



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA**  
**INGENIERÍA AMBIENTAL- AGUA**

**PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍlicos DE CADENA MEDIA A PARTIR**  
**DE EFLUENTES VITIVINÍCOLAS**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN INGENIERÍA**

PRESENTA:  
**SHARON BENILDE VILLEGAS RODRÍGUEZ**

TUTOR PRINCIPAL  
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ- INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DR. JORGE ARREOLA VARGAS- TEXAS A&M UNIVERSITY  
DR. ULISES DURAN HINOJOSA- INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM.

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, FEBRERO 2024.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Dra. Georgina Fernández Villagómez

Secretario: Dr. Julián Carillo Reyes

Vocal 1: Dra. Flor de María Cuervo López

Vocal 2: Dr. Jorge Arreola Vargas

Vocal 3: Dr. Germán Buitrón Méndez

## **Sitio donde se realizó la tesis**

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, UNAM.

## **DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Germán Buitrón Méndez



Firma

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Se agradece el apoyo financiero otorgado por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la UNAM a través del proyecto PAPIIT IT 102522, al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro, proyecto CACTI 90/2022 y al Instituto de Ingeniería, UNAM (GII proyecto No. 3406).

Se agradece el apoyo técnico de la M. en C. Gloria Moreno Rodríguez, del M. en B. Jaime Pérez Trevilla y del Ing. Ángel A. Hernández Huerta.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

*Doy las gracias a mi tutor principal el Dr. Germán Buitrón por todo su apoyo y paciencia durante estos años. Por compartir su experiencia y conocimiento siempre de manera respetuosa. Por sus consejos, motivación y por enseñarme desde el ejemplo el significado de las palabras: determinación, disciplina y excelencia. Por contribuir en mi crecimiento profesional y personal.*

*Agradezco a mi comité tutorial, al Dr. Jorge Arreola por sus comentarios, correcciones y recomendaciones en las revisiones a mi trabajo semestre a semestre. Agradezco también al Dr. Ulises Durán por su tiempo y comentarios que ayudaron a mejorar mi trabajo. De igual manera quiero agradecer a los miembros de mi jurado: Dr. Julián Carillo, Dra. Georgina Fernández y Dra. Flor de María Cuervo, por su tiempo en cada revisión, por atender mis dudas cuando fue necesario, por sus comentarios, correcciones y propuestas de mejora tan enriquecedoras.*

*Agradezco a la Mtra. Gloria Moreno por sus enseñanzas durante el tiempo que compartimos trabajando juntas en el laboratorio, por sus conversaciones siempre tan amenas y por brindarme siempre su consejo y entusiasmo.*

*Agradezco al Lic. Javier Villanueva por todo su apoyo en la gestión de trámites y traslados, así como su invaluable amistad, por siempre recibirme con una sonrisa y darme ánimos.*

*Quiero agradecer a mi gran amigo, el Dr. René Cardeña por ser un gran apoyo durante toda el doctorado. Por los días que te quedaste para ayudarme a terminar mis experimentos hasta muy tarde, por los consejos académicos y personales, por los ataques de risa infinitos, por siempre creer en mí y apoyarme cuando más lo necesité. Por hacer de Qro. un mejor lugar... por eso y más ¡te quiero amigo, muchas gracias!*

*Gracias a las personas maravillosas que tuve la dicha de conocer en el LIPATA: Sari, Gamita, Mery, Roberto. A Karina por nuestras visitas breves al gym y nuestros cafecitos matutinos, te quiero amiga. Gracias a Julián y Richie por ser los mejores roomies, por las noches de desvelo antes de los tutorales y por las batallas por esos 100 GB de internet. Por ser amigos, consejeros y enfermeros. Los quiero.*

*Agradezco Rodrigo Espinosa, mi novio y mejor amigo por tus palabras de amor y de aliento, por ayudarme y desvelarte a mi lado mientras escribía esta tesis. Por cuidarme, por ser tan paciente, comprensivo y amoroso. Por todas las alegrías y por todo el amor tan bonito que has traído a mi vida, porque me inspiras cada día a ser mejor persona, gracias amor mío, te amo.*

*Finalmente quiero agradecer a mi familia quienes me han brindado su apoyo de manera incondicional en cada etapa de mi vida, gracias por sus llamadas y mensajes que me dieron fuerza cuando lo necesité, por amarme y estar siempre al pendiente de mí. A mi hermosa y amada madre Graciela, por enseñarme a ser una mujer fuerte y valiente, a mi hermano Javier por su apoyo y cariño. A Rafael, por su cariño invaluable y por cuidar de nuestra familia. A mi maravillosa hermana Karen a quien amo y admiro profundamente. Gracias hermana por todo el amor y el apoyo que siempre me brindas, por escucharme, reír y llorar también conmigo. Por ser mi mejor amiga, pilar y confidente. Te amo, soy muy afortunada.*

## DEDICATORIA

*Dedico esta tesis a las mujeres más importantes de mi vida, a mi madre Graciela Rodríguez y a mi hermana Karen Villegas. Gracias por su amor infinito.*

*Todo es por y para ustedes, las amo.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>19</b>
<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 EFLUENTES VITIVINÍCOLAS .....	19
1.2 DIGESTIÓN ANAEROBIA .....	19
1.3 ÁCIDOS CARBOXÍLICOS DE CADENA MEDIA .....	22
1.3.1 Ácido hexanoico .....	22
1.3.2 Ácido Heptanoico.....	22
1.3.3 Ácido octanoico.....	23
1.4 ELONGACIÓN DE CADENA .....	24
1.4.1 $\beta$ -oxidación inversa (BOI).....	24
1.5 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ACCM .....	28
1.5.1 Cultivos axénicos.....	28
1.5.2 Microbiotas endógenas .....	29
1.6 SUSTRATOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ACCM.....	31
1.6.1 Compuestos químicos.....	31
1.6.2 Sustratos reales .....	31
1.7 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA OBTENCIÓN DE ACCM .....	32
1.7.1 pH.....	32
1.7.2 Tiempo de retención hidráulica (TRH).....	34
1.7.3 Temperatura.....	35
1.7.4 Relación etanol/acetato.....	35
1.8 CONFIGURACIÓN DE REACTORES UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ACCM .....	36
1.9 EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE ACCM .....	37
1.9.1 Extracción bifásica.....	38
1.9.2 Extracción por pertracción .....	38
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>41</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
2.1 HIPÓTESIS.....	41
2.2 OBJETIVOS .....	41
2.2.1 OBJETIVO GENERAL .....	41

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>42</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	42
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	44
3.2.1 <i>Determinación de Sólidos Totales (ST), Sólidos Volátiles (SV), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)</i> .....	44
3.2.2 <i>Demanda Química de Oxígeno (DQO)</i> .....	45
3.2.3 <i>Cuantificación de carbohidratos</i> .....	45
3.2.4 <i>Determinación y cuantificación de metabolitos</i> .....	45
3.2.5 <i>Composición de biogás</i> .....	46
3.2.6 <i>Análisis de la comunidad microbiana: extracción de ADN, secuenciación y análisis de datos</i> .....	47
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>48</b>
<b>DESEMPEÑO DE CULTIVOS MIXTOS NATIVOS (DE EFLUENTES VITIVINÍCOLAS, FLUIDO RUMINAL, LODO ANAEROBIO Y DIGESTATO) PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS DE CADENA MEDIA UTILIZANDO ETANOL Y ACETATO.....</b>	<b>48</b>
4.1 INTRODUCCIÓN .....	49
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
4.2.1 <i>Inóculo</i> .....	51
4.2.2 <i>Condiciones experimentales</i> .....	52
4.2.3 <i>Métodos analíticos</i> .....	52
4.2.4 <i>Análisis de la comunidad microbiana</i> .....	53
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	54
4.3.1 <i>Producción de ACCM</i> .....	54
4.3.2 <i>Análisis de la comunidad microbiana</i> .....	63
4.4 CONCLUSIONES .....	66
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>67</b>
<b>PRODUCCIÓN DE ACCM UTILIZANDO UN CONSORCIO NATIVO DE EFLUENTES VITIVINÍCOLAS ENRIQUECIDO CON MICROORGANISMOS RUMINALES.....</b>	<b>67</b>
5.1 INTRODUCCIÓN .....	68
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
5.2.1 <i>Preparación de inóculo</i> .....	69
5.2.2 <i>Condiciones experimentales</i> .....	69
5.2.3 <i>Métodos analíticos</i> .....	70

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
5.3.1 Producción de ACCM utilizando consorcios bacterianos como inóculo .....	70
5.3.2 Cinéticas de producción de ACCM.....	75
5.3.3 Análisis de la comunidad microbiana.....	78
5.4 CONCLUSIONES .....	82
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>83</b>
<b>EFFECTO DEL PH Y LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS DE CADENA MEDIA UTILIZANDO EFLUENTES VITIVINÍCOLAS.....</b>	<b>83</b>
6.1 INTRODUCCIÓN .....	84
MATERIALES Y MÉTODOS .....	86
6.2.1 Diseño experimental.....	86
6.2.2 Inóculo.....	86
6.2.3 Condiciones experimentales.....	86
6.2.4 Métodos analíticos .....	87
6.2.5 Análisis de la comunidad microbiana.....	87
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
6.3.1 Producción de ACCM .....	89
6.3.2 Análisis de la comunidad microbiana.....	100
6.4 CONCLUSIONES .....	104
<b>CAPÍTULO VII.....</b>	<b>105</b>
<b>PRODUCCIÓN DE ACCM UTILIZANDO EFLUENTES VITIVINÍCOLAS COMO SUSTRATO E INÓCULO Y SU SUBSECUENTE EXTRACCIÓN IN-SITU .....</b>	<b>105</b>
7.1 INTRODUCCIÓN .....	106
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	108
7.2.1 Inóculo.....	108
7.2.2 Diseño del reactor.....	108
7.2.3 Condiciones experimentales.....	109
7.2.4 Cuantificación de biomasa en los soportes.....	110
7.2.5 Métodos analíticos .....	111
7.2.6 Separación bifásica de ACCM del medio de cultivo.....	111
7.2.7 Análisis de la comunidad microbiana.....	112
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
7.3.1 Producción de ACCM .....	113
7.3.2. Extracción de ACCM del medio.....	122
7.3.3 Biomasa adherida en los soportes .....	125
7.3.4. Análisis de la comunidad microbiana.....	126
7.4 CONCLUSIONES .....	130



<b>CAPÍTULO VIII.....</b>	<b>131</b>
<b>DISCUSIÓN FINAL.....</b>	<b>131</b>
<b>CAPÍTULO IX.....</b>	<b>134</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>134</b>
<b>PRODUCTOS .....</b>	<b>135</b>
<b>ARTÍCULOS .....</b>	<b>135</b>
<b>CONGRESOS Y TALLERES .....</b>	<b>135</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>136</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Etapas de la Digestión Anaerobia (Gujer y Zehnder, 1983) .....	20
<b>Figura 2.</b> Proceso de $\beta$ -oxidación inversa con etanol como donador de electrones modificada de González-Cabaleiro et al., 2013.....	26
<b>Figura 3.</b> Vías de conversión con lactato como donador de electrones, modificada de Kucek et al., 2016a.....	27
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de ACCM disociado o no disociado en función del pH. ....	34
<b>Figura 5.</b> Extracción en línea a través de un sistema de extracción líquido-líquido a base de membrana, para recuperar continuamente ACCM hidrofóbicos, no disociados de un flujo de caldo del biorreactor a través del contactor de membrana hacia adelante (A). Después de la recuperación intermedia en un disolvente de aceite mineral, los ACCM se transfieren a través de un segundo contactor de membrana hacia atrás (B), a una solución de extracción alcalina, modificada de Xu et al., 2015.....	39
<b>Figura 6.</b> Metodología general dividida en 5 etapas principales .....	42
<b>Figura 7.</b> Consumo de etanol y ácido acético en función del tiempo para los diferentes inóculos analizados. (A) efluente de vino tinto; (B) efluente de vino blanco; (C) lodo granular anaerobio; (D) digestato acidogénico y (E) fluido ruminal.....	56
<b>Figura 8.</b> Producción de ACCM en función del tiempo para los diferentes inóculos probados. (A) efluente de vino tinto; (B) efluente de vino blanco; (C) lodo granular anaerobio; (D) digestato acidogénico y (E) fluido ruminal. ....	58
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de los metabolitos cuantificados (como DQO) a los 22 días para cada uno de los inóculos utilizados.....	61
<b>Figura 10.</b> Caracterización microbiana de los diferentes microbiomas probados (nivel de clase) para las comunidades bacterianas: A) Inóculo inicial; B) estado final después de la fermentación (día 22).....	65
<b>Figura 11.</b> Producción de ACCM utilizando diferentes relaciones de inóculos.....	71
<b>Figura 12.</b> Cultivos control para la producción de ACCM .....	73
<b>Figura 13.</b> Ajuste del modelo de Gompertz modificado a la producción de ácido hexanoico utilizando cultivos bioaumentados en diferentes relaciones.....	76
<b>Figura 14.</b> Ajuste del modelo de Gompertz modificado a la producción de ácido octanoico utilizando cultivos bioaumentados en diferentes relaciones.....	78
<b>Figura 15.</b> Caracterización microbiana de las diferentes relaciones de microbiomas probados (nivel de género): A) Inóculo inicial; B) estado final después de la fermentación (día 26). 81	
<b>Figura 16.</b> Tasas netas de producción y consumo durante la fermentación por lotes bajo las diferentes condiciones de pH y temperatura estudiadas: (A) 30 °C; (B) 35 °C; 40 °C. Los valores negativos indican el consumo de sustrato, mientras que los valores positivos indican la formación de productos .....	92
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de los metabolitos cuantificados (como DQO) después de 31 días para cada una de las condiciones estudiadas. ....	99

<b>Figura 18.</b> Abundancias relativas de los géneros más abundantes en todas las muestras .	101
<b>Figura 19.</b> Diagrama de Spearman para las 10 correlaciones más significativas.....	103
<b>Figura 20.</b> Esquema de extracción reactiva de ácido carboxílico de solución acuosa (modificada de Djas y Henczka, 2018) .....	107
<b>Figura 21.</b> Reactor acidogénico operado en lotes.....	109
<b>Figura 22.</b> Producción de ACCM durante la fermentación por lotes. ....	117
<b>Figura 23.</b> Consumo de sustrato durante la fermentación por lotes. ....	118
<b>Figura 24.</b> Porcentaje de los metabolitos cuantificados (como DQO) para cada uno de los lotes.....	121
<b>Figura 25.</b> Porcentajes de extracción de ACCM utilizando diferentes concentraciones de extractor. ....	123
<b>Figura 26.</b> Porcentajes de extracción obtenidas durante el primer lote. ....	124
<b>Figura 27.</b> Biomasa adherida a los soportes utilizados durante la experimentación por lotes .....	125
<b>Figura 28.</b> Abundancias relativas de la comunidad microbiana a nivel género para cada lote estudiado.....	129
<b>Figura 29.</b> Productividad máxima alcanzada en cada etapa durante el presente trabajo de investigación. Etapa1: pH 5.5, T 37 °C; Etapa 2: pH 5.5, T 37 °C, Etapa 3: pH 6, T 35 °C; Etapa 4: pH 6, T 35 °C. ....	131

