno convirtiéndolo en un mejor material para el embalaje de comida porque se reduciría la necesidad de añadir antioxidantes (Salehizadeh *et al.*, 2004).

El amplio uso de los PHAs es principalmente limitado por su alto costo de producción comparado con los plásticos derivados del petróleo. Con el propósito de comercialización de los PHAs, un substancial esfuerzo ha sido dedicado para reducir los costos de producción a través del desarrollo de cepas bacterianas y procesos de fermentación y acumulación más eficientes. El principal costo en la producción de PHAs es el costo del sustrato utilizado (Kleerebezem *et al.*, 2007).

3.3 Metabolismo de la producción de PHAs por cultivos mixtos

La idea de la producción de PHAs usando cultivos mixtos surgió del reconocimiento del rol de los PHAs como intermediarios metabólicos en procesos microbianos para el tratamiento de desechos. El tratamiento de desechos biológicos usualmente ocurre bajo condiciones dinámicas (Lemos *et al.*, 2006).

El lodo activado, un cultivo mixto muy conocido, es capaz de almacenar PHAs como carbono y material de reserva energética bajo condiciones no fijas alcanzadas desde un régimen de alimentación intermitente y variación en la presencia de un aceptor de electrones. Los microorganismos experimentan los cambios en las condiciones y en la disponibilidad de nutrientes y pueden adaptarse continuamente a los cambios del sustrato (Salehizadeh *et al.*, 2004).

Los microorganismos que son capaces de almacenar rápidamente el sustrato disponible y consumir lo almacenado para realizar un crecimiento más balanceado

tienen una fuerte ventaja competitiva sobre los microorganismos sin la capacidad de almacenar el sustrato (Lemos *et al.*, 2006).

3.3.1 Sistema MAP/MAG

Hay dos tipos de microorganismos capaces de almacenar la fuente de carbono en cultivos mixtos bajo condiciones anaeróbicas: 1) Los microorganismos acumuladores de polifosfato (MAP) y 2) Los microorganismos acumuladores de glucógeno (MAG).

Los MAPs son los más reconocidos por producir y almacenar polímeros (PHA, glucógeno y polifosfatos). La ventaja competitiva total de estos microorganismos se basa en su capacidad de utilizar la energía almacenada como polifosfato para almacenar sustratos exógenos en la forma de PHA cuando no hay un aceptor electrónico (oxígeno o nitrato) disponible para la generación de energía (Madison *et al.*, 1999).

Los MAGs fueron reconocidos recientemente como competidores de los MAPs; además estos microorganismos cuentan con sustratos que pueden ser fermentados (glucosa), y almacenan los productos de la fermentación en su interior. Estos microorganismos pueden utilizar también el glucógeno interno almacenado para su fermentación y la producción de PHB. La energía liberada en el proceso de la glucólisis es subsecuentemente usada para la acumulación de productos de la fermentación (acetato) en la forma de PHB. MAPs y MAGs proliferan en sistemas donde el sustrato está presente regularmente mientras un aceptor electrónico este ausente (Reddy *et al.*, 2003).

Ambos grupos de microorganismos pueden asimilar el acetato (como un sustrato modelo para estudios metabólicos) y activarlo a acetil-CoA. La acetil-CoA es luego consumida por la síntesis de PHB por la condensación a acetoacetil-CoA, la reducción a hidroxibutiril-CoA y finalmente la polimerización a PHB (figura 2). (Salehizadeh *et al.*, 2004).

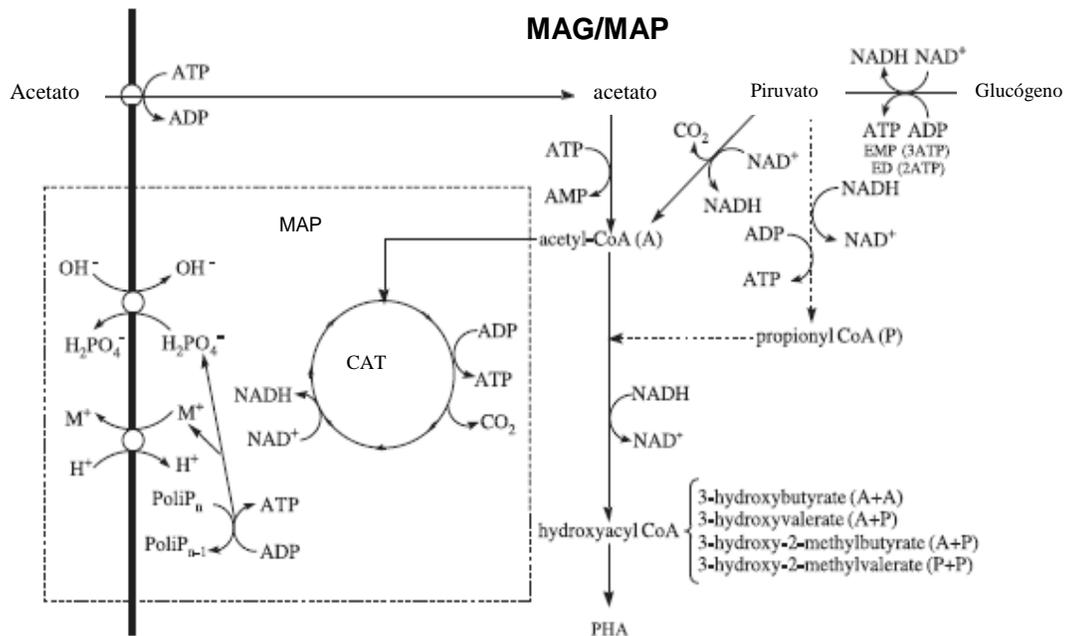


Figura 2. Metabolismo de la producción de PHA en sistemas MAP/MAG (Salehizadeh et al., 2004)

El metabolismo anaeróbico de los MAPs es similar a los MAGs (glucólisis del glucógeno almacenado y conversión del sustrato a PHA a través de la acetil-CoA o propionil-CoA y la producción de propionil-CoA a través de la ruta propionato-succinato), a excepción de que el polifosfato no está involucrado. MAPs y MAGs usan la conversión de glucógeno a PHA para producir ATP y NADH. MAPs usan esta conversión principalmente para producir poder reductor, mientras que en MAGs, esta conversión es predominantemente usada para la producción de ATP. MAGs utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para la hidrólisis del glucógeno, mientras que MAPs usan la ruta de Entner-Doudoroff (ED) (Hesselmann et al., 2000).

3.3.2 Ciclos de inanición

Recientemente muchas investigaciones se han concentrado sobre la producción de PHAs por cultivos mixtos cuando están expuestos a suministros transitorios de carbono. La biomasa sometida a sucesivos periodos de disponibilidad y no disponibilidad de sustrato externo (periodo de hambre) experimenta lo que en la literatura es llamado un crecimiento desbalanceado (Serafim et al., 2004). Bajo condiciones dinámicas, el crecimiento de biomasa y el almacenamiento del polímero ocurren simultáneamente cuando hay un exceso de sustrato externo (Eiora et al., 2007). Cuando todo el sustrato externo es consumido, el polímero almacenado puede

ser usado como carbono y fuente de energía (Figura 3). En estos casos, los polímeros almacenados son formados bajo condiciones en las cuales el crecimiento no se ve limitado. El fenómeno de almacenamiento usualmente es dominante sobre el crecimiento, pero bajo condiciones en las cuales el sustrato está presente continuamente por un largo tiempo, da lugar a la adaptación fisiológica del microorganismo y el crecimiento se convierte en lo más importante. La habilidad para almacenar reservas internas otorga a estos microorganismos una ventaja competitiva sobre aquellos que no tienen esta habilidad frente a los transitorios suministros de sustrato (Lemos *et al.*, 2006). Entre los sistemas para la producción industrial de PHAs el enfoque de los ciclos de inanición es el más prometedor por la elevada acumulación de PHAs. Este enfoque promueve la conversión del sustrato en PHA y no a glucógeno u otros materiales intracelulares.

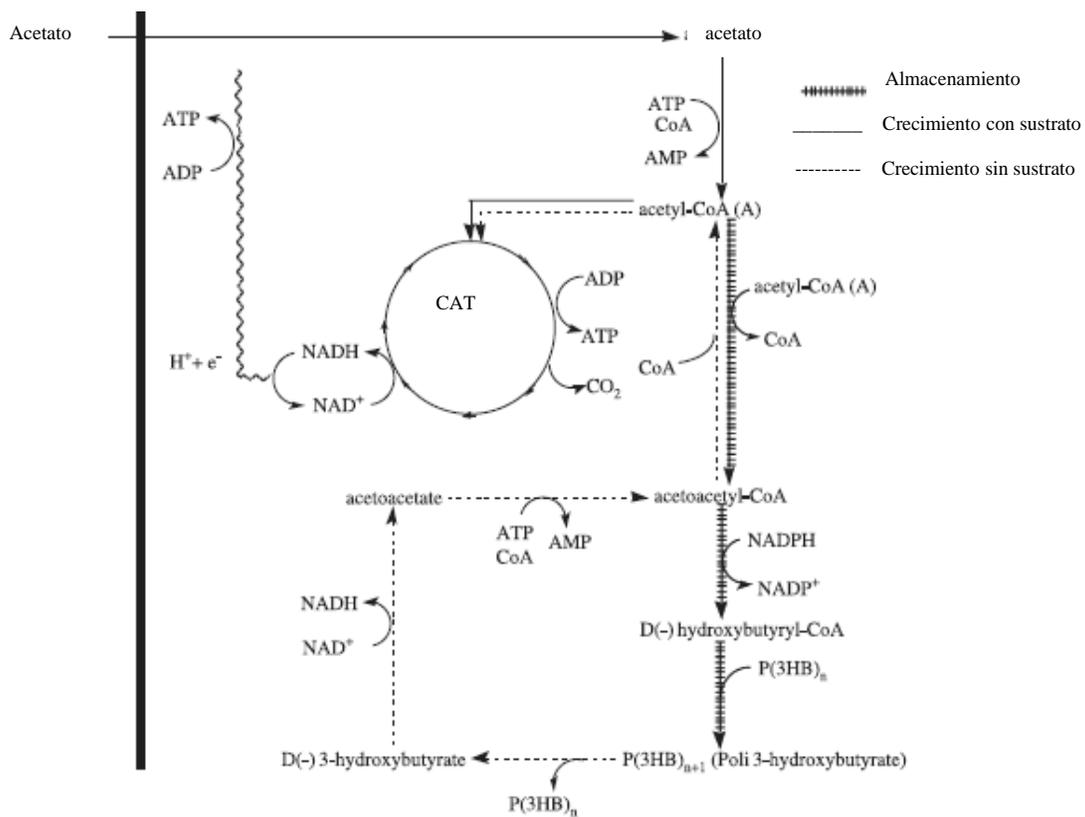


Figura 3. Rutas de producción de PHA en condiciones de inanición (Salehizadeh *et al.*, 2004).

3.4 Rutas metabólicas para la síntesis de PHAs en *R. eutropha*

Las rutas para la síntesis de PHAs en *R. eutropha* a partir de varios sustratos en condiciones libres de nitrógeno se muestran en la Figura 4.

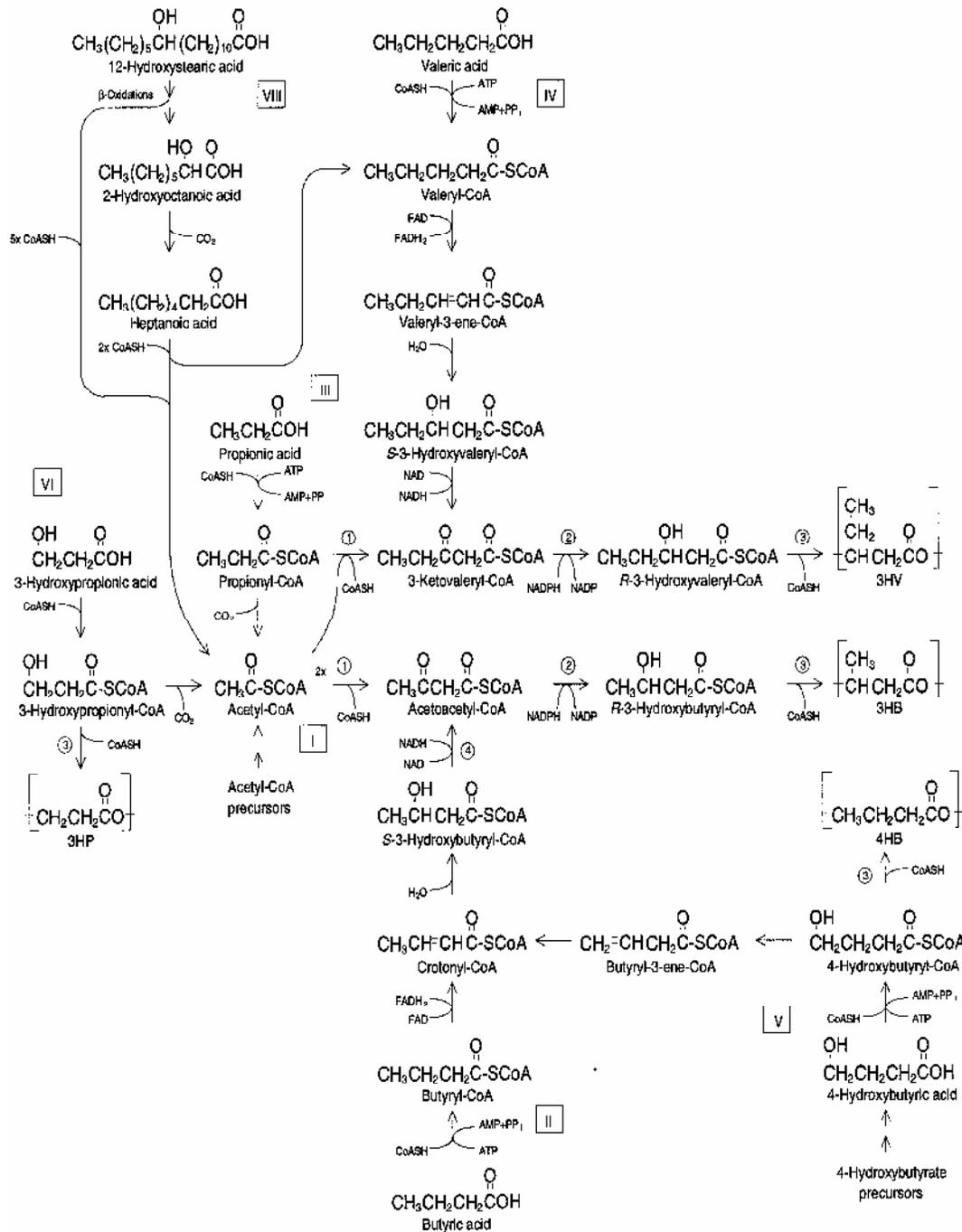


Figura 4. Rutas metabólicas para la síntesis de PHAs en *R. eutropha* (Braunegg *et al.*, 1998)

El P(3HB) es producido a partir de la acetil-CoA por la acción secuencial de tres enzimas, la 3-cetotiolasa, la acetoacetil-CoA reductasa y la PHA sintasa (Ruta I). La 3-cetotiolasa combina reversiblemente dos acetil-CoAs formando la acetoacetil-CoA y es completamente inhibida por las altas concentraciones de CoASH, el cual es liberado cuando la acetil-CoA ingresa al ciclo de Krebs. La acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH reduce su sustrato a R-3-hidroxiacil-CoA, y este es incorporado a la cadena polimérica por la PHA sintasa.

Las unidades del 3 hidroxibutirato (3HB) pueden también ser sintetizadas a partir del ácido butírico directamente a acetoacetil-CoA sin la previa degradación a acetil-CoA (Ruta II). Cuando el ácido propiónico está presente en el medio, la 3-cetotiolasa condensa un propionil-CoA con un acetil-CoA para formar el 3-cetovaleril-CoA, el cual es polimerizado después de su reducción a monómeros de 3-hidroxiacil-CoA por la PHA sintasa (Ruta III). El ácido valérico también puede servir como precursor de las unidades de 3-hidroxiacil-CoA (Ruta IV). Cuando el ácido valérico es la única fuente de carbono, *R. eutropha* sintetiza un copoliéster con un 90% de 3HV como monómeros.

En la figura también se observa la ruta de síntesis del 4-hidroxibutirato a partir del ácido 4-hidroxibutírico (Ruta V). Primero el 4-hidroxibutiril-CoA es formado, y parte de este es polimerizado por la PHA sintasa. Los sustratos que pueden ser convertidos al ácido 4-hidroxibutírico, como el B-butirolactona, 1,4-butanediol, 1,6-hexanediol, y el ácido 4-clorobutírico, también dirigen la formación de monómeros de 4HB.

Se ha propuesto una ruta para la síntesis de 3-hidroxiisovalerato en *R. eutropha* (Ruta VI), cuando el ácido 3HP está presente como única fuente de carbono en un medio libre de nitrógeno, su metabolismo a través del 3-hidroxiisovaleril-CoA es en gran medida por la descarboxilación a acetil-CoA y la síntesis de 3HB. Pero una proporción de el 3-hidroxiisovaleril-CoA es directamente polimerizado a 3HP, presumiblemente bajo la acción de la PHA sintasa, produciendo un copoliéster al azar de unidades de 3HB Y 3HP. Se notó que *R. eutropha* puede crecer en un medio con ácido 3HP, y por tanto la conversión a acetil-CoA es probablemente el paso favorecido y solo bajas cantidades de 3HP en el poliéster son observados en estos microorganismos cuando el ácido 3HP es la única fuente de carbono (Braunegg *et al.*, 1998).

3.5 Genes involucrados en la síntesis de PHAs

La ruta biosintética de P(3HB) consiste en tres reacciones enzimáticas catalizadas por tres diferentes enzimas. La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar la acetoacetil-CoA por la β -cetoacilCoA tiasa (codificada por *phaA*). La segunda reacción es la reducción de la acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxiacetil-CoA por una acetoacetil-CoA deshidrogenasa dependiente de NADPH (codificada por *phaB*). Finalmente los monómeros de (R)-3-hidroxiacetil-CoA son polimerizados formando PHB por la P(3HB) polimerasa, codificada por *phaC* (Reddy *et al.*, 2003). (Figura 5).

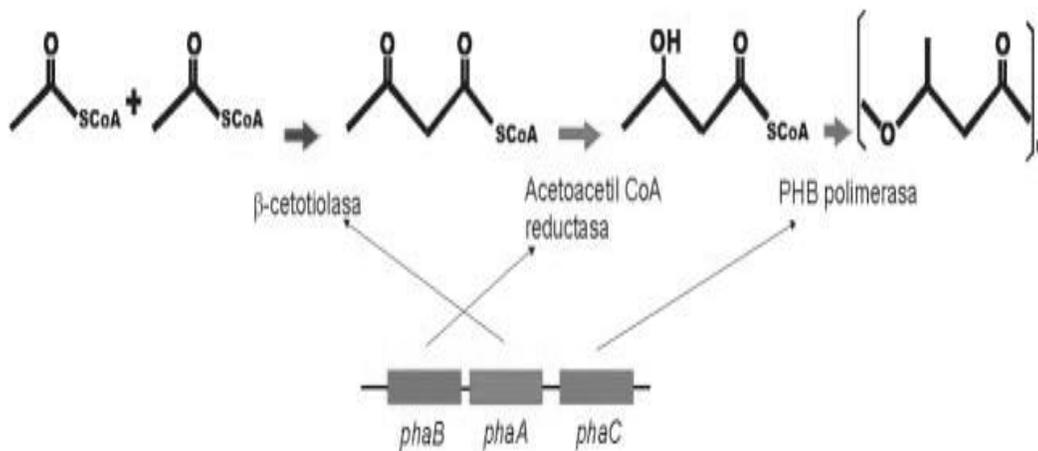


Figura 5. Genes involucrados en la síntesis de PHAs (Reddy *et al.*, 2003)

3.6 Biodegradabilidad, propiedades y aplicaciones prácticas de los PHAs.

Los PHAs no son tóxicos, son biocompatibles, termoplásticos biodegradables que pueden ser producidos a partir de fuentes renovables. Estos tienen un alto porcentaje de polimerización, son altamente cristalinos, óptimamente activos, con una estereoquímica regular e insolubles en agua. Estas características los hacen altamente competitivos con los plásticos derivados del petróleo (Hocking *et al.*, 1997).

La biodegradación de los PHAs es dependiente de un número de factores como la actividad microbiana del medio ambiente y el área de superficie expuesta, humedad, temperatura, pH, peso molecular, la composición del polímero y su cristalinidad también pueden influir, la naturaleza de las unidades monoméricas también puede afectar la degradación se ha visto que los copolímeros que contienen unidades

monoméricas de PHB son degradados más rápidamente que los copolímeros que tienen unidades monoméricas de 3HB-co-3HV. Los microorganismos secretan enzimas que rompen el polímero en sus unidades moleculares llamados hidroxiacidos, los cuales son utilizados como una fuente de carbono para el crecimiento. La principal enzima para la degradación del PHB y sus oligómeros es la PHB depolimerasa. Estudios sobre PHB depolimerasa extracelular de *Alcaligenes faecalis* han indicado que es una hidrolasa de tipo endo. La biodegradación de PHAs bajo condiciones aeróbicas da como resultado la formación de dióxido de carbono y agua, mientras que en condiciones anaeróbicas los productos de degradación son dióxido de carbono y metano (Kleerebezem *et al.*, 2007).

DIGESTIÓN ANAERÓBICA COMO MÉTODO DE TRATAMIENTO DE RESIDUOS AGRÍCOLAS.

4.1 Digestión anaeróbica.

La digestión anaeróbica es un proceso biológico degradativo en ausencia de oxígeno, el cual parte de un substrato orgánico produciendo una mezcla de gases (principalmente metano y dióxido de carbono) y un residuo acuoso o sedimento que contiene los componentes digeridos y los difíciles de digerir (Quispe *et al.*, 2005).

Durante la digestión anaeróbica, las moléculas orgánicas complejas presentes en los desechos agrícolas (polisacáridos, celulosa, hemicelulosa, lignina, xilano, etc) se descomponen en moléculas más pequeñas para dar como productos finales metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2), este proceso consta de cuatro etapas (Figura 6), en cada una de las etapas un conjunto de reacciones bioquímicas son llevadas a cabo por una compleja población de microorganismos, y cada una de las cuales cataliza solo un cierto número de estas reacciones (Baier *et al.*, 1997)

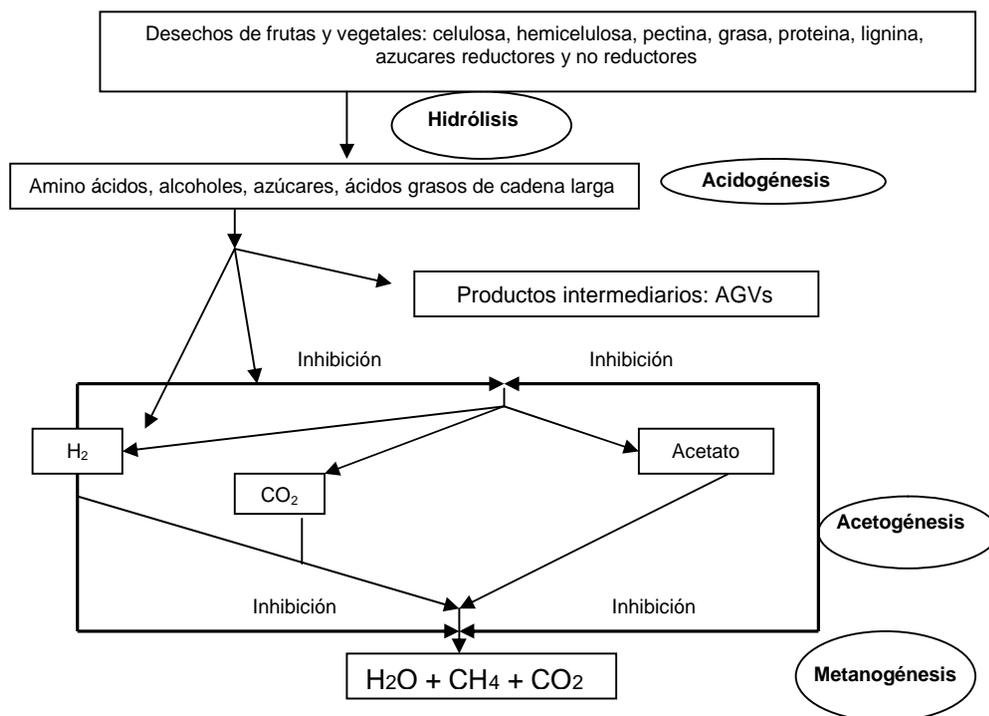


Figura 6. Etapas de la digestión anaeróbica de desechos orgánicos (Bouallagui *et al.*, 2005).

La mayoría de los microorganismos degradan determinados compuestos orgánicos a fin de obtener energía para su crecimiento y utilizan compuestos carbonados específicos para sintetizar sus componentes celulares. Los productos finales de un grupo de microorganismos suelen ser el alimento del grupo siguiente, de forma que a lo largo del proceso existe un delicado balance que es necesario mantener para que la reacción se desarrolle correctamente (Sanchez *et al.*, 1994).

4.1.1 Hidrólisis

El proceso se inicia con la hidrólisis de la materia orgánica compleja catalizada por enzimas extracelulares, como las celulasas, amilasas, lipasas, proteasas, xilanasas, etc., que transforman la materia orgánica insoluble, de alto peso molecular y que no puede ser utilizada directamente por los microorganismos, como los lípidos, polisacáridos, proteínas, grasas, ácidos nucleicos, etc., en materiales solubles, de bajo peso molecular y que puedan atravesar la membrana celular, como los monosacáridos, aminoácidos y otros componentes orgánicos simples, que son adecuados para el uso por las células como fuente de energía y carbono. Este paso es llevado a cabo principalmente por bacterias anaeróbicas estrictas como los bacteroides y clostridios, y bacterias facultativas como las del género *Streptococci* (Yadvika *et al.*, 2004).

La etapa hidrolítica puede ser la etapa limitante de la velocidad del proceso global, sobre todo tratándose de residuos con alto contenido en sólidos, incluso en casos donde las fases acidogénicas o metanogénicas son consideradas como pasos limitantes, la hidrólisis puede afectar el conjunto del proceso (Mata -Alvarez *et al.*, 2000).

Los principales componentes de la materia orgánica, sobre todo en desechos agrícolas, son los materiales lignocelulósicos, compuestos principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa. La lignina es un material altamente refractario a la degradación anaeróbica, afectando también a la biodegradabilidad de la celulosa, de la hemicelulosa y de otros polímeros. Los principales productos de la hidrólisis de la celulosa son la celobiosa y la glucosa, mientras que la hemicelulosa produce pentosas, hexosas y ácidos urónicos (Wang *et al.*, 1999).

4.1.2 Acidogénesis

Otro grupo de microorganismos fermentan los productos de la hidrólisis, produciendo ácido acético, hidrógeno, dióxido de carbono y otras moléculas de bajo peso molecular, los ácidos orgánicos volátiles simples como el ácido propiónico y el ácido butírico, los cuales pueden ser convertidos a ácido acético (Jain *et al.*, 1998).

El principal producto de la hidrólisis de los desechos agrícolas, es la glucosa, la cual puede seguir diferentes rutas metabólicas, en función del microorganismo responsable formándose diferentes productos finales. La ruta metabólica más empleada es la ruta de Embden-Meyerhof (Figura 7), en el cual, el piruvato se desdobra a Acetil-CoA y CO₂, la Acetil-CoA se reduce en los productos de fermentación empleando como transportador de electrones el NADH derivado de las reacciones glucolíticas de esta ruta (Voet, 2000).

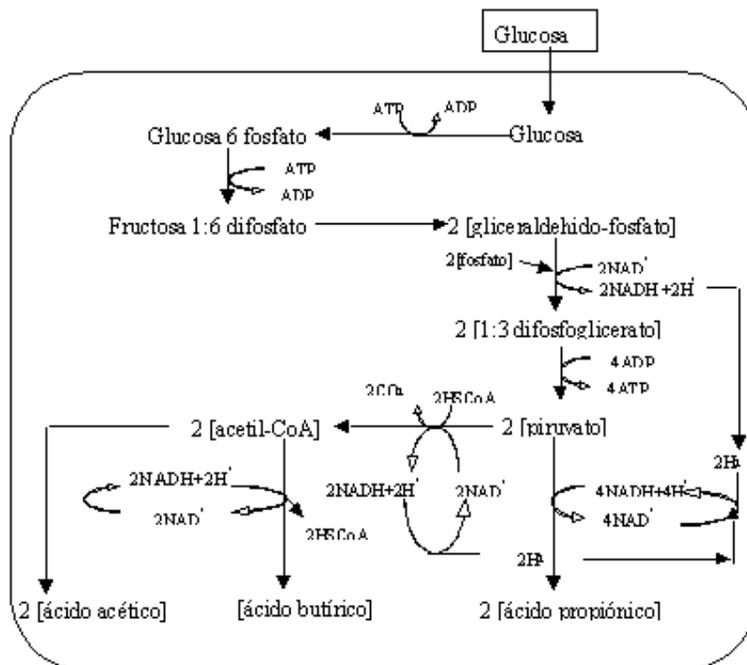


Figura 7. Ruta metabólica general de degradación de la glucosa por bacterias acidogénicas (web.udl.es/usuarios/r5213847/acidog.html)

4.1.3 Acetogénesis

Mientras que algunos de los productos de la fermentación pueden ser metabolizados directamente por los organismos metanogénicos (H₂ y acetato), otros (valerato,

butirato, propionato, algunos aminoácidos, etc.) necesitan ser transformados en productos más sencillos, acetato e hidrógeno, a través de las bacterias acetogénicas, como la *Syntrophomona wolfei* y *Syntrophobacter wolini* (Yadvika *et al.*, 2004).

4.1.4 Metanogénesis

En esta última etapa, las bacterias metanogénicas, transforman los productos de la acetogénesis en metano. Existen dos tipos de microorganismos metanogénicos, las utilizadoras de acetato como la *Methanosarcina spp.* y *Methanotherix spp.* que transforman el acetato en metano, y las utilizadoras de hidrógeno y formiato como el *Methanobacterium* y el *Methanococcus*, que transforman el hidrógeno y formiato en metano (Geeta *et al.*, 1994).

4.2 Desechos agrícolas.

4.2.1 Composición de los desechos agrícolas.

Dependiendo de su naturaleza los desechos agrícolas presentarán cantidades variables en el contenido de celulosa, xilano y lignina (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de algunos materiales lignocelulósicos (en g/kg de materia seca) (Graminha *et al.*, 2008)

Cultivos	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Referencia
MAIZ				
Paja	335	249	78	Cruz (1992)
Tallo	336	237	87	Cruz (1992)
Hoja	245	273	54	Cruz (1992)
Salvado	338	393	49	Cruz (1992)
FIBRA DE COCO	360 - 430	15 - 25	410 - 450	Reddy and Yang (2005)
PAJA DE TRIGO	330 - 380	260 - 320	170 - 190	Reddy and Yang (2005)
	400	260	200	Tabka <i>et al.</i> (2006)
	270	210	98	Prates (1995)
AFRECHO DE TRIGO	300	500	150	Couto and Sanromán (2005)
SALVADO DE ARROZ	350	250	170	Couto and Sanromán (2005)
PAJA DE ARROZ	280 - 360	230 - 280	120 - 140	Reddy and Yang (2005)
	320 - 470	190 - 270	50 - 240	Karimi <i>et al.</i> (2006)
	352	221	43	Prates (1995)
SALVADO DE CEBADA	230	320	214	Cruz <i>et al.</i> (2000)
PAJA DE CEBADA	310 - 450	270 - 380	140 - 190	Reddy and Yang (2005)
	316	254	110	Prates (1995)
SALVADO DE AVENA	493	250	180	Couto and Sanromán (2005)
PAJA DE AVENA	300	220	85	Prates (1995)
SEMILLA DE UVA	71	311	435	Couto and Sanromán (2005)
PLANTAS CONIFERAS	400	300	200 - 300	Mandre <i>et al.</i> (2006)
FORRAJES				
<i>Andropogon gayanus</i>	415	308	90	Reis <i>et al.</i> (1990)
<i>Brachiaria decumbens</i>	395	311	81	Reis <i>et al.</i> (1990)
<i>Hiparrhenia rufa</i>	402	275	90	Reis <i>et al.</i> (1990)
<i>Brachiaria brizantha</i>	412	308	75	Reis <i>et al.</i> (1995)

4.2.1.1 Celulosa

La celulosa es el polisacárido más abundante, constituye la fracción insoluble y el principal hidrato de carbono sintetizado por las plantas. Es un polímero de glucosa lineal unido por enlaces glucosídicos (1-4) (Béguin & Aubert, 1994). La longitud de las cadenas varía entre 100 y 14 000 residuos (Hongpattarakere *et al.*, 2002).

Las propiedades fisicoquímicas de la celulosa son: grado de polimerización, cristalinidad y porosidad (Chávez *et al.*, 2006). En las plantas superiores, la celulosa aparece en forma de microfibrillas en las paredes primarias y secundarias lo cual es el resultado de la formación de la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas (Béguin & Aubert, 1994).

En la naturaleza la mayoría de la celulosa es degradada aeróbicamente, solo entre un 5-10% se degrada de forma anaeróbica (Galler & Winter, 2005). Su hidrólisis enzimática requiere de tres enzimas extracelulares: endoglucanasas, exoglucanasas (celobiohidrolasa y exoglucohidrolasa) y B-glucosidasas (Alvarez & Terrazas, 2002).