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Aplicaciones comerciales/industriales y precios indicativos de mercado de ácidos carboxílicos.....	24
<b>Tabla 2.</b> Cultivos axénicos productores ACCM.....	29
<b>Tabla 3.</b> Producción de ACCM empleando sustratos reales.....	32
<b>Tabla 4.</b> Componentes de la curva de calibración utilizada en la determinación de AGVV .....	46
<b>Tabla 5.</b> Valores promedio y desviación estándar (DE) para la concentración máxima de ácido carboxílico y las tasas de formación volumétrica y específica para cada inóculo probado. ....	62
<b>Tabla 6.</b> Caracterización fisicoquímica de los inóculos utilizados en la producción de ACCM .....	70
<b>Tabla 7.</b> Tasa de producción y rendimiento de ACCM (C6 y C8) reportado por diversos autores utilizando bioaumentación .....	75
<b>Tabla 8.</b> Producción de ácido hexanoico calculada usando una ecuación de Gompertz modificada .....	76
<b>Tabla 9.</b> Producción de ácido octanoico calculada usando una ecuación de Gompertz modificada .....	77
<b>Tabla 10.</b> Variables y niveles del diseño experimental utilizado .....	86
<b>Tabla 11.</b> Valores promedio y desviación estándar (DE) para la concentración máxima de ácido carboxílico y tasas de formación volumétrica y específica para cada condición dada. ....	95
<b>Tabla 11.</b> Valores promedio y desviación estándar (DE) para la concentración máxima de ácido carboxílico y tasas de formación volumétrica y específica para cada condición dada, continuación.....	96
<b>Tabla 11.</b> Valores promedio y desviación estándar (DE) para la concentración máxima de ácido carboxílico y tasas de formación volumétrica y específica para cada condición dada, continuación.....	97
<b>Tabla 12.</b> Valores promedio y desviación estándar (DE) para la concentración máxima de ácido carboxílico y tasas de formación volumétrica y específica para cada lote. ....	120

## RESUMEN

Los efluentes vitivinícolas contienen altas concentraciones de etanol y materia orgánica. Son sustratos ideales para la producción de ácidos carboxílicos de cadena media (ACCM) a través de la plataforma del carboxilato a partir de la elongación de la cadena en donde el etanol puede ser utilizado por los microorganismos como fuente de carbono para producir estos ácidos. Sin embargo, en el proceso aún existen diversas incógnitas relacionadas al efecto de los parámetros operacionales sobre el rendimiento del proceso y el comportamiento microbiano cuando se utilizan sustratos reales y cultivos mixtos como inóculo. Por lo que el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre la producción de ácidos carboxílicos de cadena media utilizando efluentes vitivinícolas como sustrato y la selección de un cultivo mixto de microorganismos como inóculo. La experimentación se dividió en 4 etapas. En la primera etapa se evaluó el desempeño de 5 cultivos mixtos para producción de ACCM utilizando un medio sintético. Se encontró que con la microbiota nativa presente en los efluentes vitivinícolas se obtuvo la mayor concentración de ácido hexanoico (C6) de 5.8 g/L. El inóculo obtenido a partir del fluido ruminal resultó más versátil al generar ácidos carboxílicos de cadena más larga, como los ácidos heptanoico (C7) y octanoico (C8). Debido al buen desempeño de los inóculos ruminal y el nativo de efluentes vitivinícolas, en la segunda etapa se evaluó la producción de ACCM utilizando un consorcio nativo de efluentes vitivinícolas enriquecido con microorganismos ruminales en tres proporciones diferentes (20/80, 50/50 y 80/20 de rumen/microorganismos endógenos de efluentes vitivinícolas) teniendo como sustrato efluentes vitivinícolas. Los resultados en esta etapa mostraron que una proporción minoritaria de microorganismos ruminales (20%) y un 80% de nativos de efluentes vitivinícolas permite la generación de ácido octanoico de hasta 19.91 g/L manteniendo concentraciones competitivas de ácido hexanoico (12.4 g/L) y productividades de hasta 565 mg/L-d. En la tercera etapa, una vez seleccionado el inóculo, se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre la producción de ACCM sin extracción de ácidos del medio en botellas serológicas. La mayor productividad de ácido hexanoico y octanoico se obtuvo bajo condiciones de pH 6 y 35 °C. Además, se observó que aunque la presencia de Clostridiales es esencial para la formación de ACCM, la temperatura y en mayor medida el pH son los factores que

influyen la selección de los microorganismos y, en consecuencia, la ruta metabólica que se llevará a cabo.

En la cuarta y quinta etapas experimentales se evaluó la producción de ACCM utilizando efluentes vitivinícolas como sustrato e inóculo y su subsecuente extracción in-situ en un sistema operado como lecho móvil y por lotes. El proceso anaerobio consistió en un SBR acidogénico con un volumen de trabajo de 3 L con 0.75 L de anillos de poliuretano que se utilizaron como material de soporte para la inmovilización de biomasa. La temperatura de operación se mantuvo constante en  $35 \pm 1$  °C. El pH se mantuvo en  $6.0 \pm 0.01$  usando un controlador de pH y una velocidad de mezclado de 300 rpm. El funcionamiento por lotes permitió mantener estable la producción de ACCM, alcanzando producciones de hasta 7.2 g/L de ácido hexanoico. En cuanto a la influencia de la separación de los ACCM del medio, la cual realizaba una vez alcanzada una concentración de 6-8 g/L de C6 en el reactor, dejando sedimentar la biomasa para retirar el sobrenadante y posteriormente en agitación tomar una muestra homogénea de la cual se extraían mediante separación líquido-líquido. Se encontró que la oportuna separación de dichos ácidos permite triplicar la productividad de 206 a 728 mg C6/L-d y que el pH juega un papel determinante debido a la alta sensibilidad de los microorganismos a ligeras variaciones de pH (0.5 unidades). Se identificaron además géneros productores de ACCM resistentes a pH ácidos (menores de 6 pero mayores a 5.6) como *Caproiciproducens* y *Bacteroides*. También fue posible observar la robustez del inóculo generado en esta investigación el cual fue capaz de mantenerse y recuperarse de condiciones poco favorables sin pérdida de gremios funcionales importantes para la producción de ácido hexanoico, sin embargo para una producción estable y eficiente de ácido hexanoico es fundamental un control estricto de pH y una proporción mayoritaria de géneros pertenecientes a la clase Clostridia.

## ABSTRACT

Winery effluents that contain high concentrations of ethanol and diverse organic matter are ideal substrates to produce medium-chain carboxylic acids (MCCA) through the carboxylate platform through chain elongation, where microorganisms can use ethanol as a carbon source to produce these acids. However, in the process, there are still several questions related to the effect of the operational parameters on the performance of the process and the microbial behavior when real substrates and mixed cultures are used. Therefore, the objective of this research work was to evaluate the effect of operational parameters (pH and temperature) on the production of medium-chain carboxylic acids using wine effluents as a substrate and a mixed culture as an inoculum. The experimentation was divided into five stages. In the first stage, the performance of 5 mixed cultures to produce MCCA was evaluated using a synthetic medium in serological bottles. The native microbiota present in the winery effluents was found to have the highest concentration of hexanoic acid (C6) (5.8 g/L). However, the ruminal fluid inoculum was more versatile by generating longer chain carboxylic acids, such as heptanoic (C7) and octanoic (C8). Due to the excellent performance of the ruminal and native inocula of winery effluents, in the second stage, the production of MCCA was evaluated using winery effluents as substrate and a native consortium of these winery effluents enriched with ruminal microorganisms in three different proportions (20/80, 50/50, and 80/20% ruminal fluid/ endogenous microorganisms of winery effluents). The results in this stage showed that a minority proportion of ruminal microorganisms (20%) and 80% of native microorganisms of winery effluents allows the generation of octanoic acid up to 1.91 g/L maintaining competitive concentrations of hexanoic acid (12.4 g/L) and productivities of up to 565 mg/L-d. In the third stage, once the inoculum was selected, the effect of pH and temperature on the production of MCCA without extraction of acids from the medium was evaluated. The highest productivity of hexanoic and octanoic acid was obtained under pH 6 and 35 °C. In addition, it was observed that although the presence of the Clostridial class is essential for the formation of MCCA is, the temperature and, to a greater extent, the pH the main factors that influence the selection of microorganisms and, in consequence, the metabolic pathway that will take place. In the fourth and five experimental stages, the production of MCCA was evaluated using winery effluents as substrate and inoculum and its subsequent extraction in-situ in a system operated as a moving bed and in batches.

The anaerobic process consisted of an acidogenic SBR with a working volume of 3 L with 0.75 L of polyurethane rings used as support material for biomass immobilization. The operation temperature was kept constant at  $35 \pm 1$  °C. The pH was maintained at  $6.0 \pm 0.01$  by using a pH controller. The batch operation allowed MCCA to be kept stable, reaching productions of up to 7.2 g/L of hexanoic acid. It was also found that the timely separation of these acids allowed for tripling the productivity from 206 to 728 mg C6/L-d and that the pH plays a determining role due to the high sensitivity of microorganisms to slight pH variations. In addition, MCCA-producing genera resistant to acid pH (less than 6 but greater than 5.6) were identified, such as *Caproiciproducens* and *Bacteroides*. It was also possible to observe the robustness of the inoculum generated in this research, which was able to maintain and recover from unfavorable conditions (acidic conditions and no temperature control) without loss of critical functional guilds to produce hexanoic acid; however, for stable and efficient production of hexanoic acid is essential a majority proportion of genera belonging to the Clostridia class and strict pH control.



## INTRODUCCIÓN

Una plataforma de interés para la producción de compuestos químicos renovables y que se ha comenzado a estudiar más a fondo, es la producción de ácidos carboxílicos de cadena media (ACCM) (Angenent *et al.*, 2016). Estos ácidos se producen en un proceso de digestión anaerobia bajo condiciones particulares. Por ejemplo, cuando se agrega un compuesto reducido como el etanol al medio y se inhibe la metanogénesis (reduciendo el valor del pH a valores de 5.5-6), cierto tipo de bacterias fermentativas tienen la habilidad de convertir los ácidos carboxílicos de cadena corta (ACCC) formados en la etapa acidogénica (acetato y butirato) a ácidos carboxílicos de cadena media como ácido hexanoico (C6) o ácido octanoico (C8). Estos ácidos de cadena media poseen un alto valor agregado de hasta 10 veces más que el etanol (de Araujo Cavalcante *et al.*, 2017) y hasta 5 veces más que el metano (Kleerebezem *et al.*, 2015). Al proceso de conversión de ácidos de cadena corta a ácidos de cadena media se le conoce como elongación de cadena y se lleva a cabo a través de la vía de la  $\beta$ -oxidación inversa (BOI) del ácido acético o butírico.

La tasa anual de crecimiento nacional de producción de vino en México desde hace algunos años se encuentra entre 10 y 15% (Consejo Mexicano Vitivinícola (CMV), 2018). Dentro de esta producción de vino, Querétaro ocupa el tercer lugar después de Baja California y Coahuila con una producción de 1.5 millones de L de vino anuales. En consecuencia, se producen grandes volúmenes de efluentes vitivinícolas lo cual genera grandes desafíos para su tratamiento debido a la alta carga orgánica que poseen. Sin embargo, estos efluentes podrían ser sustratos ideales para la producción de ácidos carboxílicos de cadena media debido a su contenido de etanol y acetato, compuestos que son necesarios para que la elongación de cadena se lleve a cabo.

Es de particular importancia señalar que los efluentes vitivinícolas presentan un microbioma bacteriano nativo que se encuentra adaptado a altas concentraciones de etanol. Lo anterior es de particular importancia pues estos microorganismos pueden ser un inóculo idóneo para la producción de ácidos carboxílicos de cadenas más largas como el ácido nonanoico (C9) o el ácido decanoico (C10), donde altas concentraciones de etanol son requeridas. Lo anterior es una gran ventaja sobre el uso de cultivos mixtos endógenos de ensilado, lodos activados, residuos sólidos municipales e incluso cepas puras no ha sido exitoso debido a la inhibición

de los microorganismos por concentraciones mayores a 18 g/L de etanol (Yin *et al.*, 2017; Grootscholten *et al.*, 2014; Weimer y Stevenson, 2012; Wu *et al.*, 2018).

Desde un punto de vista de proceso es importante mencionar que la acumulación de los ACCM en el medio biótico tiene un efecto tóxico sobre los microorganismos. Por ello, su separación oportuna resulta de crucial importancia para un proceso viable (Angenent *et al.*, 2016).

Desde un punto de vista de biorrefinería, para favorecer el proceso de producción de ACCM y el tratamiento del efluente vitivinícola, se puede aplicar un proceso anaerobio en dos etapas. En la primera etapa (acidogénica) se producen los ácidos carboxílicos de cadena corta como el acetato y que en presencia del etanol se transforman en ACCM. En la segunda etapa (metanogénica), una vez separado el compuesto de interés, el efluente se pasa a un proceso metanogénico para la producción de biogás y disminución de la materia orgánica contaminante.

Esta tesis tiene como objeto contribuir al entendimiento de las condiciones operacionales y microbiológicas que afectan a la producción de los ácidos carboxílicos de cadena media utilizando un efluente real como sustrato como lo es el efluente vitivinícola y seleccionar un cultivo mixto idóneo para este sustrato como inóculo. En el primer capítulo se detallan los antecedentes relacionados con la importancia de los ACCM, así como los factores que influyen en su producción y los avances a la fecha. En el segundo capítulo se describen los objetivos generales y particulares planteados en el presente trabajo. En el capítulo 3, se detallan los materiales y métodos utilizados durante toda la experimentación del presente trabajo. En el capítulo 4, se evaluó el desempeño de 5 cultivos mixtos para producción de ACCM utilizando un medio sintético y debido al buen desempeño de los inóculos ruminal y el nativo de efluentes vitivinícolas, en el capítulo 5 se evaluó la producción de ACCM utilizando un consorcio nativo de efluentes vitivinícolas enriquecido con microorganismos ruminales en tres proporciones diferentes (20/80, 50/50 y 80/20% rumen/nativos de efluentes vitivinícolas) teniendo como sustrato efluentes vitivinícolas en botellas serológicas.

Una vez seleccionado el inóculo, en el capítulo 6 se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre la producción de ACCM sin extracción de ácidos. La última etapa experimental se describe en el capítulo 7, en donde se evaluó la producción de ACCM utilizando efluentes vitivinícolas como sustrato y su subsecuente extracción in-situ en un sistema operado como lecho móvil y por lotes bajo todas las mejores condiciones halladas en las etapas anteriores. En cada etapa se estudió la dinámica poblacional durante la producción de ACCM. En los capítulos 8 y 9 se muestra una discusión final de la evolución de cada etapa experimental en cuanto a la mejora de la producción de ACCM y se resaltan las conclusiones generales obtenidas del presente trabajo experimental. Finalmente, se muestran los productos obtenidos de este trabajo de investigación.

# CAPÍTULO I

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 3.1 Efluentes vitivinícolas

En el 2021 la Organización Internacional de la Viña y el Vino reportó una producción de vino en México de 39.6 millones de litros en estados como Baja California, Coahuila, Querétaro, Chihuahua, Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas, San Luis Potosí, Puebla, Sonora y Nuevo León (IOVW,2021).

Sin embargo, por cada litro de vino producido se generan de 0.2-4 L de efluentes, que plantearían riesgos ecológicos si son descargados sin ser tratados previamente debido a su alto contenido de moléculas orgánicas complejas y altas concentraciones de etanol (hasta 120 g/L) resultando en una considerable demanda química de oxígeno (hasta 250 g DQO/L).

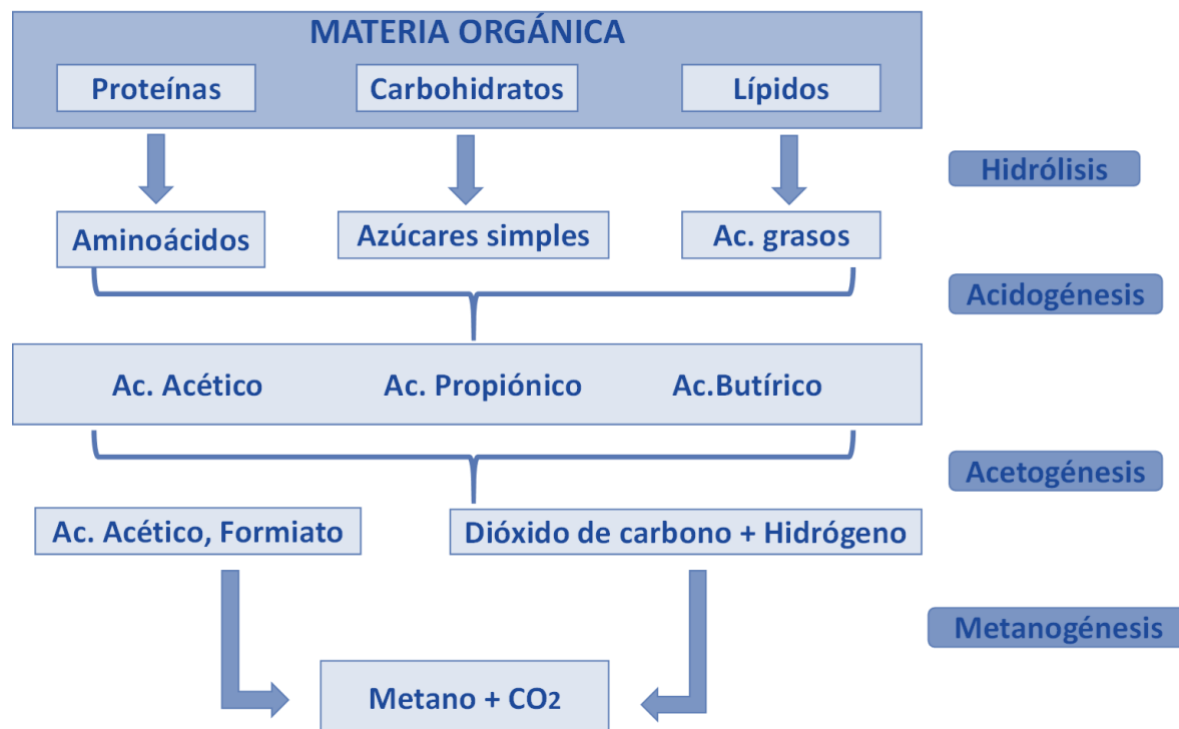
La destilación, que es el método principal para extraer el etanol residual, es uno de los pasos con mayor requerimiento energético, mostrando que incluso para las plataformas de bioprocesamiento existentes, la extracción y separación de este producto sigue siendo una problemática (Xu *et al.*, 2015).

Por otro lado, estas mismas cualidades convierten a los efluentes vitivinícolas en sustratos prometedores para la producción de combustibles y productos químicos sostenibles a través del proceso de elongación de cadena (Agler *et al.*, 2011; Angenent *et al.*, 2016) en donde el etanol residual presente puede ser utilizado como donador de electrones para la producción de ácidos carboxílicos de cadena media.

### 1.2 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia (DA) es un proceso biológico complejo que involucra varios grupos de microorganismos, tanto estrictamente anaerobios como facultativos, que, a través de una serie de etapas y en ausencia de oxígeno, degradan la materia orgánica compleja para producir biogás, conformado principalmente por metano (60-80%) y dióxido de carbono (40-20%), el cual puede ser utilizado como combustible para generar energía térmica y/o eléctrica (Amaya *et al.*, 2013).

El proceso de Digestión anaerobia puede ser descrito en 4 etapas como se muestra en la Figura 1, en donde en cada una de ellas intervienen diferentes grupos de microorganismos (Gujer y Zehnder, 1983; Chen *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Etapas de la Digestión Anaerobia (Gujer y Zehnder, 1983)

### (1) Hidrólisis

En la primera etapa, los compuestos orgánicos complejos (polímeros orgánicos) son degradados a moléculas más pequeñas solubles biodegradables. El proceso requiere la acción de enzimas extracelulares como amilasas y proteasas que son excretadas por bacterias hidrolíticas-fermentativas. Las proteínas se degradan a aminoácidos, los carbohidratos se transforman en azúcares solubles (mono y disacáridos) y los lípidos son convertidos en ácidos carboxílicos de cadena larga y glicerol (Kucek *et al.*, 2016).

### (2) Acidogénesis

Los compuestos disueltos, generados en la etapa de hidrólisis, son absorbidos y metabolizados por bacterias fermentativas para ser transformados en ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato), H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y en menor medida alcoholes.

La fermentación es realizada por un grupo diverso de bacterias hidrolíticas-acidogénicas como *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, la mayoría de las cuales son anaerobias estrictas. Sin embargo, algunas como las enterobacterias son facultativas (Lin y Chen, 1999).

### (3) Acetogénesis

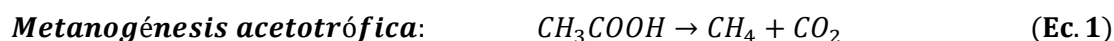
En esta etapa los productos de la acidogénesis se convierten en los precursores finales para la generación de metano: acetato, hidrógeno y dióxido de carbono como se indica en la Figura 1.

Como ejemplos de bacterias acetogénicas se identifican *Syntrophobacter wolinii*, que descompone el ácido propiónico, o *Syntrophomonas wolfei* que descompone el ácido butírico. Los ácidos valérico y butírico son descompuestos por las mismas especies. Las bacterias homoacetogénicas son microorganismos anaerobios estrictos los cuales catalizan la formación de acetato a partir de hidrogeno ( $H_2$ ) y dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Dentro de los géneros más sobresalientes de las bacterias homoacetogénicas se encuentran *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum* y *Acetobacterium woodii* (Díaz-Báez, 2002).

### (4) Metanogénesis

La etapa final consiste en la producción de metano a partir de acetato o hidrógeno y dióxido de carbono (Angenent *et al.*, 2004).

Se distinguen dos tipos principales de microorganismos: los que transforman el ácido acético produciendo metano y dióxido de carbono, (arqueas acetoclásticas) Ec.1, y los que a partir de la reducción de dióxido de carbono por el hidrógeno resultante de etapas anteriores generan metano y agua, (arqueas hidrogenotróficas) Ec.2.



La principal vía de formación del metano es la vía acetoclástica, con alrededor del 70% del metano producido de forma general. A pesar de ser esta vía la más importante, solo microorganismos de los géneros *Methanosarcina* y *Methanotherix* son capaces de producir metano a partir de ácido acético. Los géneros principales dentro de la vía de los

hidrogenotróficos son: *Methanobacterium*, *Methanococos*, *Methanobrevibacter* o *Methanogenium*, entre otros (Lin y Chen, 1999).

### **1.3 Ácidos carboxílicos de cadena media**

Los ácidos carboxílicos de cadena media (ACCM), son ácidos grasos saturados conteniendo entre 6 y 12 átomos de carbono, incluyendo un grupo carboxílico, que generalmente se producen a partir de fuentes fósiles mediante procesos químicos (Liu y Jarboe, 2012), o se extraen de aceites naturales como coco y palma (Shahid, 2005). Tienen gran potencial para ser extraídos del agua debido a su solubilidad relativamente baja cuando están en su forma ácida no disociada.

A pH bajos (alrededor de su pKa, 4.8) pueden formar aceites que espontáneamente se separan del agua (Buktus *et al.*, 2011), ventaja sobre la recuperación de etanol que requiere de una alta demanda de energía para el proceso de destilación. Además estos productos químicos que se producen como intermedios en el proceso de digestión anaerobia, principalmente durante la acidogénesis, son más valiosos que el metano generado al final del proceso de DA (Kleerebezem *et al.*, 2015).

#### **1.3.1 Ácido hexanoico**

El ácido hexanoico también conocido como caproico es un ácido carboxílico de cadena media conformado por seis carbonos, tiene una consistencia líquida aceitosa, incoloro con un olor acre (Jeon *et al.*, 2013). Existen diversas aplicaciones de este ácido tales como: agente antimicrobiano en la industria farmacéutica, aditivo en la alimentación animal, perfumes, lubricantes, saborizantes de tabaco, caucho, tintes y reactivo en la industria química (Cheon *et al.*, 2014).

El ácido hexanoico también es utilizado como un precursor para la biosíntesis de ésteres hexílicos, que se pueden convertir en hexanol por reacción de esterificación e hidrogenación, el cual es un combustible con mayor poder calorífico que el etanol (Verser y Park, 2012).

#### **1.3.2 Ácido Heptanoico**

El ácido heptanoico (o enantato), es un ácido carboxílico saturado con siete átomos de carbono, es un componente bioquímico producido comercialmente con aplicaciones versátiles incluyendo producción de biodiesel, antimicrobianos y producción de bioplásticos

(Liebergesell *et al.*, 1991). Actualmente, se deriva principalmente de la oxidación del heptaldehído, que se puede obtener después de la pirólisis del aceite de ricino.

Sin embargo, la producción de ácido heptanoico a partir de aceite de ricino tiene algunas desventajas. Primero, la producción de aceite de ricino en sí es ineficiente, solo las semillas de las plantas se usan para la producción de aceite de ricino en lugar de la planta completa. En segundo lugar, la mayor parte de la producción de aceite de ricino se encuentra actualmente en India, China, Brasil y Tailandia. Conduciendo a precios altos debido a la falta de competencia. Finalmente, solo se puede transformar el 25% del aceite de la semilla de ricino en heptanoato (Grootscholten *et al.*, 2013). Por lo que la elongación de cadena como proceso alternativo de producción de ácido heptanoico podría evitar estas desventajas.

### **1.3.3 Ácido octanoico**

En general, los productos de cadenas de carbono más largas tienen un mayor valor biotecnológico y comercial debido a su mayor contenido de energía y su menor solubilidad en agua, es por ello por lo que el ácido octanoico o caprílico (ACCM conformado por 8 átomos de carbono) es de los productos más atractivos de la plataforma de carboxilato (Steinbusch *et al.*, 2011).

Las aplicaciones en las que puede ser utilizado este ACCM son: como agente antimicrobiano en la reducción del uso de antibióticos en la agricultura (Desbois, 2012); como intermediario para la elaboración de fragancias y saborizantes (Kenealy *et al.*, 1995), como precursor renovable para diésel (Levy *et al.*, 1983) y combustibles de aviación (Harvey y Meylemans, 2014).

La amplia aplicación que tienen estos ácidos, en combinación con el gran aumento en los costos de las materias primas derivadas del petróleo junto con los crecientes aumentos de los costos de energía y transporte, han aumentado los costos comerciales y el valor de los ACCM (Tabla 1).



**Tabla 1.** Aplicaciones comerciales/industriales y precios indicativos de mercado de ácidos carboxílicos

Ácido carboxílico	Aplicación	Precio por tonelada (USD, \$)
Ac. Propiónico	Aditivo alimentario para animales y humanos, producto químico intermedio, disolvente, agente aromatizante (Zacharof, <i>et al.</i> , 2013)	1350-1490 (Ganigué <i>et al.</i> , 2019)
Ac. Butírico	Los ésteres se utilizan en la industria alimentaria como aditivos aromáticos, productos farmacéuticos, suplementos para piensos y aditivos para cebos de pesca.	1800-2250 (Moscoviz <i>et al.</i> , 2018)
Ac. Valérico	Agente saborizante y de fragancia, plastificante y combustible para transporte	2160-2700 (Ganigué <i>et al.</i> , 2019)
Ac. Hexanoico	Alimentos para animales como promotores del crecimiento, fragancias, productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, antimicrobianos, lubricantes, cauchos y tintes, biocombustibles líquidos (Angenent <i>et al.</i> , 2016).	2000-3000 (De Groof <i>et al.</i> , 2019)
Ac. Heptanoico	Producción de biodiésel, antimicrobianos y producción de bioplásticos (Grootscholten <i>et al.</i> , 2013)	3000-4000 (Grootscholten <i>et al.</i> , 2013)
Ac. Octanoico	Agentes antimicrobianos en agricultura, productos intermedios para fragancias, sabores y precursores para diesel y combustible de aviación.	5000 (Kucek <i>et al.</i> , 2016)

## 1.4 Elongación de cadena

Al proceso de conversión de ACCC a ACCM se le conoce como elongación de cadena y se lleva a cabo mediante un proceso denominado  $\beta$ -oxidación inversa.

### 1.4.1 $\beta$ -oxidación inversa (BOI)

La  $\beta$ -oxidación inversa es un proceso cíclico en donde las bacterias usan etanol u otro donador de electrones (DE) como fuente de carbono, energía en forma de ATP y equivalentes reductores (NADH), para alargar la cadena de carbonos de los ácidos carboxílicos de cadena corta formados durante la acidogénesis en un proceso de digestión anaerobia (Weimer y Stevenson, 2012).