La endoglucanasa actúa al azar y produce oligosacáridos con cadenas de longitud variable. La celobiohidrolasa ataca a los polímeros de extremo no reductor. Los disacáridos formados son finalmente hidrolizados a glucosa por la B-glucosidasa (Hongpattarakere *et al.*, 2002).

4.2.1.2 Xilano

El xilano es un heteroglicano ramificado con un esqueleto de residuos de xilanopiranosos unido por enlaces β , es insoluble en agua, soluble en solución alcalina, hidrolizado con facilidad y de carácter estereoquímico levógiro (González *et al.*, 2004)

El xilano es el principal constituyente de la hemicelulosa de las paredes celulares de las plantas (Sung-Taik & Lee, 1997) y el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza (Hongpattarakere *et al.*, 2002), junto a la celulosa forman más del 50% de la biomasa total de las plantas (Sá Pereira *et al.*, 2003). Es abundante en residuos agrícolas, como los tallos de maíz, vainas y pajas de cereales, pudiendo representar de 15-30% de los residuos.

La degradación completa del xilano requiere la acción de varias enzimas. Las xilanasas o O-glucósido hidrolasas, son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos entre dos o más carbohidratos. Las endo β -1,4-xilanasas, β -1,4-xilosidasas, y las exoxilanasas son enzimas capaces del rompimiento de cadena de los principales grupos glicosilo (Sá Pereira, *et al.*, 2003).

4.2.1.3 Lignina

Después de la celulosa el polímero más abundante en el mundo vegetal es la lignina, y su función es la protección contra la humedad y los agentes atmosféricos, además de actuar como agente aglomerante de las fibras (Voet, 2000).

La lignina puede ser degradada por microorganismos, aunque en una tasa muy baja. Los mohos han demostrado ser los más eficientes debido a que producen las

principales enzimas involucradas en la degradación de la celulosa, así como fenol oxidasas que oxidan los monómeros de fenil propano de la lignina (Enfors & Haggström, 2000).

Para la degradación microbiana de los desechos celulósicos y xilanósicos, los microorganismos se adhieren a la superficie de las paredes celulares de las plantas, esta asociación forma un complejo molecular que facilita la adherencia. Este mecanismo de unión se llama celulosoma y consiste en un complejo multienzimático producido por muchos microorganismos celulolíticos. Los celulosomas asociados a la superficie celular median la unión microbiana a los sustratos insolubles para la degradación de los mismos hasta productos solubles que luego son absorbidos por los microorganismos (Graminha *et al.*, 2008) (Figura 8).

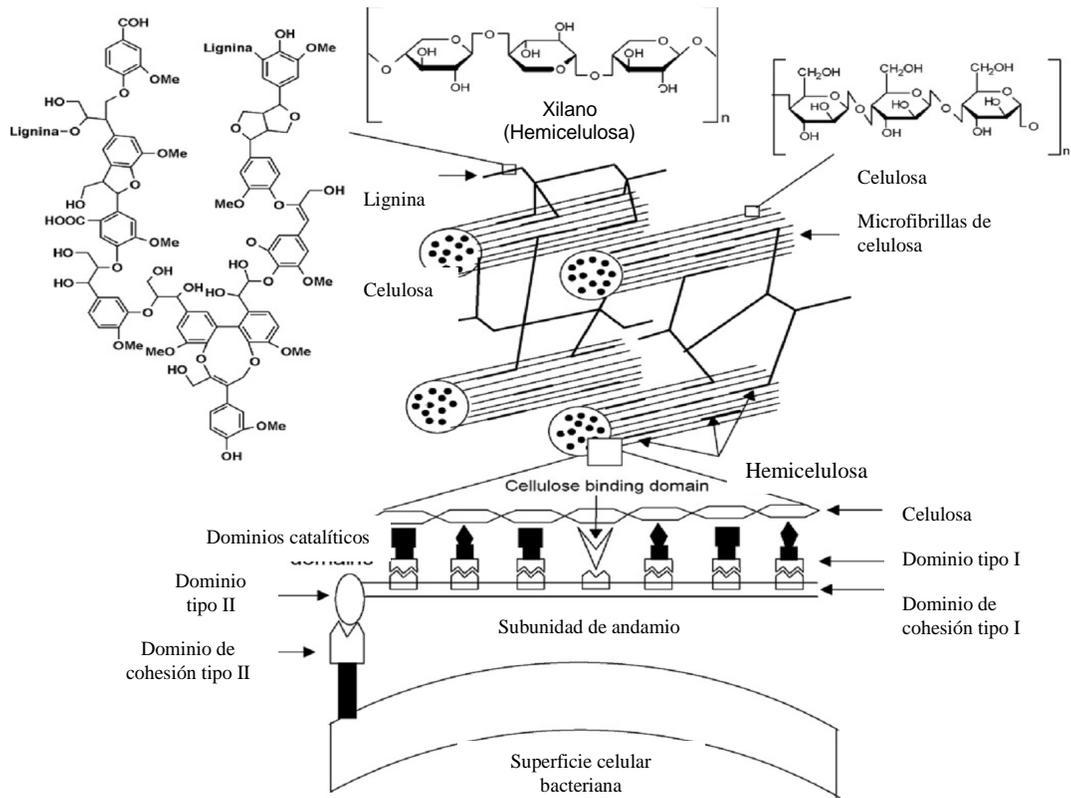


Figura 8. Complejo multienzimático de unión producido por microorganismos celulolíticos (Graminha *et al.*, 2008).

CAPITULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Optimizar la digestión anaeróbica de desechos agrícolas para la obtención de ácidos grasos volátiles y la utilización de estos en la producción de poli-hidroxicanoatos utilizando consorcios microbianos.

5.2 Objetivos específicos

- Comparar la producción de ácidos grasos volátiles en cultivos en batch a través de la digestión anaeróbica de diferentes sustratos celulósicos y xilanosicos: paja de cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), trigo (*Triticum sativum*), alfa (*Medicago sativa*), quinua (*Chenopodium quinoa*), soya (*Glycine max*), cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) y basura orgánica vegetal.
- Seleccionar el mejor sustrato y consorcio que tengan una producción óptima de ácidos grasos volátiles.
- Optimizar el medio y las condiciones para incrementar la producción de ácidos grasos volátiles.
- Determinar los tipos y la cantidad de ácidos grasos individuales producidos en la digestión anaeróbica.
- Seleccionar el consorcio que tenga microorganismos capaces de acumular poli-hidroxicanoatos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

6.1.1.1 Consorcios Microbianos

Los consorcios TACANA, ISA y OSCAR recolectados de Santa Rosa de Maravilla, Caranavi y Palos Blancos respectivamente, fueron estudiados anteriormente comprobándose su capacidad degradativa del material celulósico y xilanósico (Chambi *et al.*, 2007).

6.1.1.2 Activación de los consorcios

Los consorcios fueron activados en medio anaeróbico fluido (Scharlaw) (Ver composición Anexo 1) bajo condiciones de cultivo estacionarias (cultivo Batch) por un periodo de 7 días a 37 °C de temperatura.

6.1.1.3 Selección de consorcio productor de ácidos grasos volátiles

Botellas de 100 mL de capacidad se empacaron con 4 g de cada uno de los siguientes desechos agrícolas: paja de cebada, quinua, soya, avena, trigo, alfa y cascarilla de arroz, además de basura orgánica vegetal. Se agregó 80 mL de Medio basal 11 (Ver composición Anexo 2) saturado con nitrógeno. Las botellas fueron selladas con anillas metálicas para su posterior autoclavado. Se inoculó cada botella con 5 mL de cada uno de los consorcios. Las condiciones de cultivo fueron de 37 °C por 30 días monitoreando la producción de AGVs totales, por titulación (ver punto 6.1.2.1).

6.1.1.4 Diseño Factorial

Una vez seleccionado el consorcio y desecho agrícola con la mejor producción de AGVs totales se optimizaron las condiciones de cultivo tomando en cuenta dos variables cuantitativas continuas (temperatura y concentración de desecho agrícola) (Tabla 3).

Tabla 3. Categorización de las variables

NIVEL	VARIABLES	
	CONCENTRACIÓN SUSTRATO % (p/v)	TEMPERATURA (°C)
-1	5	4
0	7	Amb (8 – 22)*
+1	9	37

* La temperatura del ambiente del laboratorio tuvo estas fluctuaciones.

El diseño factorial en estas condiciones se indican en la Tabla 4.

$3^2 = 9$ experimentos (27 por triplicado).

Tabla 4. Diseño de los experimentos batch para la optimización de la hidrólisis en función de la relación de la concentración de sustrato y la temperatura.

Experimento	Concentración	
	Sustrato	Temperatura
1	-1	-1
2	0	-1
3	+1	-1
4	-1	0
5	0	0
6	+1	0
7	-1	+1
8	0	+1
9	+1	+1

6.1.1.5 Cultivo Batch

Con los datos obtenidos de la optimización se realizaron cultivos Batch usando matraces erlenmeyer de 1 L con 600 mL de Medio 11 nitrogenado y 54 g de cebada, después del autoclavado, se adicionó 40 mL de tioglicolato al 2.5 % como agente reductor y el pH fue regulado a 7.2 con NaOH 1N; se utilizaron tubos tygon autoclavados y todas la posibles entradas de aire fueron selladas con silicona para

asegurar las condiciones anaeróbicas (Anexo 3). La determinación de las actividades enzimáticas endo/exo celulolítica y endo/exo xilanolítica fue monitoreada diariamente durante 30 días.

6.1.1.6 Selección de microorganismos capaces de producir PHAs

Los consorcios TACANA, ISA y OSCAR fueron cultivados en Medio 11 con glucosa al 10 % a 37 °C previa nitrogenación y adición de tioglicolato al 2.5 % por un periodo de una semana hasta que los microorganismos entraron en fase estacionaria de crecimiento. Se realizaron ciclos de hambreado de 4, 8 y 12 horas (*Eiroa et al.*, 2007) por un periodo de 30 días, utilizando los AGVs producidos anteriormente, centrifugados a 3000 rpm por 10 min y filtrados (20 µm), de esta manera los microorganismos capaces de acumular PHAs sobrevivieron al periodo de inanición.

6.1.1.7 Producción de AGVs

Para el proceso de inanición se preparó un botellón con 2.5 L de Medio 11 nitrogenado y 225 g de paja de cebada, después del autoclavado se adicionó 51 mL de tioglicolato al 2.5 %, el pH fue regulado a 7.2 con NaOH 1 N, se utilizaron tubos autoclavados y se selló con silicona para evitar las posibles entradas de oxígeno y mantener el medio anaerobio, el volumen del inóculo (consorcio TACANA) fue de 255 mL. Este cultivo anaerobio se incubó a 37 °C por un periodo de 30 días, se tomó una muestra de 9 mL, se colocó en un vial de 10 mL el cual se selló con una anilla metálica y se incubó a 60 °C por un periodo de 24 h, la fase gaseosa fue analizada en un cromatógrafo de gases para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles presentes en la muestra (Ver Anexo 4).

6.1.1.8 Producción de PHAs

Se preparó otro botellón con 2.5 L de medio 11 nitrogenado mas glucosa, hasta alcanzar una concentración final de glucosa del 5%, después del autoclavado se adicionó 51 mL de tioglicolato al 2.5 %, el pH fue regulado a 7.2 con NaOH 1 N, se añadió 255 mL de inóculo (microorganismos acumuladores de PHAs seleccionadas en la anterior prueba). Se incubó a 37 °C por un periodo de 7 días.

Se realizaron los ciclos de inanición de 12 h, se adicionaron 300 mL de AGVs totales producidos anteriormente por cada ciclo, durante un periodo de 1 mes.

6.1.1.9 Extracción de PHAs

Luego del periodo de inanición los microorganismos productores de PHAs, fueron centrifugados 10 min a 3000 rpm, fueron lavados una vez con agua estéril, el pellet formado fue secado en una estufa a 60 °C, la extracción se realizó añadiendo cloroformo y calentado en un baño maría a temperatura de ebullición por un periodo de 1hr, la muestra fue filtrada en papel filtro No. OOH S1-80-40, del filtrado obtenido se dejó evaporar el cloroformo (Wendlandt *et al.*, 2005).

6.1.1.10 Preparación de la muestra para barrido espectral

Al PHA extraído se le añadió ácido sulfúrico concentrado para que reaccione por 20 min en un baño maría a temperatura de ebullición. Se enfrió a temperatura ambiente y se transfirió la solución ácida obtenida a una cubeta de cuarzo. Se realizó el barrido espectral (Cintra 5000) de absorción de 180 a 1100 nm de longitud de onda contra un blanco de ácido sulfúrico p.a. (Law *et al.*, 1960).

Para la solución patrón se disolvió 250 ug de PHB estándar en 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, se realizó el mismo procedimiento que se siguió para la muestra, en esta reacción se hidrolizó el PHB y se formó el ácido crotonico. Se realizó el barrido espectral, utilizando como blanco ácido sulfúrico p.a.,. (Law *et al.*, 1960, Panda *et al.*, 2005) (Ver Anexo 9)

6.1.2 DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

6.1.2.1 Determinación de AGVs totales

La cantidad de AGVs totales se determinó a través del método de titulación (Buc hauer *et al.*, 2001), este método se basa en la titulación de la muestra previamente centrifugada y filtrada (20 um) con ácido sulfúrico 0.1 N desde un pH de 5 a 4, el volumen gastado es proporcional a la cantidad de AGVs totales presentes en la muestra.

Los cálculos se realizaron según la siguiente fórmula:

$$Sa = (131340 \times N \times VA5-4,meas / VS) - 3.08 \times Alkmeas - 25$$

Donde:

Sa	=	Ácidos grasos Volátiles totales (mg/L, considerados como ácido acético)
N	=	Normalidad (mmol/L)
VA5-4	=	Volumen de ácido (mL) necesario para titular una muestra de pH 5 a 4.
Vs	=	Volumen de la muestra.
Alk	=	pH inicial de la muestra.

6.1.2.2 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Se entiende como la cantidad de materia orgánica soluble, susceptible a la hidrólisis enzimática. La demanda química de oxígeno determina la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica en una muestra, bajo condiciones específicas del agente oxidante, temperatura y tiempo. Este método se basa en que las sustancias orgánicas e inorgánicas oxidables presentes en la muestra, se oxidan mediante reflujo cerrado en solución fuertemente ácida ($H_2SO_4(c)$) con un exceso de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en presencia de sulfato de plata (Ag_2SO_4) que actúa como agente catalizador, y de sulfato mercurico ($HgSO_4$) adicionado para remover la interferencia de los cloruros. Después de la digestión, el remanente de $K_2Cr_2O_7$ sin reducir se titula con sulfato ferroso de amonio (FAS), usando como indicador de punto final el complejo ferroso de ortofenantrolina (ferroína). El volumen de FAS utilizado en la titulación es inversamente proporcional a la cantidad de materia orgánica oxidable presente en la muestra, calculado en términos de oxígeno equivalente.

Para determinar la DQO (Alvarez *et al.*,2005) a la muestra fue filtrada (20 μm), se realizó una dilución 1/200 con H_2O d, a 2.5 mL de esta dilución se añadió 1.5 mL de solución de digestión (SOLUCIÓN A) (4.913 g de $K_2Cr_2O_7$, 167 mL $H_2SO_4(c)$, 3.33 g de $HgSO_4$ y H_2O d csp 1000 mL) y 3.5 mL de $H_2SO_4(c)$ (SOLUCIÓN B), se incubó por 2 h a 150 °C en termobloque (Kleinfeld MBT 250), finalmente la titulación se realizó con

solución de sulfato de amonio ferroso usando ferroína como indicador de punto final.
Ver tabla 5.

Tabla 5. Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la demanda química de oxígeno (Alvarez, 2006).

	Muestra	Blanco digerido	Blanco no digerido
Muestra (mL)	2,5		2,5
Agua destilada (mL)		2,5	
Sol. Digestión (mL)	1,5	1,5	1,5
Rvo. H ₂ SO ₄ (mL)	3,5	3,5	3,5
Vol Total (mL)	7,5	7,5	7,5
Vortexear			
Realizar la digestión en el termobloque a 150 °C durante 2 h			
Enfriar a temperatura ambiente, añadir unas gotas de ferroína y titular con FAS.			
Observar el cambio de color azul verdoso a rojo marrón.			

Cálculos:

$$\text{COD mg O}_2/\text{L} = (\text{A}-\text{B}) \times \text{M} \times 8000 / \text{mL muestra}$$

Donde:

- A = mL de FAS gastados en la titulación del blanco digerido.
 B = mL de FAS gastados en la titulación de la muestra.
 8000 = meq peso de O₂ x 1000 mL/L
 M = Molaridad del FAS

$$\text{M} = (\text{VOL 1} / \text{VOL 2}) \times 0.1$$

Donde:

- VOL1 = Volumen de solución A utilizado.
 VOL2 = Volumen de FAS utilizado en la titulación del blanco no digerido.