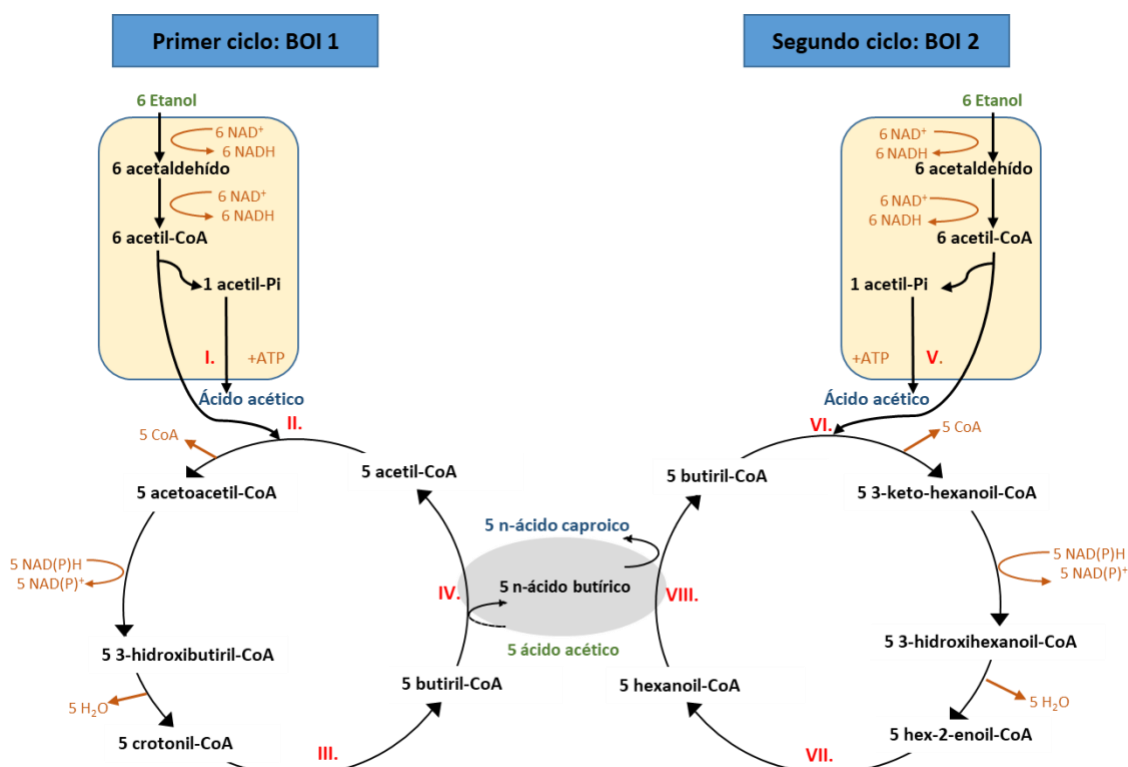
El proceso ocurre de manera secuencial en 2 etapas en donde en cada una de ellas, se añaden 2 carbonos al carboxilato (es decir, acetato (C2) a n-butirato (C4), n-butirato (C4) a n-caproato (C6), n-caproato (C6) a n-caprilato (C8), o bien propionato (C3) a n-valerato (C5), n-valerato (C5) a n-heptanoato (C7), etc.) (Grootscholten *et al.*, 2013).

Hasta ahora, el etanol y el lactato han sido identificados como los DE más adecuados para inducir el proceso de elongación de cadena (Cavalcante *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2015). Para ambos procesos de elongación, las diferencias radican principalmente en el primer paso de la oxidación del DE (etanol o lactato), mientras que las vías metabólicas en el segundo paso de la BOI cíclica son similares.

Cuando se usa etanol como DE, la elongación comienza con la oxidación de etanol a acetaldehído y luego a acetil-CoA catalizada por la etanol-deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa, respectivamente. El alargamiento de cadena usando etanol como DE (Figura 2), puede ser descrito de manera breve en tres pasos. En el primer paso, parte del etanol (1:6 de los moles) se convierte en ácido acético para generar energía inicial en forma de ATP. En el segundo paso el etanol restante se convierte en acetil-CoA, lo que promueve el alargamiento de la cadena del ácido acético a ácido n-butírico en una ruta cíclica utilizando CoA, NADH y FADH<sub>2</sub> para el acoplamiento de acetil-CoA a butiril-CoA.

Finalmente, el acetil-CoA también se usa en el alargamiento de la cadena del ácido butírico a ácido hexanoico en un ciclo similar acoplando butiril-CoA a hexanoil-CoA (Haynes, 2013).

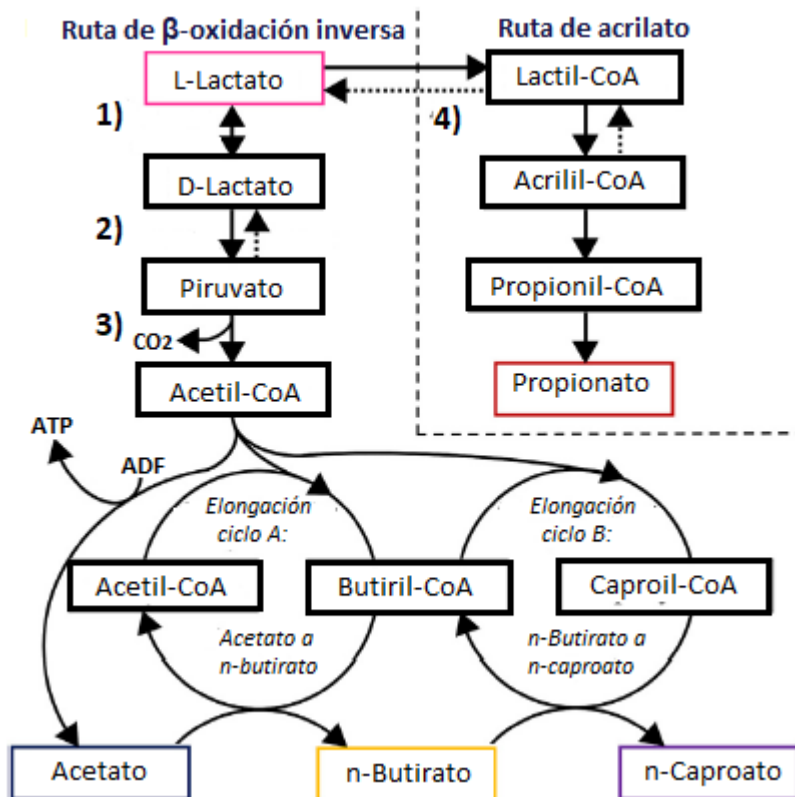
También ocurre una reacción similar en el segundo ciclo durante la formación de ácido hexanoico, cuando la 5-hex-2-enoil-CoA se convierte en hexanoil-CoA con la reducción de ferredoxina (Fd) por NADH. Del mismo modo, la hexano-2-enoil-CoA se reduce a hexanoil-CoA por la hexanoil-CoA deshidrogenasa en el ciclo de formación del ácido hexanoico (Spirito *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Proceso de  $\beta$ -oxidación inversa con etanol como donador de electrones modificada de González-Cabaleiro *et al.*, 2013.

Cuando se usa lactato como DE (Figura 3), primero se oxida a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa. Luego, el piruvato se oxida a acetil-CoA junto con una liberación equimolar de  $\text{CO}_2$  y ATP. Al igual que con el uso de etanol como DE, parte de la acetil-CoA también se convierte en acetato por fosforilación a nivel de sustrato.

El acetil-CoA producido por la oxidación de lactato entra al ciclo de  $\beta$ -oxidación inversa al reaccionar con otro acetil-CoA, como se describió anteriormente, para alargar el acetato en butirato y luego a hexanoico (Wu *et al.*, 2019).



**Figura 3.** Vías de conversión con lactato como donador de electrones, modificada de Kucek *et al.*, 2016a

Aunque el lactato conlleva a rutas metabólicas similares a las del etanol durante el proceso de elongación de cadena, el uso de lactato tiene como desventaja la existencia de una ruta competitiva de acrilato, en la que el lactato (cuando se encuentra en concentraciones muy bajas) se transforma en propionato, resultando en una selectividad reducida para la producción de ACCM. Además, la ruta del acrilato es irreversible, es decir, una vez que el lactato ingresa a la ruta del acrilato, no puede volver a la ruta de  $\beta$ -oxidación inversa (Kucek *et al.*, 2016a).

## **1.5 Microorganismos productores de ACCM**

Los estudios realizados de elongación de cadena, incluida la investigación del mecanismo y el comportamiento de cepas específicas, se han realizado con cultivos axénicos, ya que es conveniente controlar los parámetros óptimos del proceso para cepas bacterianas específicas. Sin embargo, debido a que la utilización de un cultivo puro requiere una esterilización y sustratos de alta pureza, limita los tipos de materia prima disponibles, complica la operación y va en contra de la producción a gran escala (Agler *et al.*, 2012). En los últimos años, la producción de ACCM está más inclinada a realizarse con cultivos mixtos anaerobios.

### ***1.5.1 Cultivos axénicos***

Los primeros estudios sobre el proceso biológico de alargamiento de la cadena de los ácidos carboxílicos de cadena corta han sido detallados por Barker y Taha (1942). En donde trabajaron con un cultivo puro de *Clostridium kluyveri* para producir ácido n-butírico y n-hexanoico, utilizando un medio sintético que contenía ácido acético y etanol.

*Clostridium kluyveri* es una bacteria anaerobia que se encuentra presente en algunos desechos biológicos, y es actualmente el microorganismo más utilizado para la obtención de ACCM debido a su capacidad de utilizar etanol y ácidos carboxílicos de cadena corta bajo condiciones controladas de pH y temperatura para su propio metabolismo energético (Bornstein y Barker, 1947; Thauer *et al.*, 1967).

En la Tabla 2, se muestran diversas cepas que han sido aisladas y caracterizadas capaces de llevar a cabo el proceso de elongación de cadena a través de la BOI para producir ACCM además de los cultivos puros con *C. kluyveri*.

**Tabla 2.** Cultivos axénicos productores ACCM

	<i>Clostridium kluyveri</i>	<i>Clostridium kluyveri</i>	<i>Eubacterium pyruvatorans</i>	<i>Clostridium sp.BS-1</i>	<i>Eubacterium limosum</i>	<i>Megasphaera elsdeni</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<b>Phylum y clase</b>	Firmicutes Clostridia	Firmicutes Clostridia	Firmicutes Clostridia	Firmicutes Clostridia	Firmicutes Clostridia	Firmicutes Clostridia	Proteobacteria Alpha-proteobacteria
<b>Origen</b>	Lodo residual	Ensilado	Rumen de oveja	Lodo de digestor anaerobio	Rumen de oveja	Rumen de oveja	Agua de grifo
<b>Temperatura óptima (°C)</b>	34	39	39	37	39	38	37
<b>Donador de electrones</b>	Etanol	Etanol y n-propanol	Piruvato	D-galactitol	Metanol	Lactato	Piruvato
<b>ACCM formado</b>	n-caproato	n-caproato	n-caproato	n-caproato	n-caproato	n-caproato	n-caproato durante la fermentación oscura
<b>Referencia</b>	Barker y Taha, 1942	Weimer y Stevenson, 2012	Wallace <i>et al.</i> , 2004; Wallace <i>et al.</i> , 2003	Jeon <i>et al.</i> , 2010	<i>Genthner et al.</i> , 1981.	Elsden <i>et al.</i> , 2014	Gest, 1995

### 1.5.2 Microbiotas endógenas

El uso de consorcios nativos en lugar de cultivos puros en el proceso de elongación de cadena presenta diversas ventajas: 1) no es necesaria la adición de medios específicos de la especie; 2) es posible tratar diferentes sustratos complejos de residuos orgánicos (Agler *et al.*, 2011); 3) se evita el uso de cultivos puros como inóculo y, por lo tanto, de condiciones estériles; 4) es posible operar los bioprocesos en modo (semi)-continuo por varios años. Estas ventajas hacen que la conversión de desechos sea económicamente (Spirito *et al.*, 2014).

Además, se sabe que los cultivos abiertos tienen una mayor producción de metabolitos, un crecimiento bacteriano de alta diversidad e interacciones sintróficas entre microorganismos (Agler *et al.*, 2011).

Entre los cultivos nativos para la producción de ACCM más utilizados se encuentra el fluido ruminal, debido a su diversidad poblacional en la que se han identificado microorganismos como *Megasphaera elsdeni*, *Eubacterium limosum* y *Eubacterium pyruvativorans* los cuales son capaces de realizar el proceso de  $\beta$ -oxidación inversa (Dams *et al.*, 2018; Weimer y Kohn, 2016; Kenealy *et al.*, 1995). Weimer *et al.*, (2015), obtuvieron una producción máxima 6.1 g/L de ácido hexanoico utilizando microorganismos ruminales enriquecidos con *Clostridium kluyveri*.

El uso de lodo granular como inóculo también ha permitido la producción de hasta 8.17 g/L de ácido hexanoico, en donde la caracterización microbiana reveló que las poblaciones microbianas presentes en el lodo granular proveniente de un reactor biorreactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) de tratamiento de aguas residuales de cervecería eran estables y dominadas por el género de *Clostridium kluyveri* (Steinbusch *et al.*, 2011).

Otros cultivos nativos de digestatos anaerobios, lodos activados (Wu *et al.*, 2018) y residuos sólidos municipales (Grootscholten *et al.*, 2013) también han sido estudiados para la producción de ACCM. Entre los filos identificados en estos cultivos se encuentran *Proteobacterias*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Cloroflexi* y *Actinobacterias*. En donde las *Firmicutes* y *Bacteroidetes* han sido reportadas como productoras de ACCM por Kucek *et al.*, (2016).

Por otra parte, Cortéz-Cervantes (2019) estudió la producción de bio-hidrógeno en un reactor de filtro percolador (TBR), en el cual utilizó efluentes vitivinícolas para la colonización de los empaques, donde identificó principalmente la presencia de bacterias del género *Clostridium*. Como se ha mencionado, estos son los microorganismos más utilizados para la producción de ACCM. Por ello, el uso de un consorcio nativo de efluentes vitivinícolas podría ser efectivo para la producción de ACCM debido a la presencia de estos microorganismos en el efluente y su posible tolerancia a altas concentraciones de etanol.

## **1.6 Sustratos utilizados en la producción de ACCM**

### ***1.6.1 Compuestos químicos***

En la mayoría de los trabajos reportados para la producción de ACCM se han utilizado medios sintéticos que contienen etanol o lactato (ambos sustratos ideales para suministrar electrones en los ciclos de BOI durante el alargamiento de la cadena del ácido carboxílico) más acetato (Zhu *et al.*, 2015). Durante la elongación de la cadena del acetato usando etanol como donador de electrones, es posible formar cinco moles de ácido alargado (ácido n-butírico o n-hexanoico) con el consumo inicial de un mol de ATP (Buckel y Thauer, 2013).

La mayor ventaja de usar etanol para la producción de ácido n-hexanoico es la ganancia de energía de la formación del producto. De acuerdo con las reacciones termodinámicas, la energía contenida en un mol de ácido n-hexanoico (~3452 kJ) es mayor que la de dos moles de etanol (~2638 kJ) utilizada en la reacción de elongación de la cadena del ácido carboxílico con ácido acético (~840 kJ) (Steinbusch *et al.*, 2011).

### ***1.6.2 Sustratos reales***

El uso de biomasa residual como sustrato en la producción de ACCM ha sido estudiado debido al alto contenido de compuestos orgánicos biodegradables y nutrientes abundantes, que los convierte en materia prima prometedora para la producción de biocombustibles y/o compuestos de alto valor agregado (Agler *et al.*, 2012). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos reportados utilizando sustratos reales, la adición de un DE ha sido necesaria, generando así a un gasto económico adicional por la utilización de estos reactivos analíticos. En la Tabla 3, se muestran algunos de los trabajos realizados usando sustratos complejos para obtener ACCM.



**Tabla 3.** Producción de ACCM empleando sustratos reales

ACCM	Sustrato utilizado	Modo de operación y configuración	Condiciones	Referencia
Ácido hexanoico	Maíz fermentado	Biorreactor anaerobio discontinuo secuencial (ASBR).	Tasas de producción volumétrica de 2.0 y 3.5 g/(L·d); pH de 5.5.	Agler <i>et al.</i> , 2012; Ge <i>et al.</i> , 2015.
Ácido hexanoico	Trigo, sorgo y maíz	Reactor semicontinuo.	Tasas de producción volumétrica de 2.97 g/(L·d) en ensayos por lotes sin extracción en línea; pH de 5.2.	Zhu <i>et al.</i> , 2015.
Ácido octanoico y ácido hexanoico	Lías de vino	Biorreactor anaerobio de flujo ascendente (UASB). En semi-continuo	Tasas de producción volumétrica de 1.76 g/(L·d); pH de 5.2.	Kucek <i>et al.</i> , 2016.
Butirato y Ácido hexanoico	FORSU Etanol/Acetato	Biorreactor anaerobio de flujo ascendente (UASB).	Tasas de producción de 2.6 g/d para butirato y de 0.34 g/d para el ácido hexanoico. pH de 6.5.	Chen <i>et al.</i> , 2016.
Ácido hexanoico	Aguas residuales	Botellas serológicas. Operado en lotes	Tasas de producción de 8.42 g/L. Relación de etanol/acetato de 10:1 (550 mM de carbono total); pH de 7.5.	Yin <i>et al.</i> , 2017.

## 1.7 Factores que influyen en la obtención de ACCM

### 1.7.1 pH

El pH es uno de los parámetros de control más importantes en cualquier proceso microbiológico y siempre el pH interno de las células es ligeramente superior al pH del medio. De esta forma se mantiene la membrana energizada con los protones en el exterior y se puede generar una fuerza protón-motriz. Los daños que produce en la estabilidad celular las variaciones bruscas de pH son de dos tipos: 1) daño en la permeabilidad de la membrana plasmática que produce inhibición de la actividad enzimática y de los sistemas de transporte y 2) alteración del estado iónico de los solutos a transportar por variaciones bruscas de pH (Roghair *et al.*, 2018).

El rendimiento máximo de producción de ácido n-hexanoico se obtiene a un pH de alrededor de 7 (Cavalcante *et al.*, 2017). Sin embargo, esta condición favorece la competencia con los metanógenos acetoclásticos, particularmente cuando el etanol y el ácido acético son las únicas fuentes de carbono para el proceso de elongación de la cadena en un cultivo abierto. Por lo que para obtener buenas producciones de ACCM es importante inhibir las reacciones competitivas por sustrato durante la DA. Las estrategias que han sido utilizadas para inhibir estas rutas competitivas se basan en la adición de reactivos como: ácido 2-bromoetanosulfónico (2-BES) o el cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) que inhiben tanto los metanógenos acetoclásticos como hidrogenotróficos. Sin embargo, el alto costo y la dosificación de estos reactivos aumenta significativamente el costo de producción de ACCM (Steinbusch *et al.*, 2011). Por otro lado, la producción de ácido n-hexanoico también puede ocurrir a un pH más bajo (Vasudevan *et al.*, 2014). Con una disminución del pH de 7.0 a 5.5 los metanógenos acetoclásticos como *Methanosaeta spp.*, son completamente superados (Cavalcante *et al.*, 2017). Además, al operar el reactor en condiciones acidogénicas, la mayor parte de ACCM presentes en el medio están en forma no ionizada, lo que inhibe la mayoría de los metanógenos (Roghair *et al.*, 2018). Aunque los mecanismos relacionados con estos efectos nocivos no se comprenden completamente y dependen de la estructura del ácido y del microorganismo objetivo, los cambios en los procesos de transferencia de masa y electrones asociados a la membrana celular son probablemente los principales factores afectados (Candry *et al.*, 2020b). En la Figura 4 se muestran los diagramas de distribución de los principales ACCM obtenidos en el proceso de elongación de cadena.

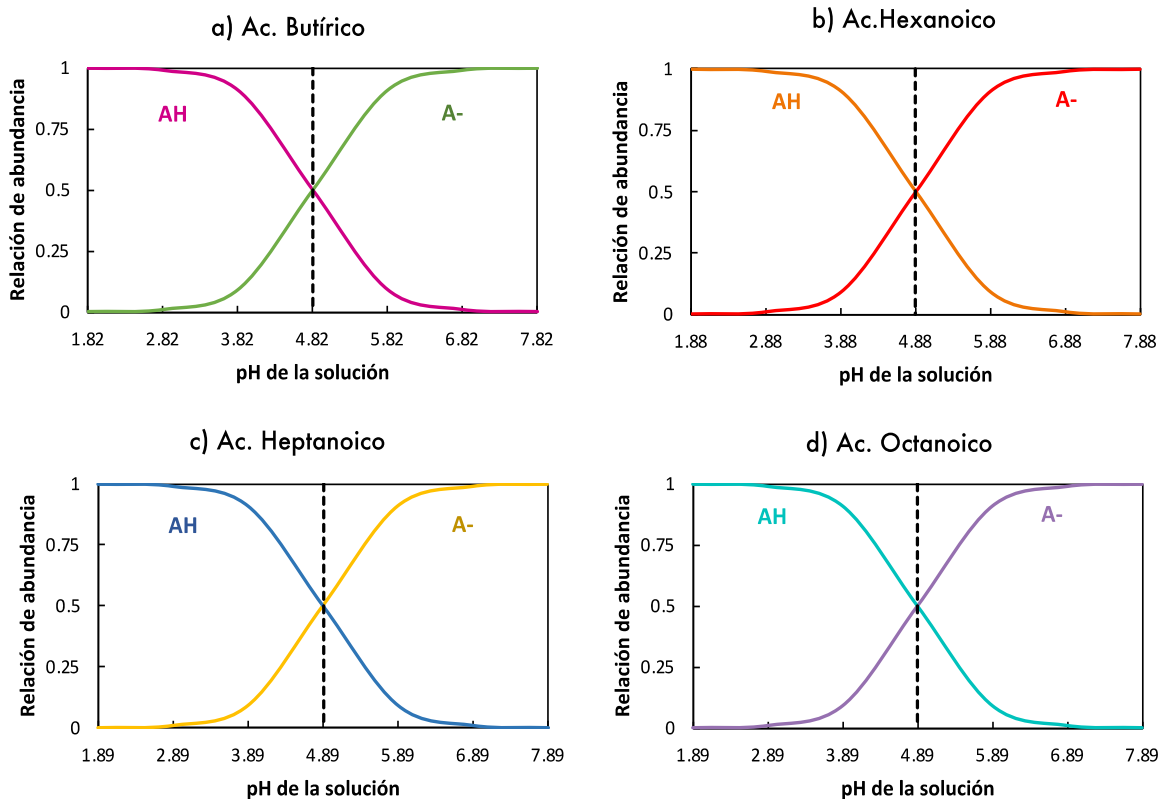


Figura 4. Porcentaje de ACCM disociado o no disociado en función del pH.

### 1.7.2 Tiempo de retención hidráulica (TRH)

El tiempo de retención hidráulica (TRH) es esencial para el control de los procesos anaerobios porque afecta directamente la cantidad y la calidad de la biomasa activa en los reactores (Wang *et al.*, 2013). Esto se debe a que la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de las bacterias acidogénicas es mayor comparada con las especies metanogénicas (Grootscholten *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2006). Por lo tanto, la disminución del TRH podría beneficiar el proceso acidogénico e inhibir el consumo de carbono para producir metano, esto en un reactor de mezcla completa.

Es importante mencionar que el TRH también está directamente relacionado con el tipo de sustrato, variando de 2-15 días para sustratos complejos y de 4-17 horas para sustratos fácilmente degradables (Kucek *et al.*, 2016).

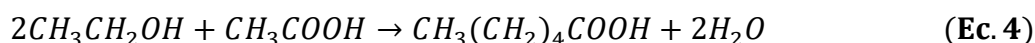
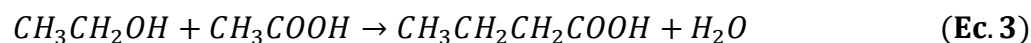
### 1.7.3 Temperatura

Aunque la temperatura óptima para varias cepas que realizan la BOI como *C. kluyveri*, *E. pyruvativorans* y *M. elsdenii* está cerca de 37 °C (Marounek *et al.*, 1989; Wallace *et al.*, 2004; Weimer y Stevenson, 2012; Wallace *et al.*, 2003). Las tasas de producción de ACCM más prometedoras hasta la fecha se han alcanzado a una temperatura de funcionamiento de 30 °C en biorreactores con microbiomas endógenas (Ge *et al.*, 2015; Grootscholten *et al.*, 2013; Grootscholten *et al.*, 2014).

### 1.7.4 Relación etanol/acetato

Como ya se ha mencionado, para que la BOI se lleve a cabo es necesaria la presencia de compuestos aceptores de electrones como el acetato (AA) y de compuestos donadores de electrones como el etanol (ETOH). De esta manera resulta muy importante determinar la relación necesaria de etanol/acetato para que la reacción se lleve a cabo adecuadamente.

La producción de ácido butírico y hexanoico por *Clostridium kluyveri* metabolizando etanol y ácido acético, se describen mediante las ecuaciones 3 y 4:



Los rendimientos relativos de los ácidos de cadena media están determinados por las cantidades de ácido acético y etanol disponibles. Si el ácido acético está presente en exceso, se forma una cantidad considerable de ácido butírico, mientras que, si el etanol está en exceso, el producto principal es el ácido hexanoico.

La formación bioquímica de ácido hexanoico ocurre a una relación molar de etanol superior a la de ácido acético (2 ETOH: 1 AA) (Barker *et al.*, 1945; Spirito *et al.*, 2014).

En una relación molar inferior a 2: 1, el ácido acético tiende a reaccionar con todo el etanol disponible para formar ácido n-butírico, mientras que en una relación molar superior a 2:1, se espera un consumo completo de ácido acético para formar ácido n-butírico, lo que resulta en un excedente de etanol. Esta presencia de etanol permite el alargamiento de la cadena del ácido n-butírico al ácido n-hexanoico (Seedorf *et al.*, 2008).

Las altas proporciones de etanol por lo tanto contribuyen a una mayor disponibilidad de acetil-CoA, que puede guiar los ciclos continuos de elongación de cadena hasta la generación de caprilato (C8) e incluso caprato (C10). Por lo tanto, los compuestos orgánicos con una alta relación de etanol/acetato podrían ser los sustratos óptimos aunque se ha reportado las altas concentraciones de etanol (>23 g/L) podrían inhibir a los microorganismos productores de ACCM (Spirito *et al.*, 2018).

Bornstein y Barker (1947) encontraron que las vías metabólicas de los microorganismos capaces de realizar la elongación de cadena dependen de la concentración de acetato y etanol, donde el exceso de etanol puede conducir a un mayor rendimiento de caproato que el butirato. Weimer y Stevenson (2012) examinaron el efecto de diferentes concentraciones de acetato y etanol en la formación de productos, obteniendo la mayor producción de caproato con una relación de 700 mM etanol y 120 mM de acetato.

### **1.8 Configuración de reactores utilizados en la producción de ACCM**

En la elección del biorreactor para el proceso de elongación de cadena deben ser considerados diferentes factores como el tipo materia prima a utilizar como sustrato y el tipo de inóculo. De acuerdo con el tipo de sustrato la selección del proceso dependerá de si la materia prima biodegradable es compleja o fácilmente biodegradable (Angenent *et al.*, 2016). Cuando se utiliza *materia prima biodegradable compleja*, la hidrólisis será un paso limitante, que dará como resultado tiempos largos de residencia (mayores a 2 días) (Agler *et al.*, 2012; Grootcholten *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2015). Si hay sólidos presentes, se recomienda el uso de biorreactores alimentados por lotes, como un biorreactor anaerobio discontinuo secuencial (ASBR) (Ge *et al.*, 2015; Agler *et al.*, 2012), debido a que para aumentar la productividad de ACCM, es necesaria una buena retención de la biomasa productora de estos ácidos (Grootcholten *et al.*, 2013). Para la *materia prima fácilmente biodegradable*, la ausencia de sólidos permite operar a tiempos de residencia menores a 2 días (Grootcholten *et al.*, 2013).

La selección del sistema de acuerdo con el inóculo depende principalmente de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), en donde las bacterias que alargan la cadena podrían superar a los metanógenos acetoclásticos si se reduce el TRH evitando la competencia por sustrato con los metanógenos. Esto se debe a que la tasa de crecimiento de las bacterias productoras de

ACCM por ejemplo *C. kluyveri* durante el proceso de elongación de cadena en condiciones ideales (temperatura de 37 °C, pH de 7) es  $\sim 0.1 \text{ h}^{-1}$  (Kenealy y Waselefsky, 1985) aproximadamente 5 veces más rápida que la de los metanógenos acetoclásticos de  $\sim 0.02 \text{ h}^{-1}$  (Grootscholten *et al.*, 2013b). Así el uso de filtros de flujo ascendente anaerobios ha permitido mantener tiempos de residencia de sólidos suficientemente largos evitando el lavado de biomasa en tiempos de residencia hidráulicos bajos de 4-18 h utilizando sustratos sintéticos compuestos de etanol y acetato (Grootscholten *et al.*, 2013).