6.1.2.3 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de las diferentes enzimas involucradas en la hidrólisis anaeróbica del material celulósico y xilanósico de los consorcios bacterianos se determinó por el método modificado del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Ver composición Anexo 5) según Miller (1959), Para este fin se establecieron curvas de calibración (Ver Anexo 6) usando como estándares la glucosa y xilosa en diluciones seriadas.

A 50 uL de la muestra centrifugada 10 min a 2500 rpm en una microcentrífuga Eppendorf AG y filtrada (20 um) se añadió a 450 uL de Carboximetil celulosa (CMC) 0.5 % , paranitrofenil glucopiranosido (PNPG) 0.5 %, xilano 0.2 % y paranitrofenil xilanopiranosido (PNPX) 0.2 % respectivamente, se incubó por 1 h a 50 °C, se añadió 750 uL de DNS, se llevó a un baño en ebullición por 5 min se añadió 50 uL de H₂O destilada y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA (Biotek ELx800). Ver Tabla 6.

Tabla 6. Procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática (Miller 1959).

	Blanco	Control	Test
Sustrato *	450 uL	450 uL	450 uL
Enzima**			50 uL
Incubar a 50 °C por 1 hr y añadir			
Enzima**	50 uL	50 uL	
Rvo. DNS	750 uL	750 uL	750 uL
Incubar a Temperatura de ebullición durante 5 min y añadir			
H₂O destilada	50 uL	50 uL	50 uL
Enfriar a temperatura ambiente			
Leer la absorbancia a 540 nm de longitud de onda			

- * **0.5 % CMC en Buffer citrato, pH 4.8, para endocelulasas**
- 0.5 % PNPG en Buffer citrato, pH 4.8, para exocelulasas**
- 0.2 % Xilano en Buffer fosfato, pH 6.8, para endoxilanasas**
- 0.2 % PNPX en Buffer fosfato, pH 6.8, para exoxilanasas**

- ** **Muestra procedente del bioreactor batch, filtrada en filtro de poro 20 um.**

Las actividades enzimáticas se determinaron restando la absorbancia del tubo control al test, interpolando este valor en la ecuación de la recta, proveniente de la curva de calibración (Ver Anexo 6)

$$\text{ABS real} = \text{ABS test} - \text{ABS control}$$

La actividad enzimática se midió en unidades internacionales por mililitro (UI/mL). Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 umol/min de azúcar reductor expresado como equivalentes de glucosa o xilosa.

6.1.2.4 Determinación de AGVs individuales por cromatografía de gases

La cantidad de AGVs individuales se determinó a través del método del headspace (Ábalos *et al.* 2000, Boe *et al.*, 2006, Ábalos & Bayona, 2000), en este método 9 mL de la muestra fue sellada en un vial de 10 mL e incubada a 60 °C por 24 h para que los AGVs pasen al estado gaseoso, luego 0.5 mL de la fase aérea fue inyectado en un cromatógrafo de gases Clarus 500 Perkin Elmer con un detector de ionización a llama. Para la separación de los AGVs una columna ELITE – 1 de 30 m x 0.25 mm e hidrógeno como gas carrier fue utilizado. Según la técnica descrita por Ábalos *et al.* 2008, la temperatura inicial del horno fue programada desde 70 °C por 3 min, luego 15 °C min⁻¹ hasta 200 °C manteniendo la temperatura final por 3 min. Las temperaturas del inyector y del detector de ionización a llama fueron programadas a 260 °C respectivamente.

Se determinaron los tiempos de retención de los diferentes AGVs utilizando soluciones estándar (Ver Anexo 7) y se compararon con los tiempos de retención de los picos obtenidos de la muestra.

Para determinar la concentración de AGVs individuales se realizaron curvas de calibración del ácido acético, propiónico, butírico y valérico, utilizando soluciones estándar y realizando diluciones seriadas de las mismas (Ver Anexo 8). Los valores de las áreas de los picos obtenidos de la muestra fueron interpolados utilizando las ecuaciones de las rectas, provenientes de las curvas de calibración de cada AGV.

6.1.2.5 Tinción de PHAs

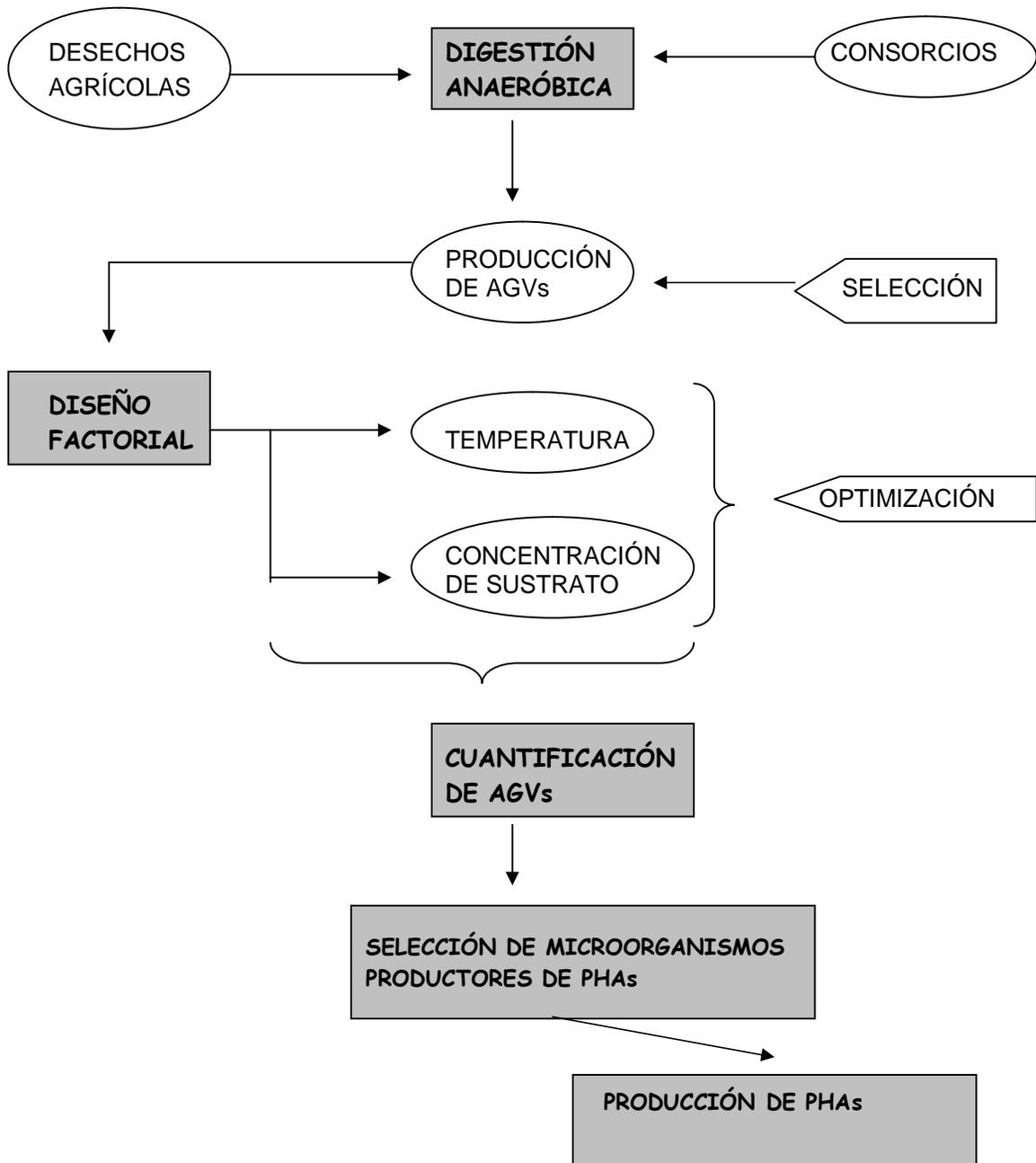
La tinción se realizó con Negro Sudan (Bengtsson *et al.*, 2007) para observar los gránulos intracitoplasmáticos de PHAs formados en los microorganismos después del periodo de inanición. Los microorganismos fueron fijados por calor al portaobjetos, la solución de tinción (3 g de Negro Sudan en 100 mL de etanol 70 %) se dejó actuar por 15 min, se decoloró con Xilol por 1 min, fucsina básica fue añadida como colorante de contraste por 1 min, se lavó y se observó al microscopio (Carl Zeiss Standard 25 ICS) con un aumento de 100 X.

6.1.2.6 Espectro de absorción

El espectro de absorción del PHB estándar fue comparado con el espectro obtenido de los PHAs extraídos de los microorganismos (Panda *et al.*, 2006). Ver Figura 20.

Posteriormente se realizaron diluciones de esta solución con el ácido crotonico formado obteniendo la curva de estandarización utilizando la longitud de onda de máxima absorción. (Ver Anexo 9).

6.2 ESQUEMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO SEGUIDO EN EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



RESULTADOS

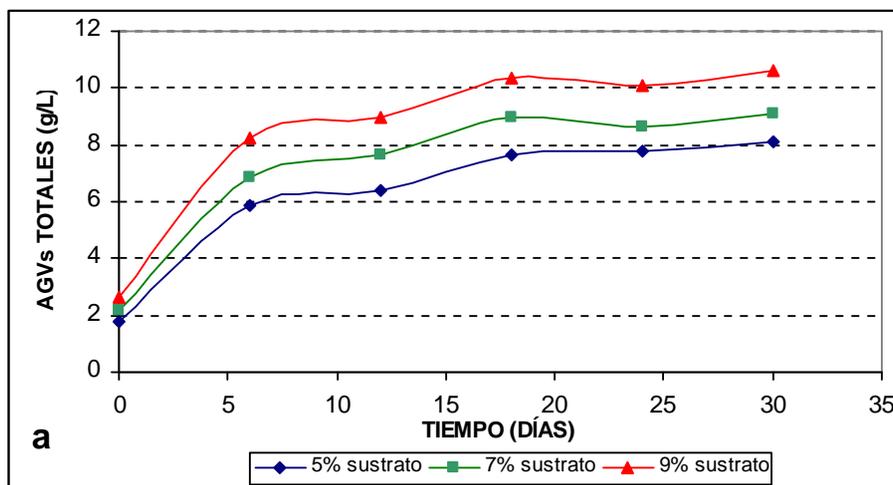
7.1 Selección de consorcios productores de AGVs

La producción de AGVs totales a partir de la hidrólisis de los desechos agrícolas: paja de cebada, quinua, soya, avena, trigo, alfa y cascarilla de arroz, además de basura orgánica vegetal con los consorcios TACANA, ISA y OSCAR se observa en la Figura 9.

7.2 Optimización de las condiciones de cultivo (Diseño Factorial)

Según los resultados preliminares, fueron seleccionados los siguientes desechos agrícolas: paja de cebada, soya y alfa digeridos con el consorcio TACANA, debido a que presentaron los valores más altos en producción de AGVs totales: 6.85 g/L, 6.2 g/L y 6.5 g/L respectivamente. (Figura 9 a, d y g)

Se utilizaron estos tres desechos agrícolas para la optimización tomando en cuenta la temperatura y la concentración de desecho agrícola (sustrato). Ver Figuras 10, 11 y 12.



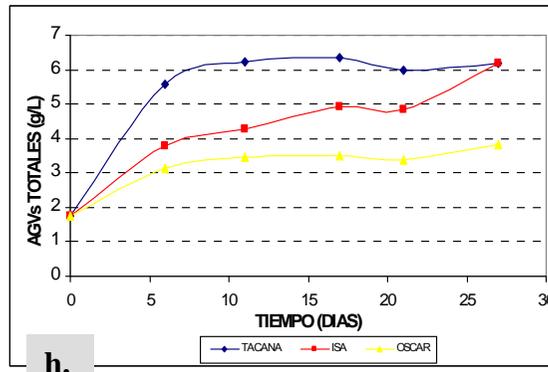
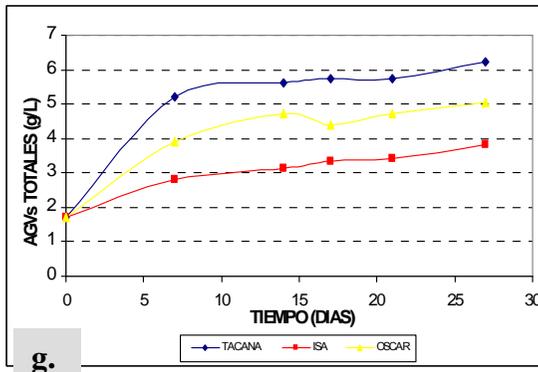
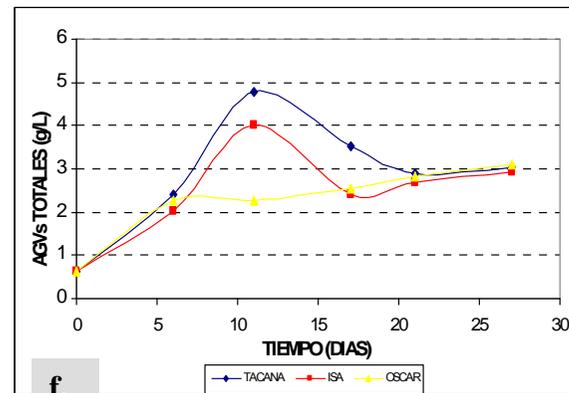
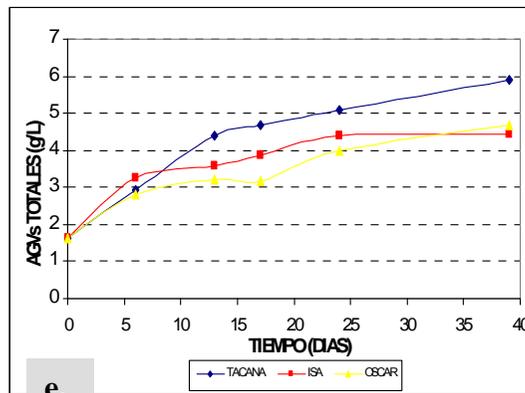
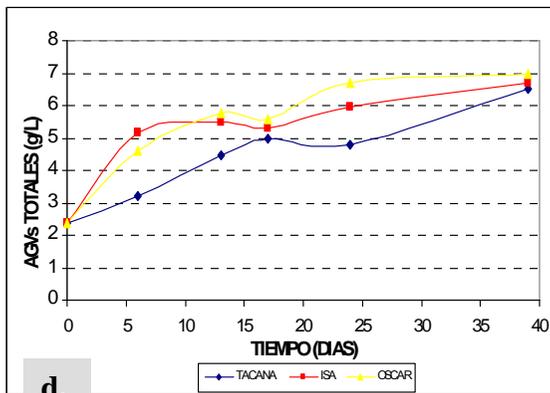
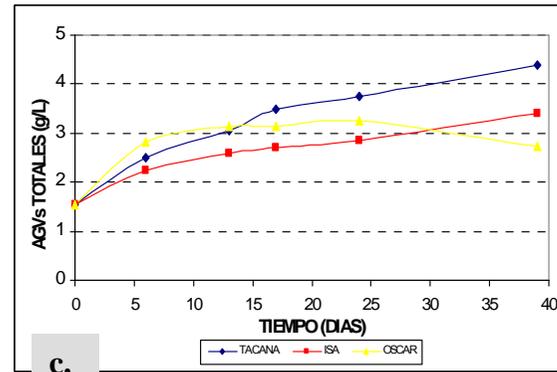
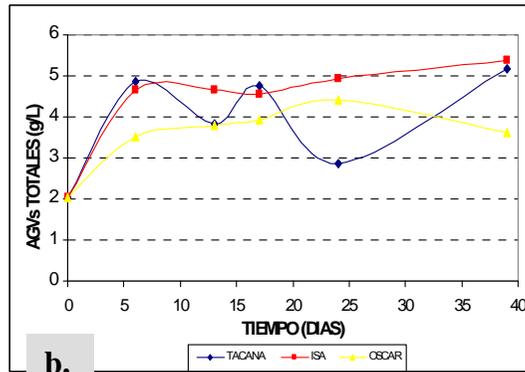
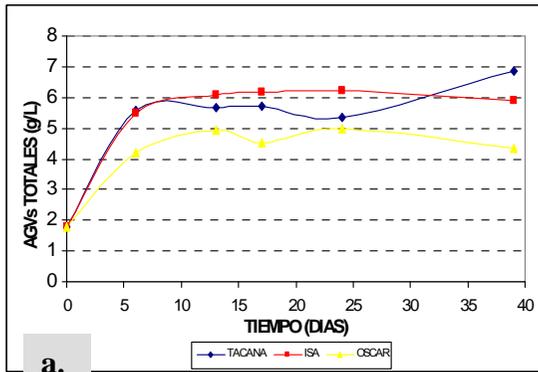


Figura 9. Producción de AGVs totales por los consorcios TACANA, ISA y OSCAR utilizando diferentes desechos agrícolas: pajas de a)Cebada b)Avena c)Trigo d)Alfa e)Quinoa f)Cascarilla de arroz g)Soya h)Basura orgánica vegetal.

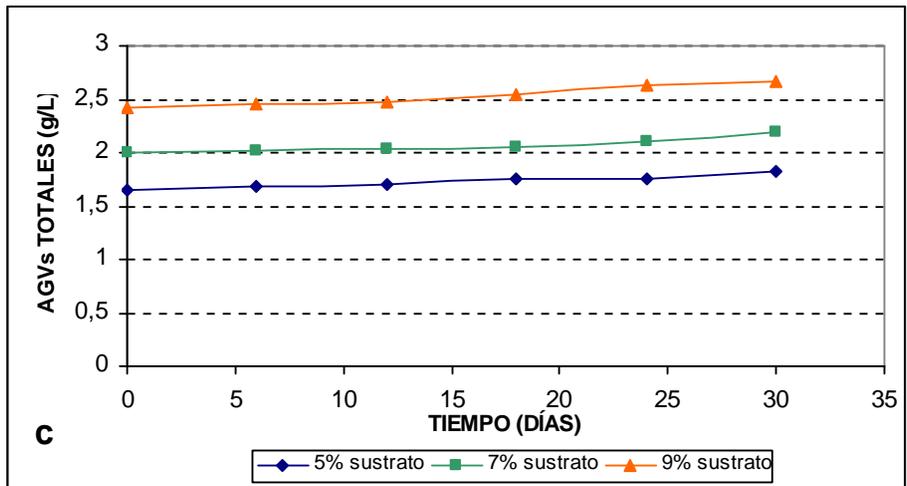
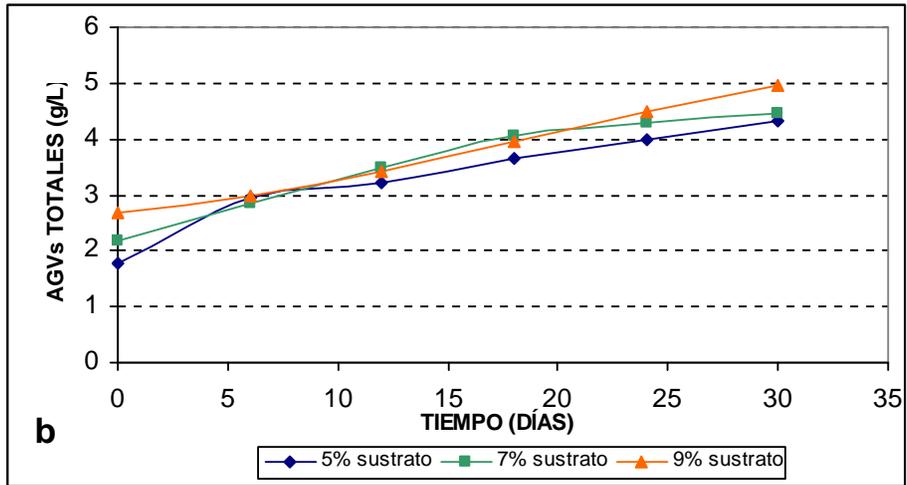


Figura 10. Producción de AGVs por el consorcio TACANA a partir de la hidrólisis anaeróbica de la paja de CEBADA a distintas concentraciones (5,7,9% p/v). a) 37°C b) 8-22°C (Amb) c) 4°C

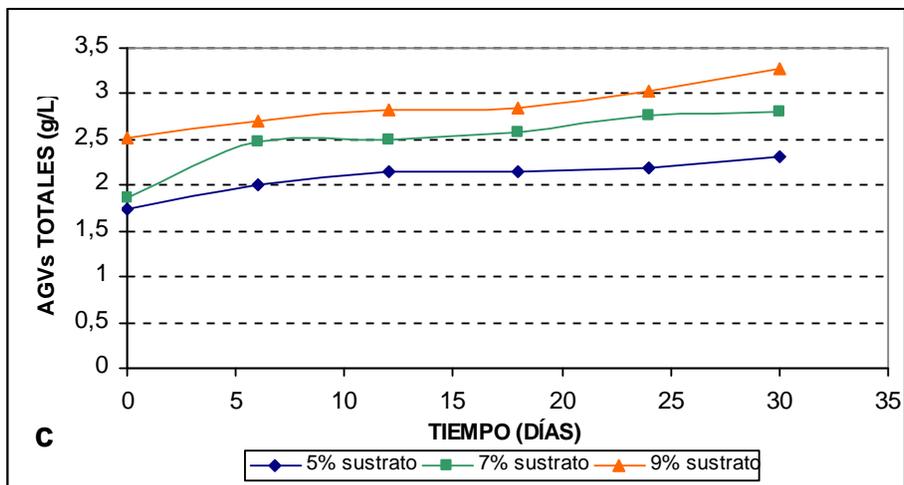
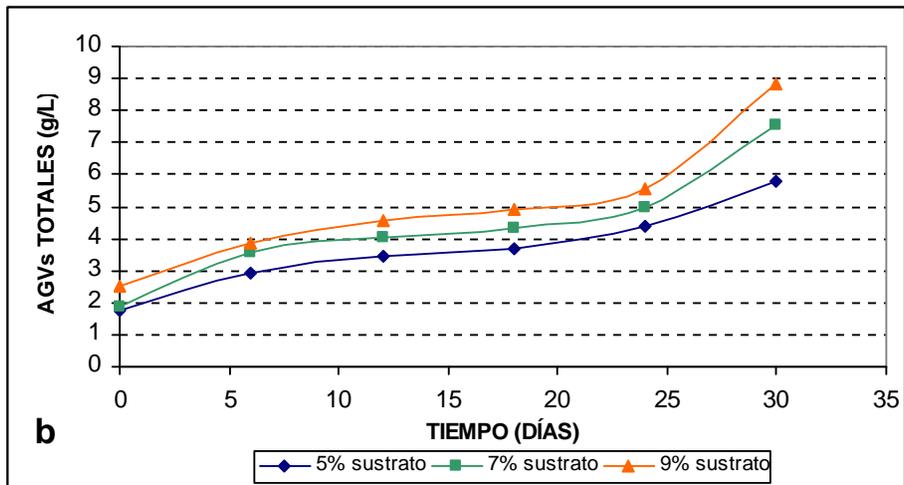
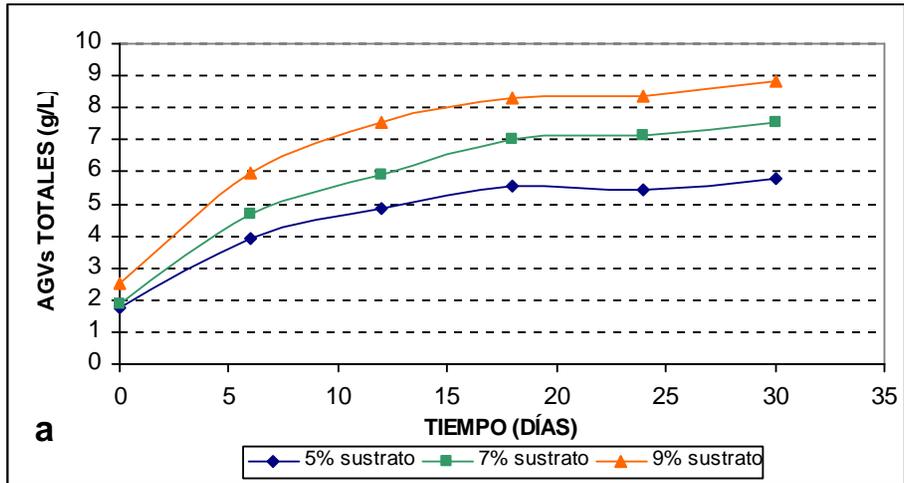


Figura 11. Producción de AGVs por el consorcio TACANA a partir de la hidrólisis anaeróbica de la paja de ALFA a distintas concentraciones (5,7,9%). a) 37°C b) 8-22°C (Amb) c) 4°C

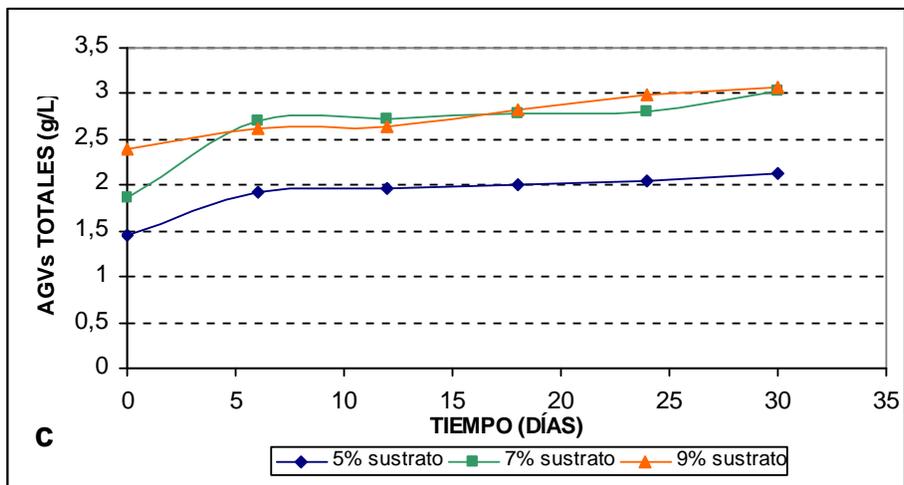
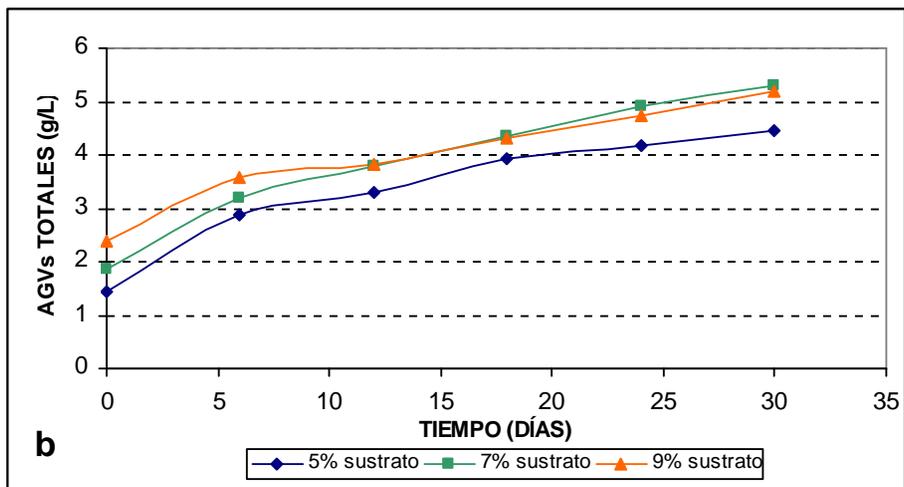
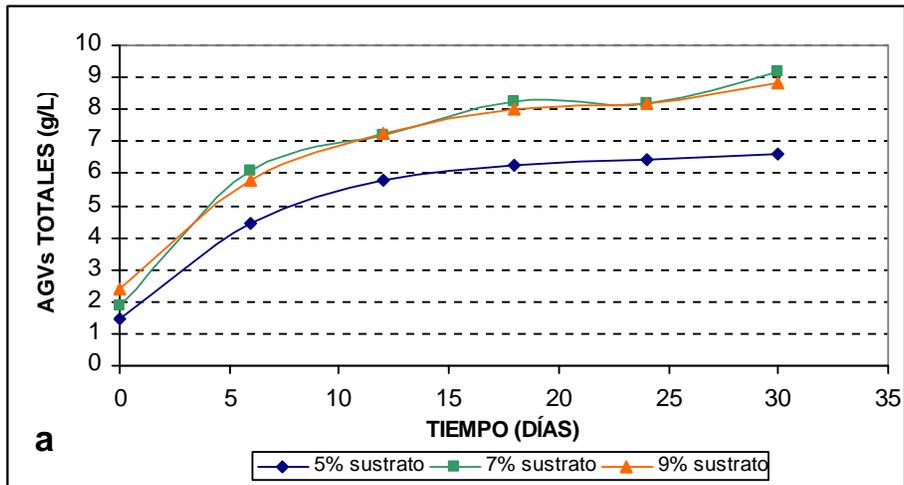


Figura 12. Producción de AGVs por el consorcio TACANA a partir de la hidrólisis anaeróbica de la paja de SOYA a distintas concentraciones (5,7,9%). a) 37°C b) 8-22°C (Amb) c) 4°C

En la Figura 13a se puede observar la influencia de la temperatura y la concentración de sustrato en la producción de AGVs totales por el consorcio TACANA en un medio con paja de cebada como sustrato. La figura 13b muestra que la concentración de AGVs aumenta en más de un 50% (concentración final 10.62 g/L) con 9 %p/v de paja de cebada a 37°C de temperatura de incubación.

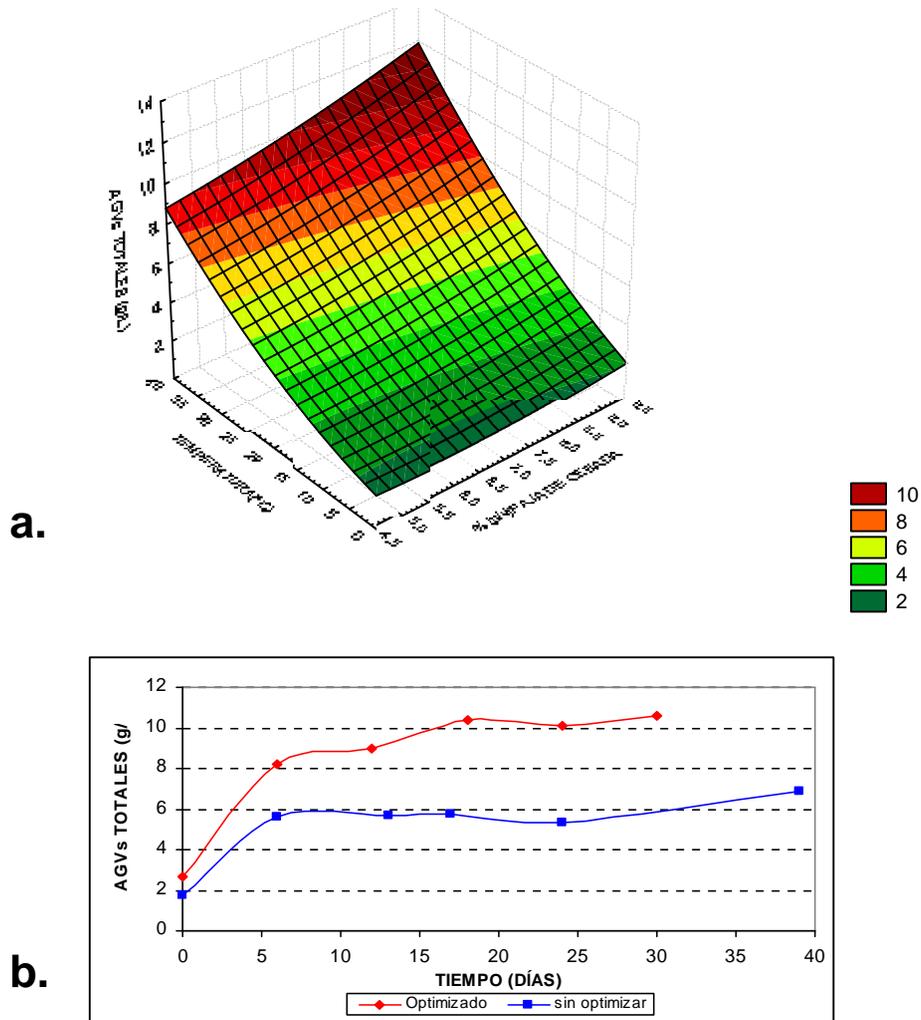


Figura 13. a) Influencia de la temperatura y la concentración de sustrato en la producción de AGVs por el consorcio TACANA a partir de la digestión anaeróbica de la paja de cebada. **b)** Incremento en la producción de AGVs totales por el consorcio TACANA en un periodo de 35 días.

7.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

En la Figura 14a se observa la influencia de la temperatura y la concentración de sustrato en los valores de DQO, durante la digestión anaeróbica del consorcio TACANA en proporciones distintas de paja de cebada y diferentes temperaturas de incubación.