### **1.9 Extracción y separación de ACCM**

Los ACCM en su forma no disociada inhiben a los microorganismos a relativamente bajas concentraciones. Los ácidos carboxílicos no disociados pueden unirse, desplazar o bloquear la conexión entre los transportadores de electrones ubicados dentro de la membrana celular (Cavalcante *et al.*, 2017). Además, debido a su hidrofobicidad, podría ocurrir una difusión directa del ACCM no disociado a través de la membrana lipídica (Kuceck *et al.*, 2016). En condiciones de citoplasma de pH neutro, los ácidos se disocian liberando protones y, en consecuencia, disipando la fuerza motriz de los protones de la célula. Otros posibles mecanismos de inhibición se informan en la literatura: interacciones con enzimas, deterioro del transporte de nutrientes, proteínas, desnaturalización del ADN y lisis de la membrana celular (Desbois and Smith, 2010).

Por lo tanto, el control del pH es una de las variables más importantes en la producción de ácidos orgánicos utilizando sistemas anaeróbicos. Ge *et al.*, 2015, observaron que a concentraciones superiores de 0.87 g/L de ácido hexanoico no disociado y un pH de 5.3, existen efectos tóxicos sobre los consorcios anaerobios acidogénicos puros y aunque recientemente se han reportado producciones de ACCM utilizando cultivos abiertos no adaptados soportando concentraciones de ácido hexanoico de hasta 7.1 g/L (Roghair *et al.*, 2018). De esta forma, la extracción oportuna y selectiva de los ácidos orgánicos es de suma importancia para un proceso industrialmente factible. A este respecto se han utilizado diferentes sistemas entre los que destacan la separación con membranas (pertracción) o sistemas bifásicos (Ge *et al.*, 2015).

### **1.9.1 Extracción bifásica**

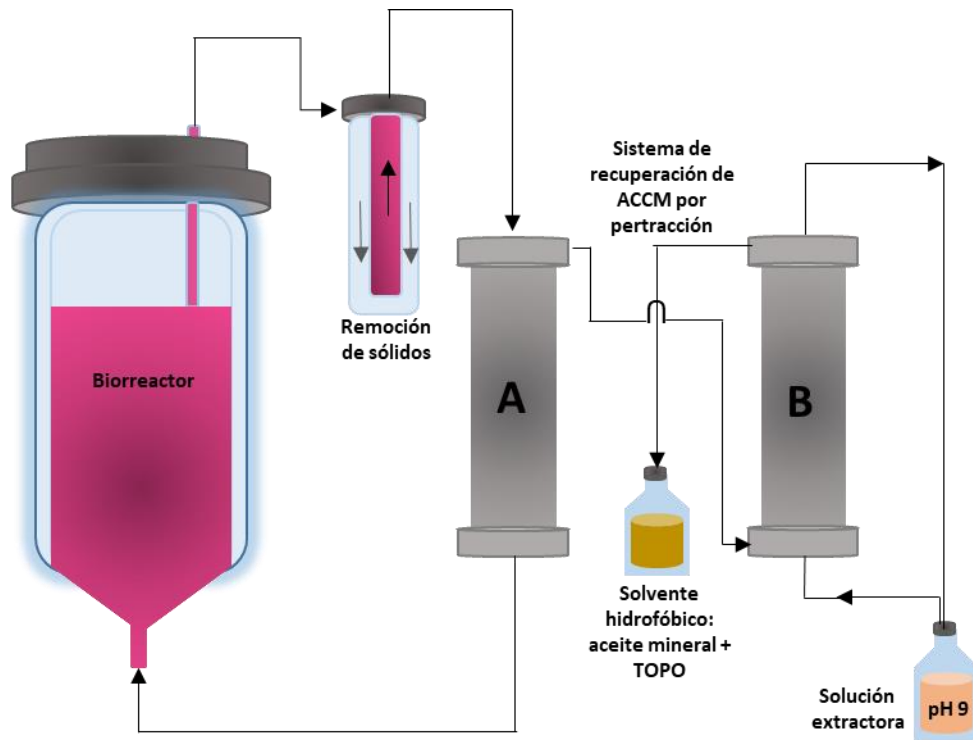
Este proceso de separación se basa en la utilización de un disolvente de extracción alamina 333, disuelto en un aceite olefíco, que evita la mezcla con el medio biótico. La reacción del medio con el disolvente de extracción da como resultado la transferencia del ácido no disociado de la fase acuosa al medio de extracción del aceite.

Con este método de extracción bifásico Choi *et al.*, (2013) reportó una producción de ácido hexanoico de 8 g/L en un proceso sin extracción, sin embargo, utilizando un sistema de extracción con solvente bifásico, se produjeron 28.42 g/L de ácido hexanoico, productividades alrededor de 4 veces más altas que en los ensayos sin extracción.

Por lo tanto, a pesar de los efectos tóxicos que podría generar el disolvente de extracción sobre la microbiota, la extracción tiene un efecto neto positivo a través de la remoción de los ACCM del medio. Extractores y disolventes, como el fosfato de tri-n-butilo, han sido considerados como alternativos de baja toxicidad (Choi *et al.*, 2013).

### **1.9.2 Extracción por pertracción**

La *pertracción* (extracción asistida por membranas) proporciona una alternativa para evitar el contacto de los extractores tóxicos con la biomasa. Investigaciones recientes (Ge *et al.*, 2015, Kucek *et al.*, 2016, Xu *et al.*, 2015) utilizaron membranas de fibra hueca hidrófobas para separar el medio de crecimiento biótico del extractor, el cual consiste en óxido de trioctilfosfina (TOPO) disuelto en aceite mineral. La baja solubilidad de los ACCM en agua facilita su transporte desde el líquido hasta la capa de aceite formada en la superficie externa de la membrana. A través de una segunda membrana, los ACCM se vuelven a extraer en una solución alcalina. En la Figura 5, se muestra el sistema de pertracción en línea utilizado para la recuperación de ACCM.



**Figura 5.** Extracción en línea a través de un sistema de extracción líquido-líquido a base de membrana, para recuperar continuamente ACCM hidrofóbicos, no disociados de un flujo de caldo del biorreactor a través del contactor de membrana hacia adelante (A). Después de la recuperación intermedia en un disolvente de aceite mineral, los ACCM se transfieren a través de un segundo contactor de membrana hacia atrás (B), a una solución de extracción alcalina, modificada de Xu *et al.*, 2015.



## JUSTIFICACIÓN

A pesar del alto valor comercial y biotecnológico que poseen los ácidos carboxílicos de cadena media, la obtención de altos rendimientos y productividades para lograr un proceso de producción económicamente viable a partir de la elongación de cadena se ha visto limitado principalmente por el aumento de costos debido a la adición de etanol (cuando se utilizan residuos orgánicos como sustrato) o el uso de cultivos axénicos, así como también por condiciones de operación como la temperatura y el pH e inhibición por la acumulación de ACCM formados en el medio.

Por otra parte, la obtención de ACCM más valiosos que el ácido hexanoico (p. ej. Ácido octanoico (C8)) también se ha visto limitada, reportándose producciones máximas poco competitivas de 0.04-0.9 g/L (Grootscholten *et al.*, 2013). Para la obtención de ACCM con cadenas mayores a seis carbonos es necesaria la utilización de altas concentraciones de etanol. Sin embargo, en los cultivos mixtos utilizados hasta ahora se ha reportado una baja tolerancia a concentraciones mayores a los 18.4 g/L de etanol (Kucek *et al.*, 2016).

Por lo que en este trabajo se propone el uso de efluentes vitivinícolas como sustrato debido a su contenido inherente de etanol (el cual puede ser aprovechado en el proceso de elongación de cadena). Así como también la evaluación del uso de un consorcio nativo de estos efluentes como inóculo, en los cuales se ha reportado la presencia de bacterias que realizan la elongación de cadena (Cortéz-Cervantes, 2019). Lo cual podría favorecer no sólo el proceso de producción de ACCM, sino también la producción de ácidos con cadenas de carbono más largas al estar previamente adaptadas a altas concentraciones de etanol. Todo esto bajo condiciones de operación optimizadas.

## CAPÍTULO II

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 2.1 HIPÓTESIS

*La producción de ácidos carboxílicos de cadena media se verá favorecida por el uso de consorcios nativos presentes en los efluentes vitivinícolas debido a la presencia de Clostridiales.*

*De igual manera, la separación oportuna de los ácidos carboxílicos de cadena media formados en el medio a concentraciones por debajo 7 g/L, incrementará la producción de ácidos carboxílicos de cadena media ya que se evitará la inhibición por producto debido a los efectos tóxicos que presentan estos ácidos sobre los microorganismos.*

#### 2.2 OBJETIVOS

##### 2.2.1 Objetivo general

Contribuir al entendimiento de las condiciones operacionales y microbiológicas que afectan a la producción de los ácidos carboxílicos de cadena media utilizando efluentes vitivinícolas.

##### 2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar en lote el potencial de diferentes consorcios (nativos de efluentes vitivinícolas, fluido ruminal, gránulos anaerobios y digestato) bajo condiciones ambientales no estériles y etanol como donador de electrones para su uso en la producción de ACCM a partir de efluentes vitivinícolas.
- Establecer en lote el efecto de la temperatura y pH sobre la producción de ACCM con miras a encontrar los valores que maximicen su producción.
- Caracterizar y analizar la dinámica poblacional microbiana en cada etapa experimental mediante la extracción de ADN y secuenciación masiva que permitan identificar posibles microorganismos relacionados directamente en la producción de ACCM.
- Implementar la separación oportuna de ACCM del medio mediante la extracción bifásica in-situ en un reactor discontinuo secuencial y evaluar su efecto sobre la productividad .

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental utilizada se muestra en la Figura 6, en la cual se detallan los parámetros operacionales utilizados en cada una de las etapas que se llevaron a cabo para alcanzar los objetivos planteados. La extracción de ADN y secuenciación para el análisis metagenómico de las comunidades microbianas se realizaron en cada una de las etapas experimentales.

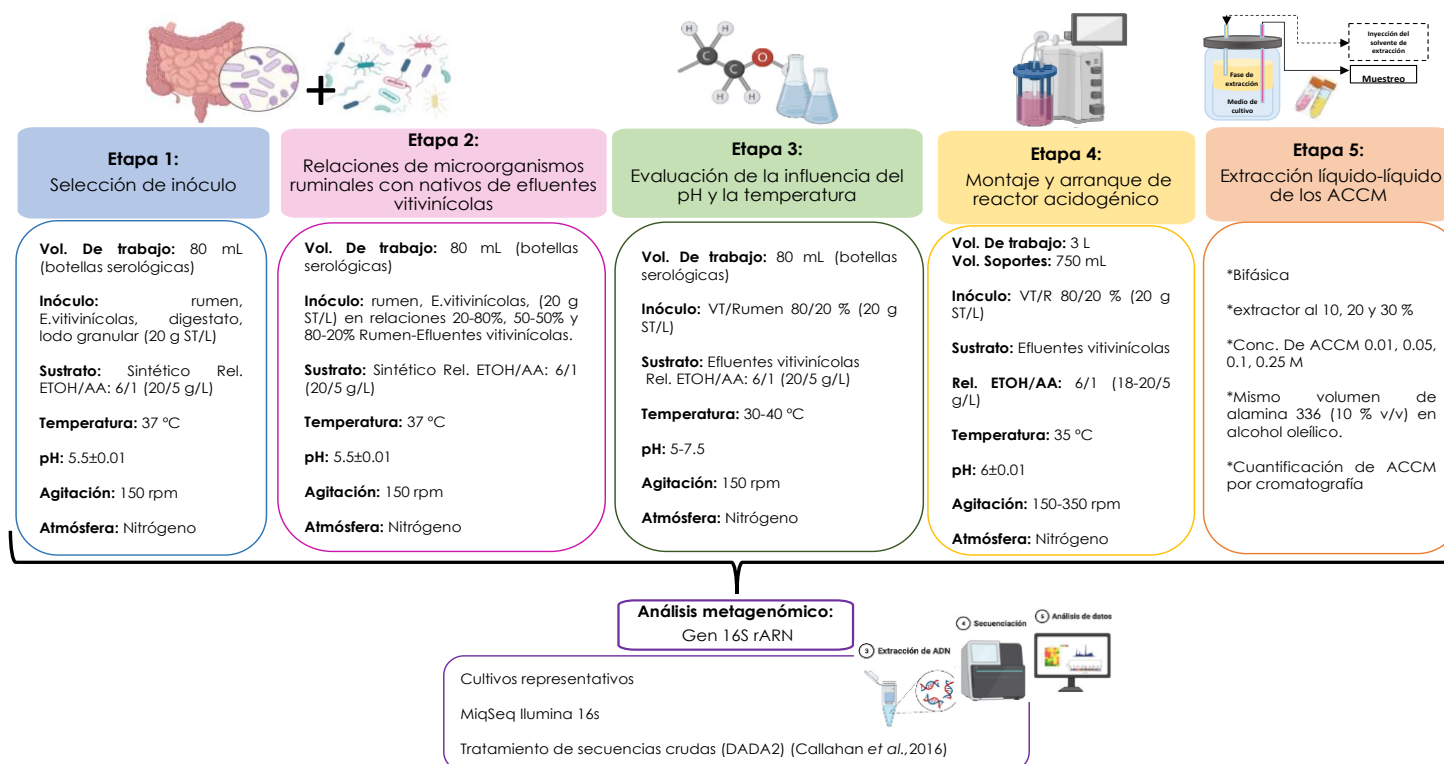


Figura 6. Metodología general dividida en 5 etapas principales

La experimentación estuvo dividida en 5 etapas. La Etapa 1 consistió en evaluar el desempeño de diferentes inóculos mixtos para la producción de ACCM. Los inóculos fueron seleccionados de acuerdo con la presencia de microorganismos reportados capaces de llevar a cabo la elongación de cadena. Al finalizar la etapa 1, surgió la duda sobre la posibilidad de mejorar la producción de ACCM mediante la combinación de los dos cultivos con mejor desempeño mostrado.

La Etapa 2 se enfocó en evaluar la producción de ACCM utilizando diferentes relaciones microorganismos ruminales y microorganismos nativos de efluentes vitivinícolas, en ambas etapas como sustrato se utilizó un medio sintético y las relaciones utilizadas fueron 20-80%, 50-50% y 80-20% Rumen/Nativos de efluentes vitivinícolas, además de 2 cultivos control de 100% microorganismos ruminales y nativos de efluentes vitivinícolas (Zhang *et al.*, 2019).