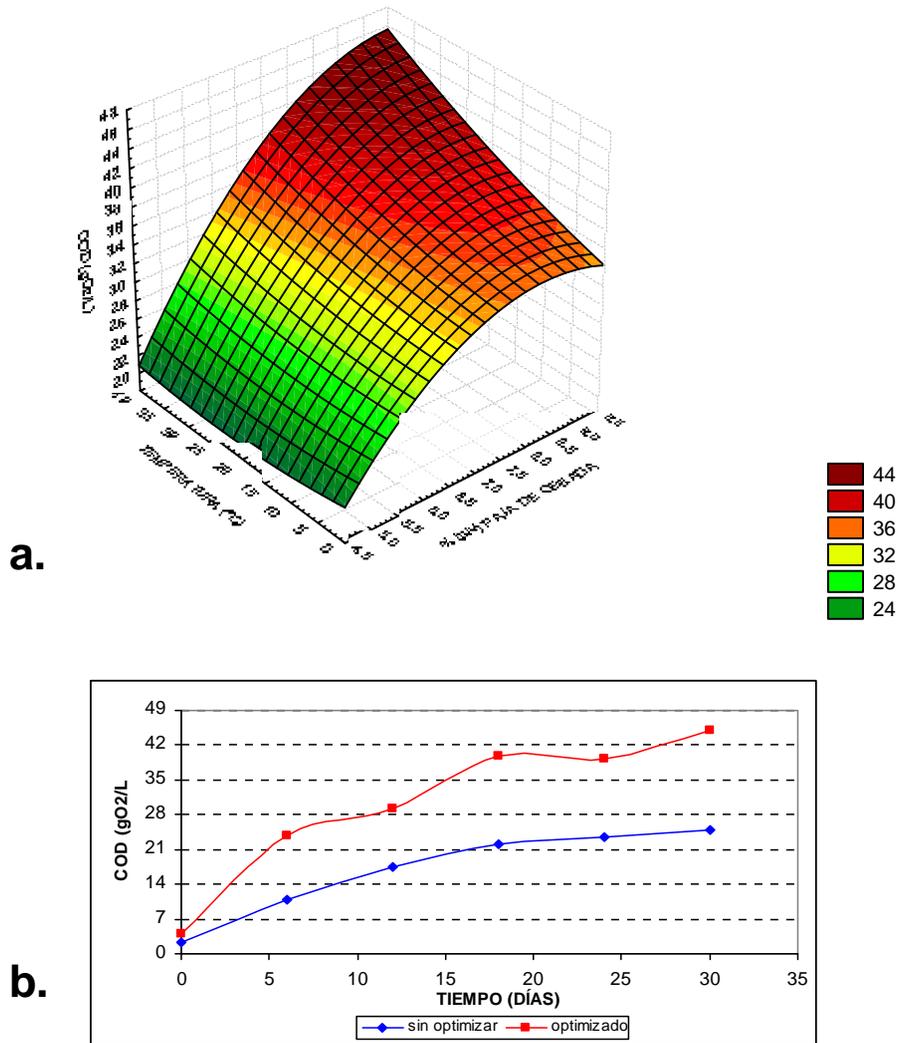


Figura 14. a) Influencia de la temperatura y la concentración de sustrato en los valores de COD durante la digestión anaeróbica de la paja de cebada por el consorcio TACANA .
b) Incremento en la DQO por el consorcio TACANA en un periodo de 30 días de incubación.

7.4 Actividad enzimática

En la Figura 15 se observa la actividad de las endocelulasas y exocelulasas (- glucosidasas) del consorcio TACANA en los cultivos Batch que contienen paja de cebada como sustrato, y se observa que existe una mayor actividad exocelulolítica (1,661 UI/mL) comparada con la actividad endocelulolítica (0,517 UI/mL).

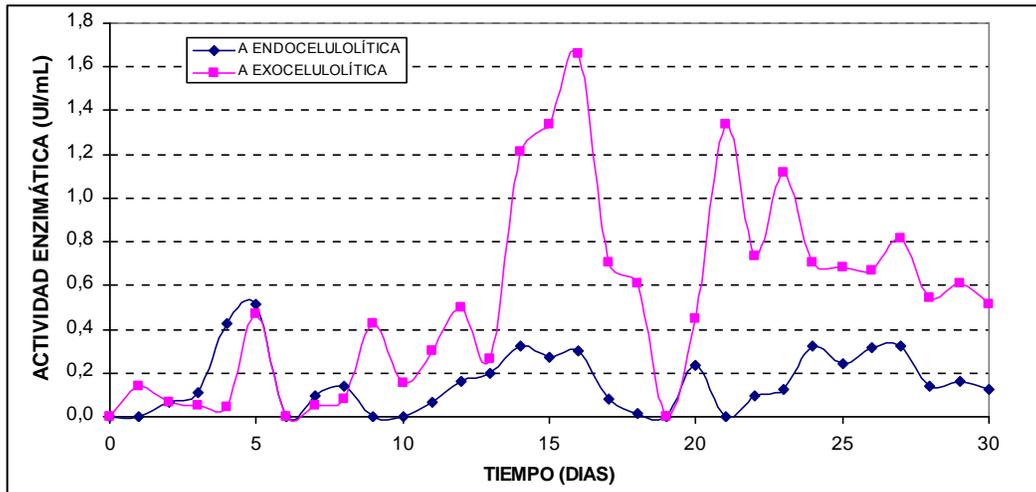


Figura 15. Actividad endo/exo celulolítica del la hidrólisis anaeróbica de la cebada al 9% (p/v) por el consorcio TACANA a 37°C.

En la Figura 16 se observa la actividad de las endoxilanasas y exoxilanasas (- xiloxidadas) del consorcio TACANA en los cultivos Batch que continenen paja de cebada como sustrato, y se observa que existe una mayor actividad exoxilanolítica (0,491 UI/mL) comparada con la actividad endoxilanolítica (0,042 UI/mL).

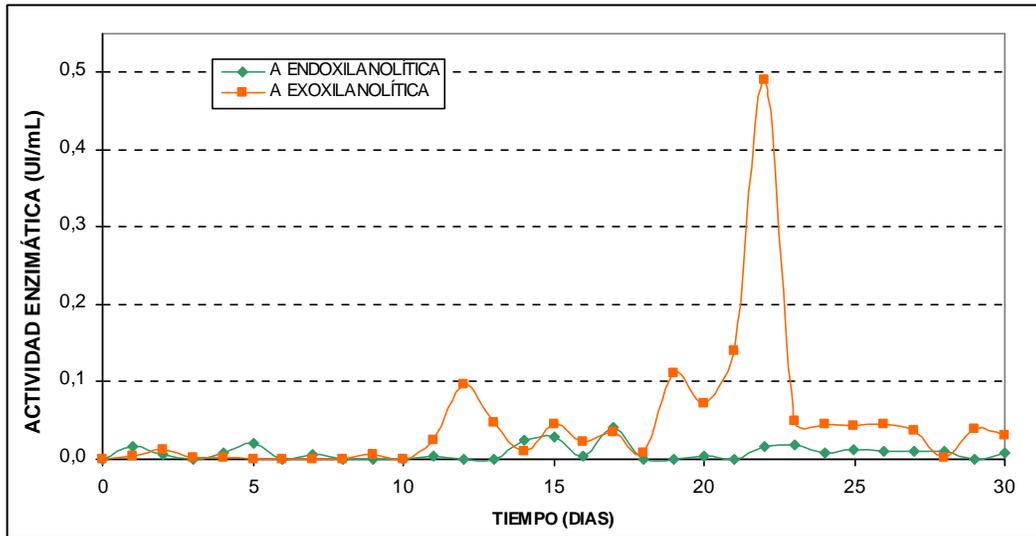


Figura 16. Actividad endo/exo xilanolítica de la hidrólisis anaeróbica de la cebada al 9% (p/v) por el consorcio TACANA a 37°C.

7.5 AGVs individuales

En las Figuras 17 y 18 muestran los cromatogramas en el que se observan los diferentes AGVs individuales que se producen en la digestión anaeróbica de la paja de cebada por el consorcio TACANA de acuerdo a los tiempos de retención: ácido acético 2.61 min, ácido propiónico 4.03 min, ácido n-butírico 5.57 min.

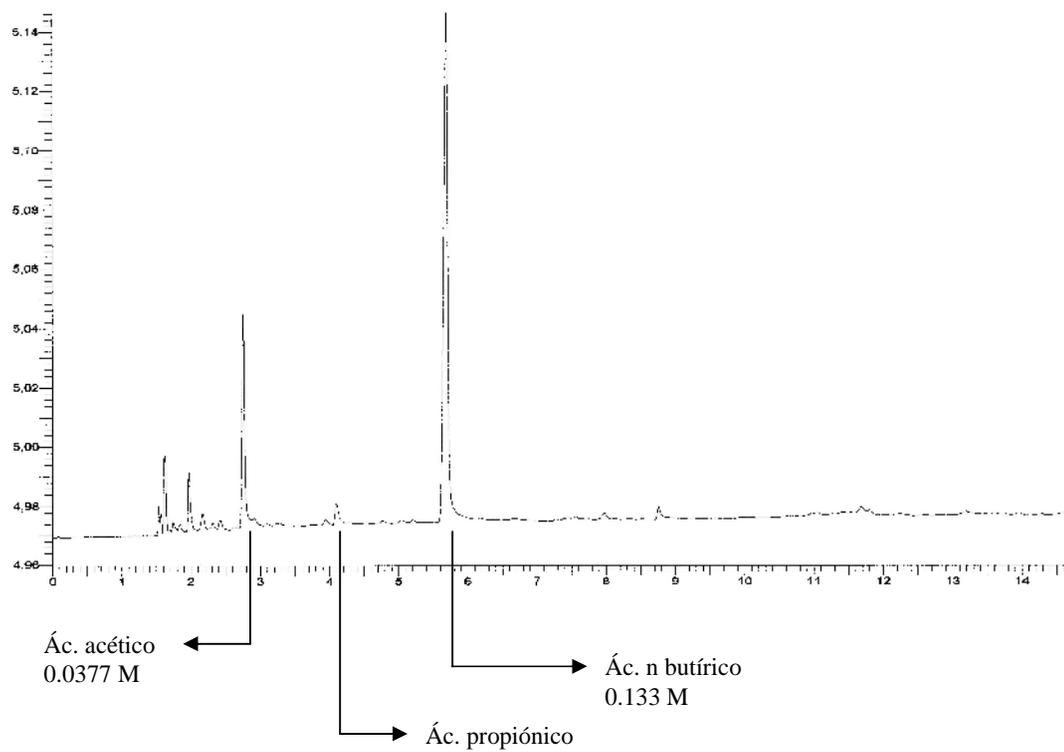


Figura 17. Cromatograma de los AGVs individuales producidos en la digestión anaeróbica de de paja de cebada al 5% (p/v) por el consorcio TACANA.

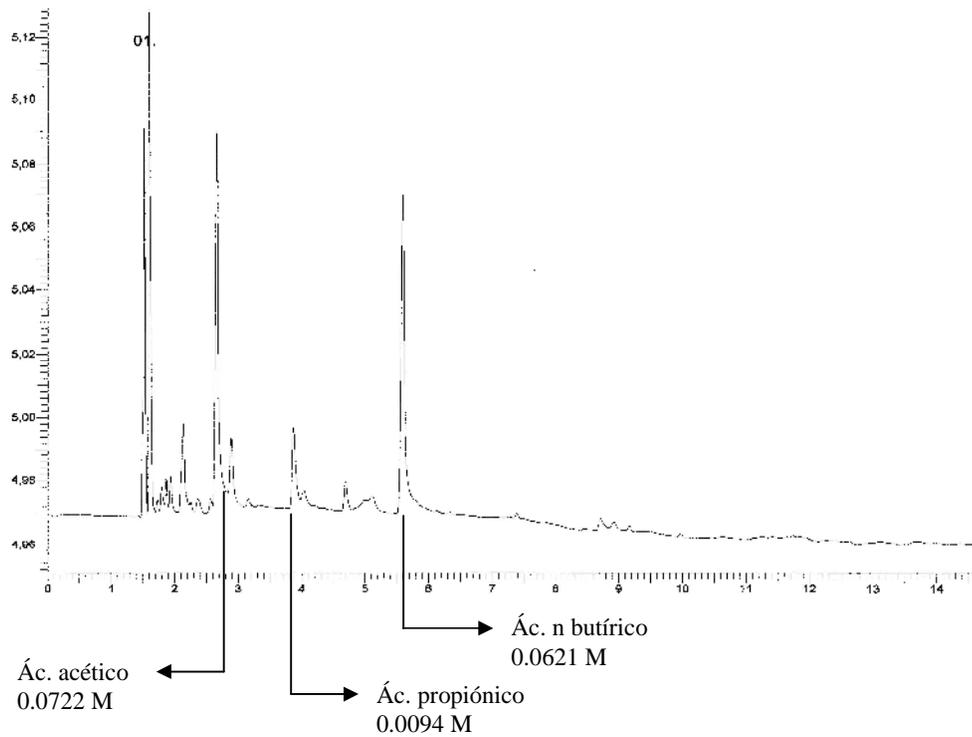


Figura 18. Cromatograma de los AGVs individuales producidos en la digestión anaeróbica de de paja de cebada al 9% (p/v) por el consorcio TAC ANA.

7.6 Tinción de los PHAs

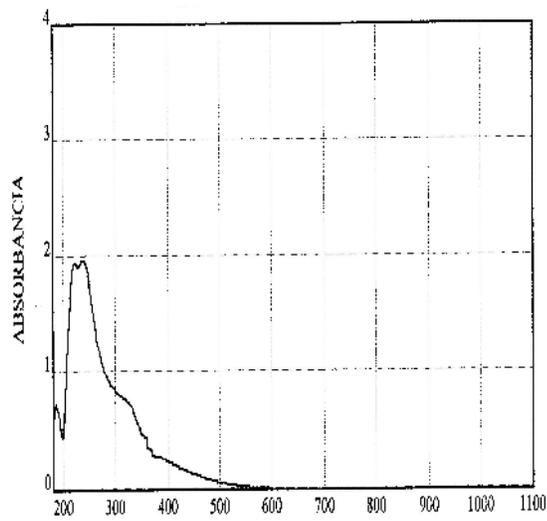
En la Figura 19 se observa a los microorganismos del consorcio TACANA por medio de la tinción con Negro Sudán, después del periodo de inanición de 1mes (12 h por ciclo).

b)

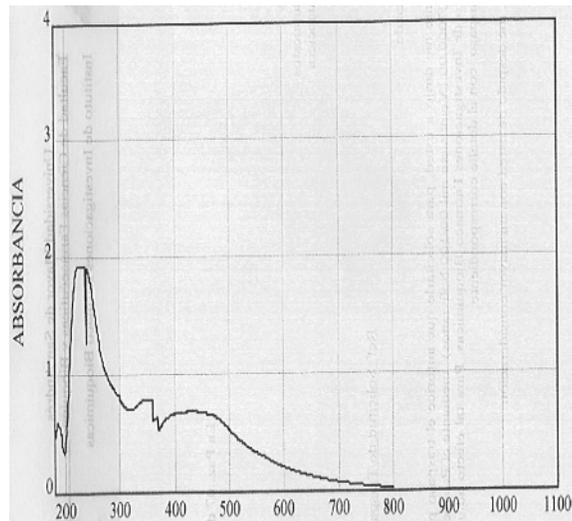
Figura 19. Gránulos de PHAs presentes en el consorcio TACANA a) 100x b) 700x

7.7 Barrido Espectral

La Figura 20 muestra que el espectro de absorción del ácido crotonico obtenido a partir de la hidrólisis ácida de un PHB estándar y el espectro de absorción del extracto obtenido de la muestra después de la hidrólisis ácida son similares.



a.



b.

Figura 20 a). Espectro de absorción de la solución estándar (ácido crotonico)

b). Espectro de absorción de la muestra.

DISCUSIÓN

8.1 Cultivos batch

8.1.1 Hidrólisis enzimática y producción de AGVs totales

La matriz orgánica de los residuos agrícolas esta constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina en proporciones variables de acuerdo a la especie vegetal (Chávez *et al.*, 2005). Debido a que los microorganismos con la capacidad de acumular PHAs requieren moléculas simples como fuente de carbono, energía y material para acumular estos PHAs en determinadas condiciones, la degradación o hidrólisis de la matriz orgánica es esencial para brindar moléculas fácilmente asimilables por estos microorganismos. En el presente estudio se demostró que todos los desechos agrícolas aquí señalados son hidrolizables unos más que otros, por las enzimas hidrolíticas con actividades celulolíticas y xilanolíticas, secretadas por los microorganismos constituyentes de cada consorcio.

Por estas razones en el presente trabajo, se realizó el estudio de varios consorcios microbianos, los cuales fueron enfrentados a diferentes sustratos celulósicos y hemicelulósicos para realizar la digestión anaeróbica.