Una vez seleccionado el inóculo productor de ACCM, en la Etapa 3 se estudió el efecto del pH y la temperatura sobre la producción de ACCM, en donde se evaluaron 6 niveles de pH (5, 5.5, 6, 6.5, 7 y 7.5) y 3 niveles de temperatura (30, 35 y 40 °C), en esta etapa se utilizaron efluentes vitivinícolas como sustrato con relación molar 10:1 etanol/acetato.

Los experimentos en las primeras tres etapas se realizaron en botellas serológicas con volumen útil de 80 mL, las botellas se colocaron en incubadoras con agitación orbital de 150 rpm.

En la Etapa 4 se evaluó la producción de ácido hexanoico a escala laboratorio, el proceso anaerobio consistió en un SBR (Applikon Biotechnology) con volumen nominal de 7 L y un volumen de trabajo de 3 L, operado como lecho móvil con anillos de polietileno y bajo condiciones mesofílicas (35 °C) con una velocidad de mezcla de 300 rpm. La duración de cada lote estuvo definida por la concentración máxima no inhibitoria reportada de ácido hexanoico (6-8 g/L).

Finalmente, la Etapa 5 se dividió en dos fases, la primera fase se enfocó en la selección de la concentración del extractor a utilizar, así como en el estudio del efecto de la concentración de ACCM sobre la eficacia del extractor, durante esta fase para todos los experimentos se

utilizaron medios sintéticos. A partir de los resultados obtenidos anteriormente, en la fase 2 se evaluó la extracción de ACCM del medio y su efecto durante la producción por lotes.

En cada una de las etapas se llevó a cabo el análisis metagenómico Gen 16S rARN de los cultivos más representativos.

Para mayor claridad al trabajo, los materiales y técnicas utilizadas durante esta investigación se describen a continuación.

## **3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS**

### ***3.2.1 Determinación de Sólidos Totales (ST), Sólidos Volátiles (SV), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)***

#### **3.2.1.1 ST y SV**

Para la determinación de sólidos totales y volátiles, la muestra se colocó en la estufa a 103-105 °C, por 8 horas. Posteriormente, se colocaron en un desecador y se pesaron en una balanza analítica. El procedimiento de secado-enfriado-pesado se repitió hasta tener una diferencia en peso menor al 4%. Seguido, la muestra se colocó dentro de una mufla a 550 °C por 15 min, para su incineración. La muestra fue trasladada a la estufa por 15 min y posteriormente a desecador, para luego pesarla en una balanza analítica. El ciclo de incineración-enfriamiento-pesado se repitió hasta conseguir una diferencia en peso menor al 4%. Las cápsulas de porcelana empleadas para la determinación de SV fueron calcinadas en la mufla a 550 °C por 1 hora (APHA *et al.*, 2005).

#### **3.2.1.2 SSV**

Para la determinación de SSV, se tomaron muestras con volumen definido y se filtraron a vacío a través de un filtro Whatman® GF/A (1.6 µm). Se realizaron 3 lavados con agua destilada, 10 mL de agua para cada lavado. Posteriormente, las muestras se colocaron en estufa a 103-105 °C por 2 horas, se pasaron a desecador (para enfriar) y se pesaron en una balanza analítica. El procedimiento de secado-enfriado-pesado se repitió hasta conseguir una diferencia en peso menor al 4%. Posteriormente, la muestra se incineró en una mufla a 550 °C por 20 min. Los filtros se colocan en la estufa (103 -105 °C) por 15 min, se pasaron al

deseCADador 15 min más y se pesaron. El ciclo de incineración-enfriamiento-pesado se repitió hasta tener una variación en peso menor al 4% (APHA *et al.*, 2005).

### **3.2.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO)**

La DQO es la cantidad de materia orgánica e inorgánica oxidable por una solución de dicromato de potasio en condiciones fuertemente ácidas a 150 °C. La digestión se llevó a cabo en un reactor HACH a 150 °C y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro HACH (DR/2800) a 620 nm.

Para la determinación de DQO se utilizaron tubos HACH con dicromato de potasio y ácido sulfúrico en un rango de 20 –1500 y 200 –150000 mg DQO/L. A cada tubo se le adicionaron 2 mL y 200 µL respectivamente de la muestra utilizando diluciones de 1:10 para AGVV (tubos de 1500 mg DQO/L) y para la determinación de etanol en los efluentes, se utilizó una dilución de 1:100 (tubos de 15000 mg DQO/L). Posteriormente, los tubos se colocaron dentro del reactor HACH precalentado a una temperatura de 150 °C y se efectuó la digestión por 2 horas. Una vez transcurridas las 2 horas se dejaron enfriar los tubos por 20 min, se mezclaron cuidadosamente por inversión y se leyeron en el espectrofotómetro HACH utilizando el método 435 (DQO mayor a 150 mg/L) (Hach, 2008).

### **3.2.3 Cuantificación de carbohidratos**

Para la cuantificación de carbohidratos se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico en donde se mezclaron 1 mL de muestra con 1 mL de fenol al 5% (p/v). Posteriormente, se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitaron lentamente por inversión. Los tubos se dejaron enfriar en un baño de agua y para después leer la absorbancia a 490 nm. El blanco se preparó empleando agua desionizada y la curva de calibración se realizó empleando D-glucosa como estándar (DuBois *et al.*, 1956).

### **3.2.4 Determinación y cuantificación de metabolitos**

Para la determinación de etanol y ácidos grasos volátiles se extrajeron 2 mL de la fase líquida cada 48 h de las botellas serológicas (dichas muestras fueron centrifugadas, filtradas y acidificadas). Se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890B, USA.). Equipado con una columna DB-FFAP (15 m x 530 µm x 1 µm, Agilent) y un detector de

ionización de flama FID. La temperatura inicial de la columna fue de 60 °C, luego se aumentó gradualmente a 90 °C a una velocidad de 15 °C/min. Finalmente, la temperatura de la columna se incrementó a 170 °C a una velocidad de 25 °C/min. La temperatura inicial del horno fue de 60 °C, la temperatura del inyector de 190 °C y la del detector de 275 °C; se utilizó nitrógeno como gas portador (de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Para la lectura de las concentraciones de los AGVV se realizó una curva de calibración. Los componentes y el tiempo de retención para cada uno se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Componentes de la curva de calibración utilizada en la determinación de AGVV

<b>Componente</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
Acetona	1.216
Etanol	1.498
Butanol	2.705
Acetato	5.131
Propionato	5.768
Isobutirato	5.962
Butirato	6.418
Valerato	7.200
Isovalerato	6.706
Caproato	7.940
Heptanoato	8.804
Caprilato	9.970

### **3.2.5 Composición de biogás**

Las muestras de biogás se tomaron con una jeringa, succionando y desplazando el gas por lo menos dos veces para homogenizar la atmósfera. Posteriormente se tomaron 5 mL de muestra e inmediatamente se inyectaron al cromatógrafo de gases acondicionado y programado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La composición de biogás se determinó mediante un cromatógrafo de gases SRI modelo 8610C provisto con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas, ambas de acero inoxidable con 1.82 m de longitud y un diámetro de 3.175 mm. Una columna rellena de sílica-gel en serie con una columna de tamiz molecular 13x. La temperatura inicial de la columna fue de 40 °C (4 min); luego se aumentó gradualmente a 110 °C a una velocidad de 20 °C/min. Finalmente, la

temperatura de la columna se mantuvo a 110 °C durante 3 min. El gas portador utilizado fue nitrógeno con un flujo de 20 mL/min. La temperatura del inyector fue de 100 °C y la del detector de 150 °C a una presión de 35 psi (SRI Instruments, USA.).

### ***3.2.6 Análisis de la comunidad microbiana: extracción de ADN, secuenciación y análisis de datos***

La extracción de ADN se realizó usando el kit de PowerLyzer Power Soil KH DNA (QIAGEN, Hilden, Germany). La concentración del ADN se determinó con NanoDrop (Thermo Scientific). El ADN total obtenido de las comunidades se secuenció con base en el gen 16s rADN para bacterias y arqueas, e ITS (Internal Transcribed Spacer, espaciador transcrito interno) para hongos; mediante la plataforma de secuenciación masiva MiSeq (Illumina, San Diego, EUA) en el laboratorio RTL genomics (Texas, EUA). Los primers universales utilizados amplificaron la región V4 del 16s rADN fueron 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT); mientras que para el ITS fueron ITS3F (GCATCGATGAAGAACGCAGC) y ITS4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC). La clasificación taxonómica de cada OTU se realizó utilizando su secuencia en consenso, donde la secuencia fue analizada en el clasificador RDP mediante comparaciones con secuencias de alta calidad derivadas de la base de datos NCBI.



## CAPÍTULO IV

### **Desempeño de cultivos mixtos nativos (de efluentes vitivinícolas, fluido ruminal, lodo anaerobio y digestato) para la producción de ácidos carboxílicos de cadena media utilizando etanol y acetato**

#### Referencia al trabajo publicado:

Villegas-Rodríguez, S, Buitrón, G., 2020. Performance of native open cultures (winery effluents, ruminal fluid, anaerobic sludge and digestate) for medium-chain carboxylic acid production using ethanol and acetate. *Journal of Water Process Engineering* 40:101784. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101784>

#### **Resumen**

Se estudió la producción de ácidos carboxílicos de cadena media (ACCM) utilizando cinco microbiotas nativas diferentes (fluido ruminal, efluentes de vino tinto y blanco, digestato acidogénico y lodo granular anaerobio). Se encontró que la presencia de *Clostridium* es esencial para un inóculo mixto eficiente. La microbiota endógena del efluente de vino tinto produjo la mayor concentración de ácido hexanoico, seguido por el inóculo de lodo anaerobio. De manera similar, las mayores productividades volumétrica y específica de ácido hexanoico (263 g de ácido hexanoico/L/d y 13 g/g de sólidos totales/d) se observaron para el inóculo recolectado del efluente de vino tinto. Sin embargo, se encontró que la microbiota nativa del fluido ruminal es más versátil, lo que permite la producción de ácidos carboxílicos de cadena más larga, como los ácidos heptanoico y octanoico. El inóculo de digestato fermentativo produjo la concentración más baja de ácido hexanoico a la velocidad más baja.

## 4.1 INTRODUCCIÓN

Los ácidos carboxílicos de cadena media son ácidos grasos saturados que contienen entre 6 y 12 átomos de carbono, incluido un grupo carboxílico. Los ACCM generalmente se producen a partir de fuentes fósiles mediante procesos químicos (Liu and Jarboe, 2012) o son extraídos de aceites naturales. Tienen gran potencial de ser removidos del agua debido a sus cadenas hidrofóbicas de carbono, que les proporciona una solubilidad máxima relativamente baja cuando están en su forma ácida no disociada. De esta forma, a pH bajo (cercano a su pKa), forman aceites que se separan espontáneamente del agua (Steinbusch *et al.*; Butkus *et al.*, 2011).

Los ácidos carboxílicos de cadena corta (ACCC) como el acetato se pueden convertir en ACCM durante la fermentación, generando gas hidrógeno como producto secundario (Ge *et al.*, 2015). La conversión de ACCC a ACCM se realiza a través de la ruta de la  $\beta$ -oxidación inversa, donde ciertos tipos de bacterias utilizan donadores de electrones como fuente de carbono. Se ha observado una productividad superior del ácido n-hexanoico cuando se utiliza etanol para alimentar biorreactores (Grootscholten *et al.*, 2013). El etanol proporciona energía en forma de ATP y equivalentes reductores ( $\text{NADH}_2$ ) para alargar la cadena de carbono de ACCC formada durante la fase de acidogénesis en el proceso de digestión anaeróbica (Weimer and Stevenson, 2012). El proceso ocurre secuencialmente en 2 etapas; en cada paso, se agregan dos carbonos al carboxilato (Agler *et al.*, 2012).

Uno de los productos más destacados de la plataforma del carboxilato es el ácido caproico o hexanoico debido a sus diversas aplicaciones industriales, incluidos los aditivos para la alimentación de ganado (Xu *et al.*, 2018), precursores renovables para diésel y combustibles de aviación (Harvey and Meylemans, 2014). Este producto químico tiene un valor en el mercado diez veces superior al del etanol (Cavalcante *et al.*, 2017). En general, los productos con cadenas de carbono más largas (p. ej., ácidos heptanoico, octanoico y nonanoico) tienen un mayor valor biotecnológico y comercial debido a su mayor contenido energético y menor solubilidad en agua (Kuceck *et al.*, 2016). Los procesos de elongación de cadenas biológicas generalmente requieren la adición de etanol u otro donador de electrones, lo que representa un costo adicional (Angenent *et al.*, 2016).

La elongación de la cadena generalmente se realiza utilizando cultivos puros, entre los cuales *Clostridium kluyveri* es el microorganismo más investigado debido a su capacidad para utilizar etanol como donante de electrones (Bornstein and Barker, 1947; Ge *et al.*, 2015). Otros microorganismos, como *Clostridium sp.*, *BS-1* (Jeon *et al.*, 2013), *Megasphaera elsdenii* (Choi *et al.*, 2013) y *Eubacterium pyruvativorans* (Wallace *et al.*, 2004) han sido reportados capaces de producir ácido hexanoico. Sin embargo, el uso de consorcios bacterianos en lugar de cultivos puros en el proceso de elongación tiene varias ventajas, como el uso de sustratos crudos no esterilizados. Además, se sabe que los cultivos abiertos tienen una mayor producción de metabolitos, una alta diversidad de crecimiento bacteriano e interacciones sinérgicas entre microorganismos (Agler *et al.*, 2011). Otras ventajas de trabajar con cultivos mixtos en lugar de cultivos puros son la elusión de esterilización o la adición de medios específicos de cada especie, la posibilidad de tratar diferentes sustratos complejos de residuos orgánicos (Agler *et al.*, 2011) y la omisión del uso de cultivos puros como inóculos. Estas ventajas hacen que la conversión de residuos sea económicamente viable (Spirito *et al.*, 2014) frente a otros bioproductos obtenidos mediante el uso de aguas residuales, como los biocombustibles (bioetanol o biogás), con precios más bajos en el mercado (Xu *et al.*, 2015). Para el caso de los ACCM, se puede encontrar un escenario diferente. El ácido hexanoico presentó un valor en el mercado de 1.18 USD/kg, cinco veces superior al metano (0.24 USD/kg), y hasta dos veces superior al etanol (0.61 USD/kg) (Kleerebezem *et al.*, 2015). Aunque el ácido n-hexanoico también se puede obtener de los aceites de coco y palma, menos del 1% está presente en los aceites (Kleerebezem *et al.*, 2015). Se han logrado altas productividades con el proceso de elongación de cadena (57 g de ácido hexanoico/L/d), dando a la fermentación de ACCM una ventaja significativa sobre los bioprocesos convencionales (Grootscholten *et al.*, 2013). El uso de efluentes de la industria vitivinícola y su microbiota endógena son interesantes para la producción de ACCM debido al etanol residual presente en el efluente que puede ser utilizado en el proceso de  $\beta$ -oxidación inversa (Wu *et al.*, 2020) y porque dicha microbiota ya está aclimatada a concentraciones elevadas de etanol (Agler *et al.*, 2011).