En una primera etapa se demostró que los residuos agrícolas: paja de cebada, soya y alfa son los más hidrolizables por el consorcio TACANA debido a se observó una mayor producción de AGVs totales 6.85, 6.21 y 6.51 g/L respectivamente, estos valores fueron ligeramente superiores a los reportados por Chavez *et al.*, 2006 y Chambi *et al.*, 2007 en la hidrólisis de paja de quinua, cascarilla de arroz y paja de trigo. La relación directa entre la actividad enzimática hidrolítica y la producción de AGVs es corroborado por Crespo *et al.*, 2005.

8.1.2 Optimización de la producción de AGVs

Debido a la diversidad de los microorganismos pertenecientes a un consorcio y a la posibilidad de optimizar la degradación de la materia orgánica, se establecieron sistemas de cultivo batch basados en diseños factoriales con la finalidad de encontrar las condiciones adecuadas para una mayor producción de AGVs totales.

En el presente trabajo, la producción de AGVs por el consorcio TACANA varía cuando se utilizan distintas concentraciones de desecho agrícola (paja de cebada, alfa y soya) a diferentes temperaturas de incubación (Figuras 15, 16 y 17) . Como resultado se observó que el consorcio TACANA produce una mayor cantidad de AGVs cuando utiliza paja de cebada como fuente de carbono.

En la Figura 18 se observa el resultado de la interacción de las dos variables independientes (proporción de paja de cebada y temperatura) , sobre la variable dependiente (g/L AGVs), ambas variables tienen una alta influencia en la producción de AGVs, observando un aumento en más del 50% en la producción de AGVs por el consorcio TACANA a partir de la digestión anaeróbica de la paja de cebada a una concentración del 9% (p/v) y a 37 °C de temperatura de incubación, este valor alcanzado fue de 10.62 gAGVs/L.

8.1.3 Actividad Enzimática

x

0,491 22

0,042 17

CMC

1,661 16

0,517 5

8.1.4 Determinación de AGVs individuales

Los ácidos grasos volátiles son ácidos orgánicos de bajo peso molecular con características altamente hidrofílicas. Estos ácidos se originan en la digestión anaeróbica de carbohidratos, proteínas y grasas, por tanto están presentes en muestras de lodo, y aguas residuales (Abalos *et al.*, 2000).

en el presente trabajo se determinó la concentración de AGVs individuales producidos en la digestión anaeróbica de la paja de cebada por el consorcio TACANA. Se determinó que en la digestión anaeróbica de la paja de cebada por el consorcio TACANA hay una producción principalmente de ácido butírico y acético.

CONCLUSIONES Y PESPECTIVAS FUTURAS

9.1 Conclusiones

En el presente trabajo, se determinó que el mejor sustrato y consorcio para la producción de AGVs es el consorcio TACANA con la paja de cebada.

Se estableció que existe una relación directamente proporcional entre la temperatura y la concentración de paja de cebada en la producción de AGVs, de igual forma que en la demanda química de oxígeno, considerándose como un indicador de la hidrólisis y de la carga orgánica de la paja de cebada.

La temperatura es un factor muy importante en la hidrólisis anaeróbica, debido a que se observó la disminución en la producción de AGVs a bajas temperaturas.

La paja de cebada es hidrolizada por el consorcio TACANA gracias a la producción de enzimas celulolíticas y xilanolíticas producidas por los microorganismos implicados en el proceso de digestión anaeróbica.

Los AGVs producidos con mayor frecuencia en la hidrólisis anaeróbica de la paja de cebada por el consorcio TACANA son el ácido acético y el ácido n - butírico, los mismos pueden ser utilizados en la producción de PHAs. La proporción entre estos dos ácidos grasos volátiles varía con relación a la concentración de paja de cebada utilizada.

Los espectros de absorción obtenidos son muy similares lo que nos indica de forma cualitativa la presencia de PHB en los microorganismos después del periodo de inanición, las posibles diferencias observadas son debido a que los microorganismos pertenecientes al cultivo mixto no acumulan PHB de manera exclusiva, sino que podrían acumular un copolímero con diferentes unidades monoméricas.

9.2 Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras en posteriores trabajos se pretende determinar cuantitativamente la producción de PHAs para poder realizar la optimización de las condiciones de cultivo, como por ejemplo: duración de los ciclos de inanición, el efecto de la deficiencia de fósforo y nitrógeno en el medio en la producción de PHAs (Bengtsson *et al.*, 2008). Determinar la influencia que tiene la concentración de cada uno de estos AGVs individuales sobre la producción de PHAs, determinar qué ácidos grasos producidos en la digestión anaeróbica promueven la acumulación de PHAs.

La utilización de los AGVs para producción a gran escala de solventes orgánicos.

REFERENCIAS

Abalos M, Bayona JM, Pawliszyn J. Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters. *Journal of Chromatography A*. 2000; 873: 107 – 115.

Abalos M, Bayona J.M. Application of gas chromatography coupled to chemical ionisation mass spectrometry following headspace solid-phase microextraction for the determination of free volatile fatty acids in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 2000;891: 287 – 294.

Alvarez M, Terrazas E. Manual para la producción y valoración de enzimas microbianas con interés biotecnológico. I.I.F.B., F.C.F.B., UMSA, La Paz -Bolivia 2002, 1 – 19.

Baier, U., Schmidheiny, P. Enhanced anaerobic degradation of mechanically disintegrated sludge. *Water Sci. Technol* 36. 1997 (11),137–143.

Beguín P, Aubert J. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology*. 1994;13: 25 – 58.

Benavides, L. (1994) “Gestión Ambiental en la Industria Boliviana: Propuesta a la Cámara Nacional de Industrias” Organización de Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI), abril 1994.

Bengtsson S, Werker A, Christensson M, Welander T. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*. 2007; 99: 509-516.

Boe Kanokwan, Batstone D.J., Angelidaki Irini. An innovative online VFA monitoring system for the anaerobic process, based on headspace gas chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 96, No 4. 2007 p. 712-721.

Bouallagui H, Touhami Y, Ben R, Hamdi M. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biochemistry*. 2005;40: 989 – 995.

Braunegg G, Lefebvre G, Genser K. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*.1998;65: 127 – 161.

Buchauer K. A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to wastewater and sludge treatment. *Processes*. *Water S.A.*1998; 24: 49 – 56.

Catalan R, Neira A, Rivas B.L. Estudio de la copolimerización por un injerto de acrilonitrilo en fibra celulósica secundaria. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 2002;47: 39 - 47.

Chae K.J., Jang A, Yim S.K., Kim S. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource Technology*. 2008;99: 1 – 6.

Chambi E, Alvarez M, Giménez A. Optimización de las condiciones más favorables para la producción de biogas mediante digestión anaerobia de la paja de quínoa (*Chenopodium quinoa willdenow*) y cascarilla de arroz (*Oryza sativa*). Tesis de Licenciatura. I.I.F.B., UMSA. La Paz-Bolivia. 2007.

Chávez G, Alvarez M, Giménez A. Precipitación de metales pesados con sulfuro de hidrógeno biogénico producido a partir de la degradación anaeróbica de material celulósico y xilanósico. Tesis de maestría. I.I.F.B., UMSA. La Paz-Bolivia. 2006.

Eggink, G., deWaard, P., Huijberts, G.N., Formation of novel poly(hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. *Can. J. Microbiol.* 1995 (41): 14–21

Eiora M, Torrez C, Nunes BR, Reis MAM. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*. 2007;130: 411 – 421.

Enfors S, Häggström. *Bioprocess Technology Fundamentals and Applications*. 2000. 1ed., Högskoletyckeriet, Royal Institute of Technology, Sweden.

Escóbar, J. y Muñoz, J. (1997) “Marco Regulatorio e Instrumentos de Mercado de la Política Ambiental en Bolivia”, Documento de Trabajo 55/97. Unidad de Análisis de Políticas Sociales (UDAPSO), La Paz, julio 1997.

Flechter, A., *Plastics from Bacteria and for Bacteria: PHA as Natural, Biodegradable Polyesters*. Springer Verlag, New York, 1993: 77–93.

Gallert C, Winter J. Bacterial metabolism in wastewater treatment systems. *Environmental Biotechnology Concepts and Applications*. 2005; 1 – 48.

Geeta, G.S., Suvarna, C.V., Jagdeesh, K.S. Enhanced methane production by sugarcane trash pretreated with *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Microbiol. Biotechnol* 9. 1994 (2), 113–117.

González E, Albanell E, Caja G. Utilización de enzimas fibrinolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas *in vitro*. Tesis de doctorado. Departamento de Ciencias de los Animales y de los alimentos. Universidad autónoma de Barcelona. Barcelona-España. 2004.

Haywood G.W., Anderson A.J., Dawes E. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology*. 1989;57: 1 – 6.

Hocking, P.J., Marchessault, R.H.,. In: Griffin, G.J.L. (Ed.), *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*. Chapman & Hall, 1997. 48–96.

Hongpattarakere T. Hyperthermostable cellulytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications. *Science and Technology*. 2002;24: 481 – 490.

Jain, S.R., Mattiasson, B. Acclimatization of methanogenic consortia for low pH biomethanation process. *Biotech. Lett* 20. 1998 (8), 771–775.

Kleerebezem R, Van Loosdrecht M. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007;18: 207 – 212.

Law J, Slepecky R. Assay of poly-B-hydroxybutyric acid. Department of Chemistry, Harvard University, Cambridge. 1960; 33 – 36.

Lemoigne, M., E´tudes sur l'autolyse microbienne: origine de l'acide b-oxybutyrique formé par autolyse. Ann. Inst. Pasteur 41.1927 : 148–165.

Lemos P, Serafim L, Reis M. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short - chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. Journal of Biotechnology. 2006;122: 226 – 238.

Lenz, R.W. Biodegradable Polymers and Plastics in Japan: Research, Development, and Applications. National Technical Information Service (NTIS) 1995.Report c PB95 - 199071 (JTEC monograph), US Dept. Commerce.

Madison, L.L., Huisman, G.W.,. Metabolicengineering of poly(3 -hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol. Mol. Biol.1999 :(1), 21–53.

Mata-Alvarez J., Macé S., Llabrés P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. Bioresource Technology 74. 2000 p. 3-16.

Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 1959; 31: 426 – 428.

Miller T, Wolin J.M. A serum bottle modification fo the hungate techni que for cultivating obligate anaerobes. Applied Microbiology. 1974; 27:985 – 987.

Ojumu T.V., Yu J, Solomon B.O. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. African Journal of Biotechnology. 2004;3: 18 – 24.

Panda B, Jain P, Sharma L, Mallick N. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly-B-hydroxybutyrate in *Synchocystis* sp. PCC 6803. Bioresource Technology. 2005; 97: 1296 – 1301.

Panda B, Sharma L, Mallick N. Poly-B-hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* and *Spirulina platensis* under phosphate limitation. Journal of Plant Physiology. 2005;162: 1376 – 1379.

Quispe D, Alvarez M, Giménez A. Establecimiento de las condiciones para la producción de biogas a partir de ácidos grasos volátiles obtenidos de la hidrólisis anaeróbica de la papa (*Solanum tuberosum*) a nivel de laboratorio. Tesina de licenciatura. I.I.F.B, UMSA, 2005.

Reddy C.S.K, Ghai R, Rashmi, Kalia V.C.A. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource Technology. 2003; 87: 137-146.

Salehizadeh H., Van Loosdrecht M.C.M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed cultre: recent trends and biotechnological importance. Biotechnology Advances 22. 2004 p. 261-279.

Sanchez, J.M., Arijo, S., Munoz, M.A., Morinigo, M.A., Borrego, J.J. Microbial colonization of different support materials used to enhance the methanogenic process. Appl. Microbiol.Biotechnol. 41.1994 (4): 480–486.

Sá-Pereira P, Paveia H, Costa-Ferreira M, Aires-Barros M. A new look at xylanases. An overview of purification strategies. *Molecular Biotechnology*. 2003;24: 257 – 281.

Serafim L.S, Lemos P, Oliveira R, Reis M. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology Bioengineering*. 2004;87: 145 – 160.

Sung-Taik L, Jay L. Insoluble dye substrate for screening and assay of xylan -degrading enzymes. *Journal of Microbiological Methods*. 1997;29: 1 – 5.

Voet D, Voet G. *Biochemistry*. 1990. Jhon Wiley & Sons, Inc., U.S.A.

Wendlandt D, Geyer W, Mirschel G. Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. *Journal of Biotechnology*. 2005; 117 : 119-129.

Wang, Q., Kuninobu, M., Kakimoto, K., Ogawa, H.I., Kato, T., Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by ultrasonic pretreatment. *Bioresour. Technol* 68. 1999 (3), 309–313.

Wodzinska, J., Snell, K.D., Rhomberg, A., Sinskey, A.J., Biemann, K., Stubbe, J., Polyhydroxybutyrate synthase– evidence for covalent catalysis. *J. American. Chemistry Society*. 1996;.118: 6319–6320.

Yadvika, Santosh, Sreekrishnana T.R., Kohli Sangeeta, Rana Vineet . Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques -a review. *Bioresource Technology* 95. 2004 p. 1-10.

ANEXO 1

Composición química y modo de preparación del medio anaeróbico fluido (línea comercial Scharlaw Chemie S.A. Barcelona. Spain)

Composición:

Composición	Cantidad g/L
Caseína peptona	15
Soya peptona	3
Extracto de carne	3
Extracto de levadura	3
Extracto de hígado	3
Dextrosa	6
Cloruro de sodio	2.5
Tioglicolato de sodio	0.5
L-cisteína	0.3
Sulfito de sodio	0.7
Formaldehído sulfoxilato de sodio	0.5
Resazurina	0.001
Agar	0.5
pH final	7.2 (+-0.2)

Preparación:

Suspender 38 g del polvo en un litro de agua destilada, calentar con agitación constante y llevar a ebullición. Distribuir en tubos y esterilizar al autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

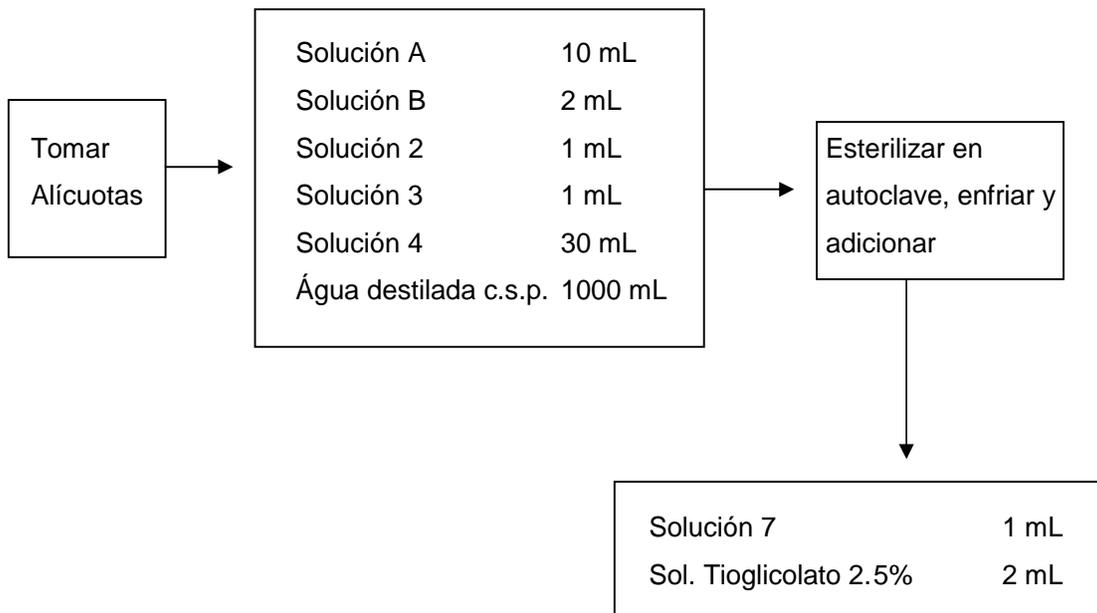
ANEXO 2

Composición química y modo de preparación del Medio basal 11 (modificado)

Composición

Solución	Compuestos químicos	Cantidad
Solución A	NH ₄ Cl NaCl MgCl ₂ *6H ₂ O CaCl ₂ *2H ₂ O	100 g/L 10 g/L 10 g/L 5 g/L
Solución B	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	200 g/L
Solución 2	FeCl ₃ *4H ₂ O H ₃ BO ₃ HCl (25%) CoCl ₂ *6H ₂ O MnCl ₂ *4H ₂ O Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O NiCl ₂ *6H ₂ O ZnCl ₂ CuCl ₂ *2H ₂ O Agua destilada c.s.p.	1.5 g 60 mg 6.5 mL 120 mg 100 mg 25 mg 25 mg 70 mg 15 mg 1000 mL
Solución 3	Na ₂ SeO ₃ NaOH Agua destilada c.s.p.	3 mg 0.5 g 1000 mL
Solución 4	NaHCO ₃	8.5 g/100 mL
Solución 7	Biotina PABA Vit. B ₁₂ Tiamina Agua destilada c.s.p.	1 mg 5 mg 5 mg 10 mg 1000 mL
Solución tioglicolato	Tioglicolato de sodio	2.5 g/100 mL

Preparación



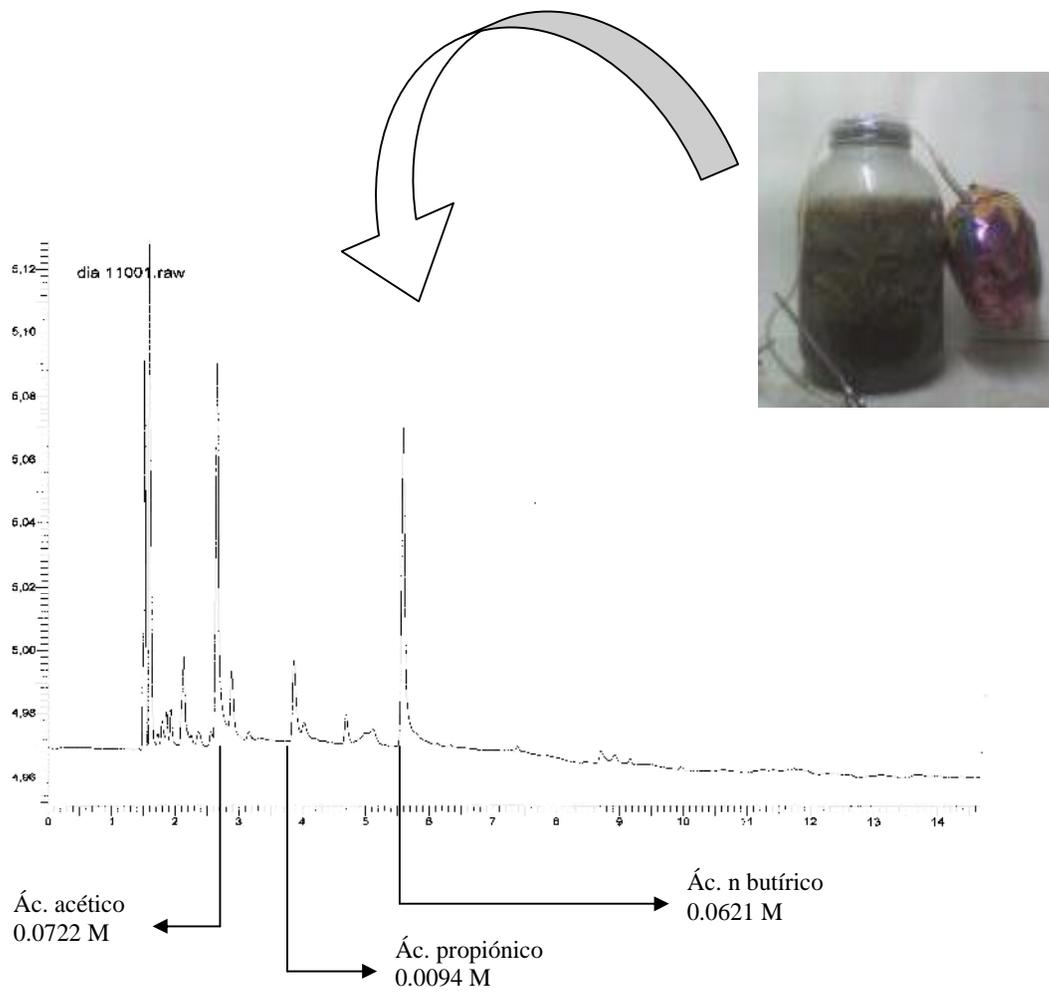
ANEXO 3

Sistema en Batch utilizados para la determinación de la actividad enzimática



ANEXO 4

Cromatograma obtenido de la digestión anaeróbica de 9% p/v de paja de cebada a 37 °C, estos AGVs producidos fueron utilizados en los periodos de inanición.



ANEXO 5

Composición química y modo de preparación del reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico).

Composición:

Compuesto químico	Cantidad
Fenol	0.2 g
Sulfito de sodio	0.5 g
Ácido dinitrosalicílico	10 g
Hidróxido de sodio	10 g
Tartrato doble de sodio-potasio	200 g
Agua di destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación:

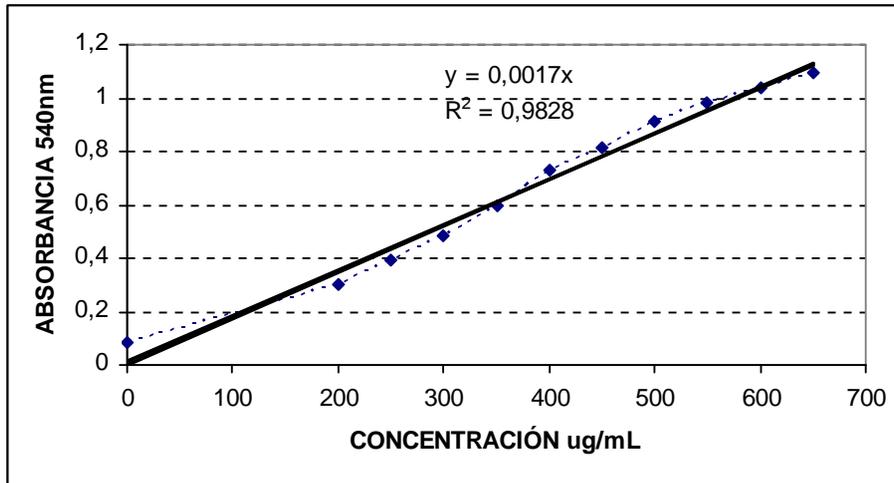
- Disolver el hidróxido de sodio en 200 mL de agua
- Añadir 100 mL de agua y disolver el sulfito de sodio
- Añadir del fenol y enrasar a 500 mL, disolver.
- Añadir el tartrato de sodio-potasio y adicionar una alícuota de agua
- Añadir el ácido dinitrosalicílico, disolver completa mente (+- 3 h) y enrasar a 1000 mL.

Nota: Debe prepararse en un matraz aforado color ámbar y utilizar agitador magnético para disolver. Una vez liso, trasvasar en otro envase, también de color ámbar u oscuro.

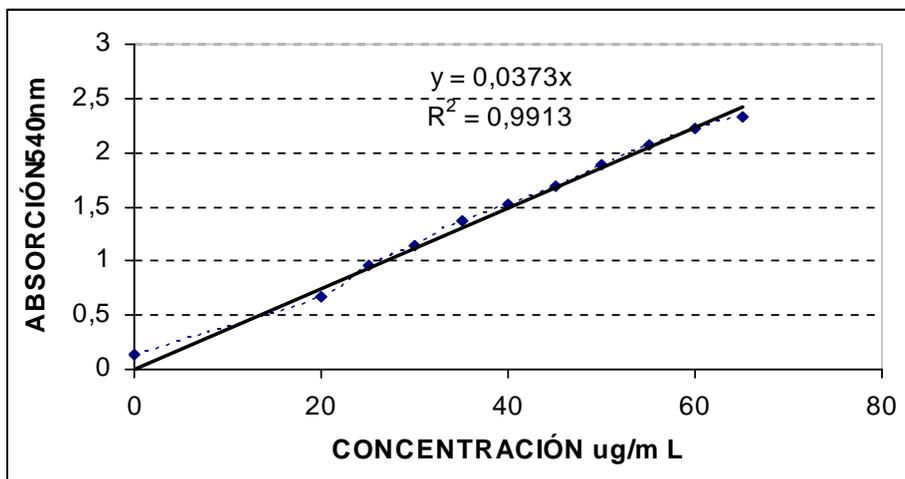
ANEXO 6

Curvas de calibración para la determinación de las actividades enzimáticas celulasa y xilanasas.

Curva de calibración de la Glucosa



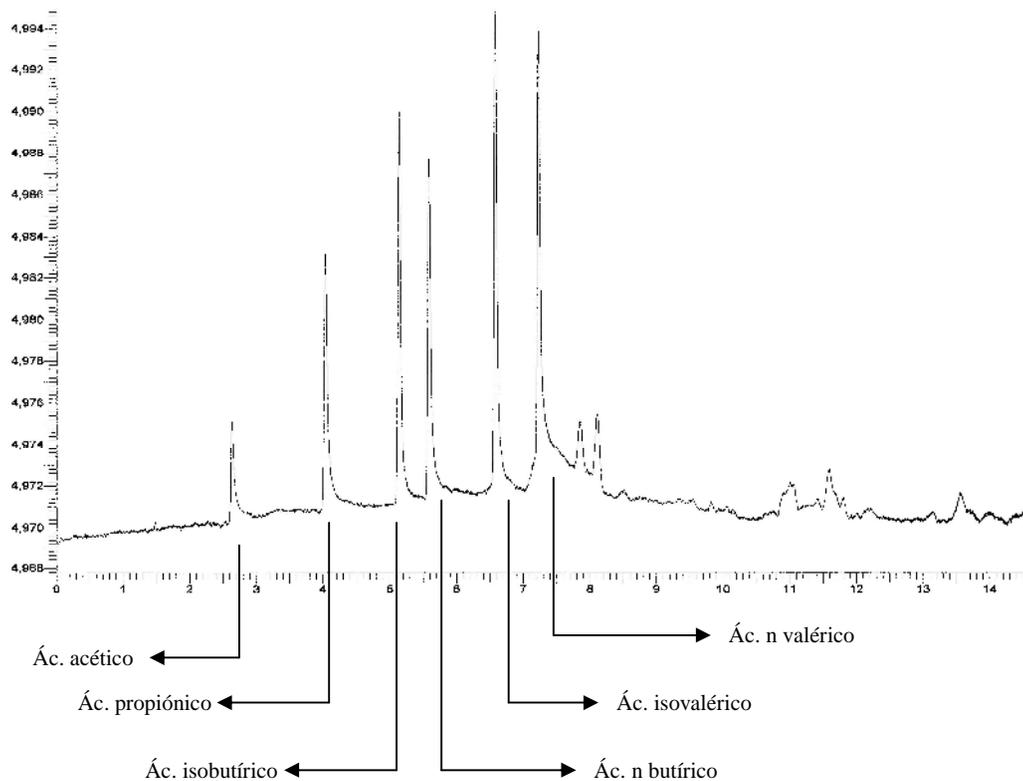
Curva de calibración de la Xilosa



ANEXO 7

Tiempo de retención de los estándares de ácidos grasos volátiles.

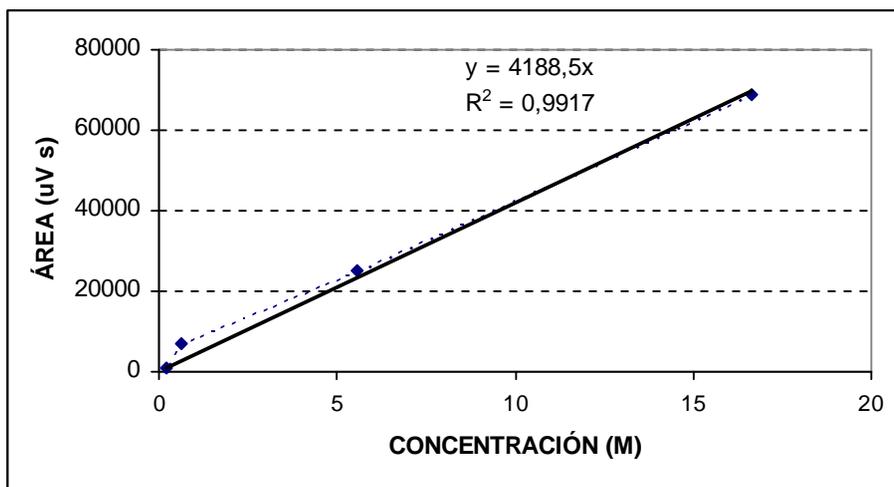
Ácido graso volátil	Tiempo de retención (min)
Ácido acético	2.61
Ácido propiónico	4.03
Ácido i-butírico	5.14
Ácido n-butírico	5.57
Ácido i-valérico	6.62
Ácido n-valérico	7.25



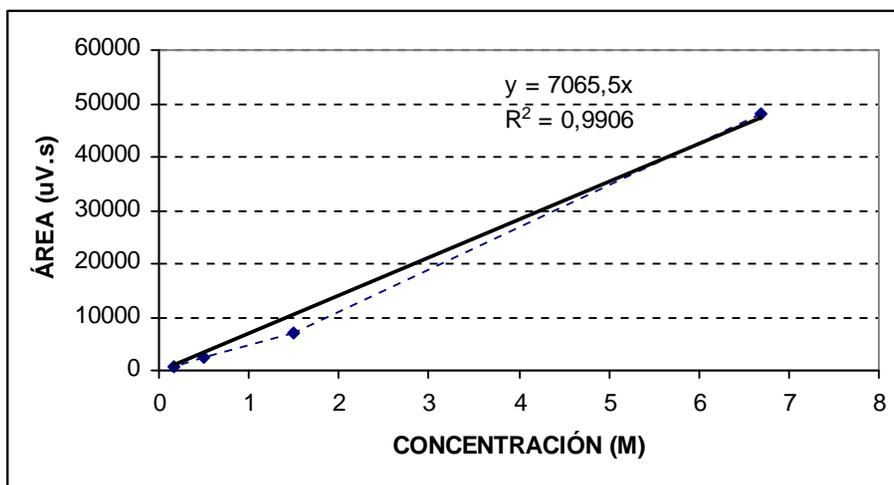
ANEXO 8

Curvas de calibración para la determinación de ácidos grasos volátiles individuales.

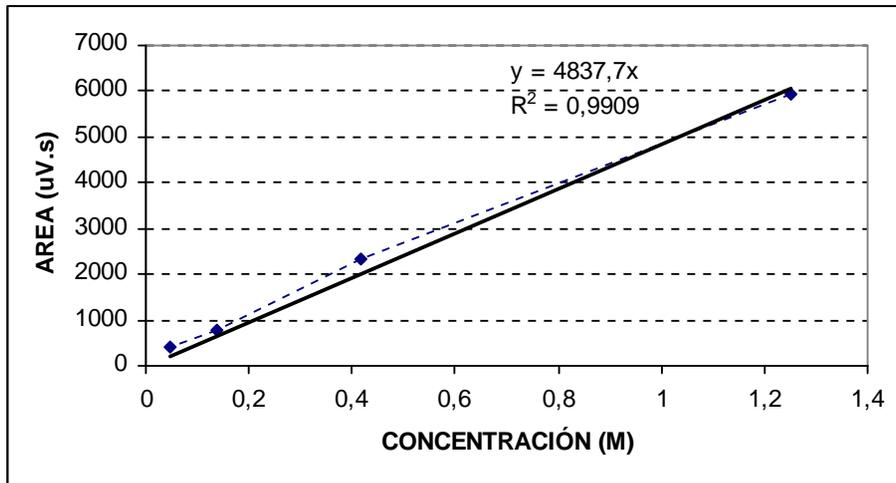
Curva de calibración del ácido acético



Curva de calibración del ácido propiónico



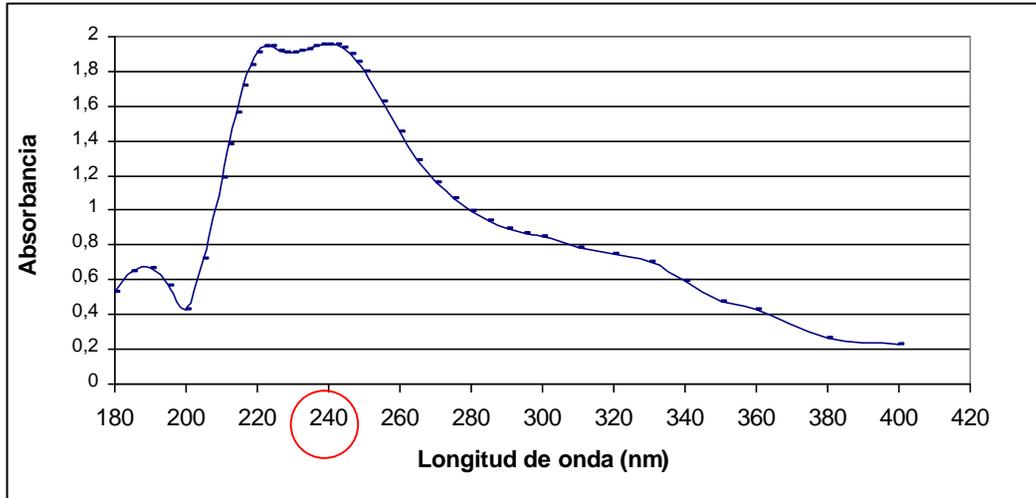
Curva de calibración del ácido butírico



Curva de calibración del ácido valérico

ANEXO 9

Espectro de absorción del ácido crotónico.



Longitud de onda de máxima absorción = 240 nm

Curva de calibración del ácido crotónico.