El amplio espectro microbiano presente en el fluido ruminal, que incluye microorganismos de los géneros *Megasphaera*, *Eubacterium* y *Clostridium* (Weimer *et al.*, 2015; Damns *et al.*, 2018), hace que este inóculo, así como los lodos anaerobios (Steinbusch *et al.*, 2011) y los digestatos de la fermentación (Grootscholten *et al.*, 2013), sean interesantes de investigar.

El objetivo de esta etapa fue evaluar el potencial de cinco microbiomas como inóculo productor de ácidos carboxílicos de cadena media en pruebas realizadas bajo las mismas condiciones iniciales. Los microbiomas evaluados fueron la microbiota endógena de la fracción sólida sedimentada de efluentes vitivinícolas (vino tinto y blanco), fluido ruminal, lodo granular anaerobios y biomasa acidogénica de un proceso de fermentación. La discusión sobre el comportamiento de los consorcios endógenos presentes en las aguas residuales vitivinícolas puede resultar interesante por su posible aplicación a nivel industrial para la producción de ácidos carboxílicos de cadena media a partir de residuos.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***4.2.1. Inóculo***

Se seleccionaron cinco inóculos diferentes para la prueba considerando las capacidades microbianas potenciales para llevar a cabo el alargamiento de cadena. Los inóculos probados fueron los siguientes: Consorcios nativos presentes en la fracción sólida sedimentada de efluentes vitivinícolas de 1) vino tinto y 2) vino blanco (Estado de Querétaro, México). 3) Líquido ruminal, incluidos los sólidos, recolectado de un rastro en la ciudad de Querétaro. El líquido ruminal se recolectó, se mantuvo a 37 °C y se utilizó dentro de las 2 h desde el momento de la toma de muestras en el rastro. 4) Lodo granular de un sistema anaerobio Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) que trata las aguas residuales de una fábrica de harina. 5) Digestato procedente de un reactor acidogénico alimentado con biomasa lignocelulósica pretratada hidrotérmicamente. El reactor acidogénico se operó con un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 2 d, pH de 5.5 y temperatura de 35 °C. Se determinaron los sólidos suspendidos totales y volátiles de todos los inóculos.

#### ***4.2.2 Condiciones experimentales***

Las pruebas se realizaron en botellas serológicas con un volumen de trabajo de 80 mL. Como sustrato se utilizó un medio sintético compuesto por etanol (ETOH) y ácido acético (AA) en una relación ETOH/AA de 10/1 (500/50 mmol; 23 g/3 g o 94/6 como % de demanda química de oxígeno (DQO)), y se complementó el medio con el medio mineral recomendado por Zhang et al., (2019) y medio de fosfatos (pH tamponado con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) para evitar la inhibición por disminución del pH. El pH se ajustó a 5.5. Se determinaron los sólidos totales (ST) para cada inóculo y las botellas se inocularon con 1.6 g de ST, dando una concentración final de 20 g de ST/L para cada inóculo estudiado, para garantizar las condiciones anaerobias se roció  $\text{N}_2$  durante 20 s. Las botellas se colocaron en una incubadora a 37 °C con agitación orbital de 150 rpm. Se realizó una segunda alimentación de sustrato únicamente para el fluido ruminal, con base en la detección de ácido heptanoico a los 21 días; por lo tanto, los resultados de este inóculo se presentan en 2 lotes. Todas las mediciones y pruebas se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Se realizaron pruebas de ANOVA.

#### ***4.2.3. Métodos analíticos***

Para la determinación de etanol y ácidos carboxílicos se recolectaron muestras líquidas (2 mL) cada 48 h de las botellas serológicas. Las muestras se centrifugaron (600 g) y el sobrenadante se filtró utilizando filtros de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ . Las muestras se conservaron añadiendo HCl para disminuir el pH a 2 y luego se mantuvieron a 4 °C. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890B, EE. UU.) acondicionado y programado siguiendo las instrucciones del fabricante mencionados en la metodología general.

Los sólidos totales y volátiles se midieron de acuerdo con métodos estándar (APHA, 2005). y la demanda química de oxígeno según las instrucciones del fabricante (Hach, 2008). Las productividades volumétricas para la producción de cada ácido carboxílico se evaluaron dividiendo la concentración máxima por el tiempo necesario para alcanzar esa concentración. La tasa específica se calculó dividiendo la productividad volumétrica por la concentración total de sólidos del inóculo agregado a cada prueba.

#### **4.2.4 Análisis de la comunidad microbiana**

Al inicio del experimento, se recolectaron todos los inóculos (líquido ruminal, efluentes vitivinícolas, digestato fermentativo y lodo granular) para caracterizar la composición microbiana. Sin embargo, después de la fermentación, solo se caracterizaron microbiológicamente las muestras de biomasa con la mejor producción de ACCM. Para el muestreo, las botellas se mezclaron vigorosamente y se recolectaron muestras de 2 mL en tubos Eppendorf. Luego, las muestras se centrifugaron y los pellets de las muestras de biomasa se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento. El ADN genómico se extrajo de las muestras de biomasa en tampón de fosfato. Para la extracción de ADN se utilizó el kit de aislamiento de ADN PowerLyzer PowerSoil (QIAGEN, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se determinó con un equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA).

Las muestras de ADN se enviaron al Laboratorio de Investigación y Pruebas (RTL, Lubbock, TX, EE. UU.) para su amplificación y secuenciación a través de la plataforma de secuenciación masiva MiSeq (Illumina, San Diego, EE. UU.). Los cebadores universales utilizados fueron 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) que amplificaron la región V4 del 16s rDNA. La integridad y concentración de las muestras de ADN se evaluó utilizando gel de agarosa teñido con SYBR Green (1%) y cuantificado por espectrofotometría utilizando un NANODrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.).

Las secuencias se analizaron utilizando el software Quantitative Insights into Microbial Ecology 2 (QIIME2) (Bolyen *et al.*, 2019). Se obtuvieron secuencias demultiplexadas, sin errores y agrupadas mediante el algoritmo Deblur. La composición taxonómica de las muestras se determinó utilizando el clasificador 16S basado en Silva (Quast *et al.*, 2013). Se aplicaron límites de rarefacción inferiores de 5379 secuencias para el análisis de la diversidad de muestras bacterianas. Se utilizó el algoritmo USEARCH para seleccionar únicamente secuencias no menores a 100 pb y no mayores a 250 pb con un puntaje de calidad superior a 25 (Edgar, 2013), además, las secuencias quiméricas se eliminaron utilizando UCHIME (Edgar *et al.*, 2011). Las secuencias seleccionadas se guardaron para el análisis comunitario.

La clasificación taxonómica de cada unidad taxonómica operativa (OTU) se realizó utilizando su secuencia de consenso, donde la secuencia se analizó en el clasificador del proyecto de base de datos ribosomal (RDP) mediante comparaciones con secuencias de alta calidad derivadas de la base de datos NCBI (Wang *et al.*, 2007).

## 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

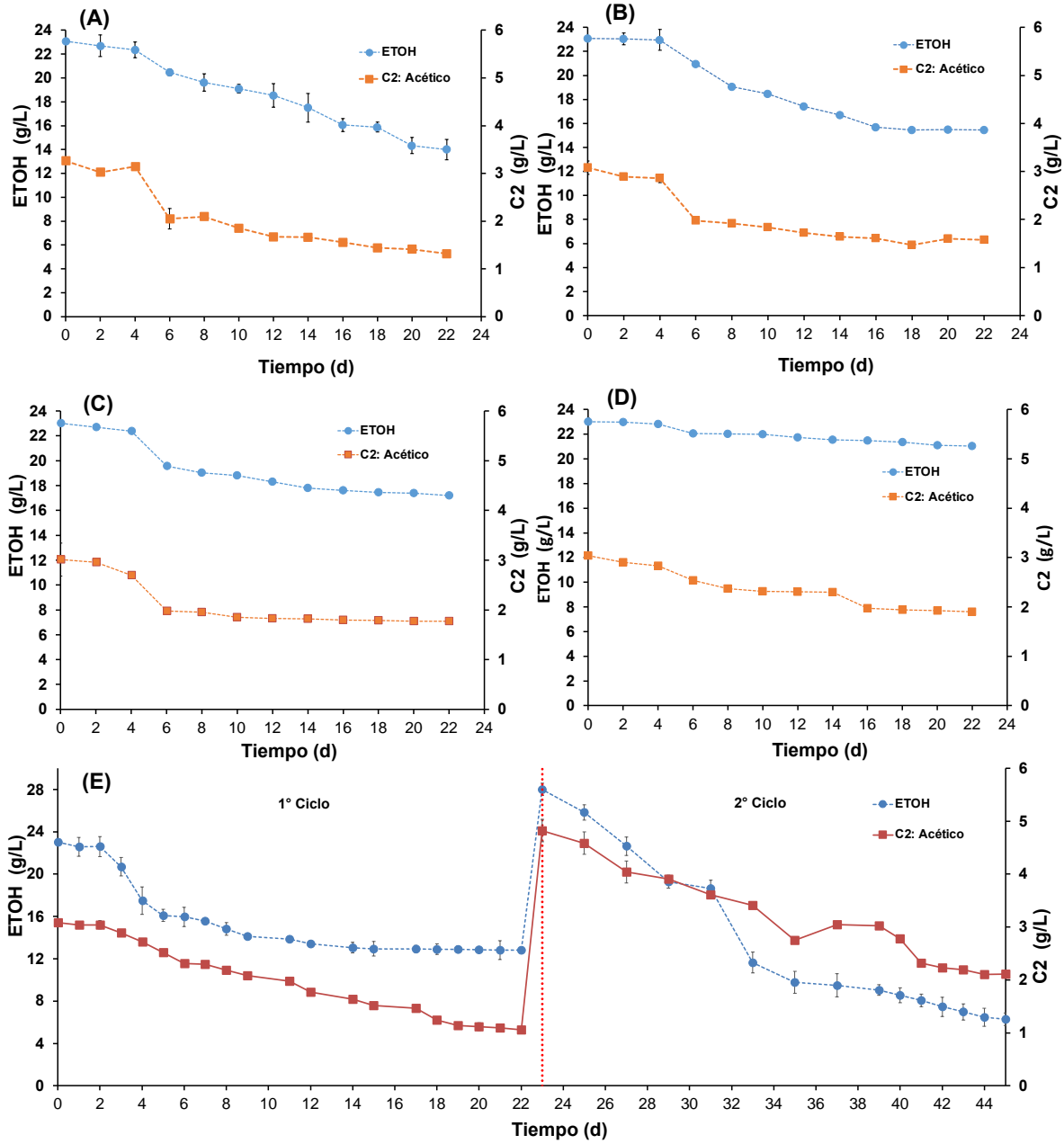
### 4.3.1 Producción de ACCM

Las concentraciones de sustrato consumido y ACCM producidos durante el tiempo de fermentación para cada inóculo se muestran en las Figuras 7 y 8. Una prueba ANOVA de un solo factor indicó que todos los inóculos estudiados fueron significativamente diferentes en términos de producción de ACCM (valor p de  $7.19 \times 10^{-10}$ ,  $5.94 \times 10^{-10}$ ,  $2.1 \times 10^{-4}$  y  $1.37 \times 10^{-5}$  para los ácidos valérico, hexanoico, heptanoico y octanoico, respectivamente). Además, el etanol y el ácido acético no se consumieron por completo, lo que indica que no fueron el reactivo limitante (Figura 7).

La microbiota endógena del vino tinto promovió la producción de ACCM de 6 y 7 carbonos. La formación de ácido hexanoico se detectó a partir del cuarto día, correspondiendo al mayor porcentaje de consumo de etanol (39.3%) de todos los inóculos utilizados. Después de 20 días de fermentación, se produjeron ácidos hexanoico (5.97 g/L) y heptanoico (0.97 g/L). Se observó que el proceso de  $\beta$ -oxidación inversa convirtió primero el acetato y el etanol en butirato, cuya concentración aumentó en las primeras 24 h. Posteriormente, la concentración de butirato disminuyó, lo que indica que el butirato se elongó para producir ácido n-hexanoico (Ding *et al.*, 2010). También es posible observar que la concentración de ácido valérico disminuyó en un 30%, lo que sugiere que el ácido valérico se elongó a heptanoato (día 20). La microbiota endógena del efluente del vino blanco mostró un comportamiento similar al de la microbiota procedente de la producción de vino tinto, comenzando la producción de ácido hexanoico al cuarto día. Se detectó formación de ácido hexanoico (3.97 g/L) y heptanoico (0.56 g/L) después de 20 días, además de butirato. En este caso, el porcentaje de consumo de etanol fue del 32.8%.

La formación de ACCM con el lodo granular fue más lenta que con el inóculo del efluente vitivinícola ya que se detectó ácido hexanoico hasta el octavo día. Este resultado puede explicarse por el hecho de que los microorganismos del lodo granular necesitaban adaptarse a las altas concentraciones de etanol, mientras que la microbiota endógena presente en los efluentes de vino tinto ya está adaptada a concentraciones elevadas de etanol, reduciendo el tiempo de latencia. Sin embargo, la producción de ácido hexanoico del lodo granular (3.7 g/L) fue similar a la obtenida para los inóculos de vino blanco. El butirato se detectó al octavo día de fermentación, con una producción lineal durante todo el experimento. El porcentaje de consumo de etanol fue del 25.2%. La menor producción de ACCM (0.54 g ácido hexanoico/L) y consumo de etanol (8.5%) se observó con el digestato acidogénico. Este resultado puede explicarse considerando que la mayoría de las bacterias presentes pueden no tener la capacidad de realizar la  $\beta$ -oxidación inversa. Además, los inóculos del digestato acidogénico y el lodo granular no generaron ACCC impares, como propionato, lo que explica la ausencia de valerato y, por lo tanto, de heptanoato, ya que estos ácidos son precursores para el proceso de elongación de la cadena (Lonkar and Holtzapple, 2016).





**Figura 7.** Consumo de etanol y ácido acético en función del tiempo para los diferentes inóculos analizados. (A) efluente de vino tinto; (B) efluente de vino blanco; (C) lodo granular anaerobio; (D) digestato acidogénico y (E) fluido ruminal.

Los inóculos de fluido ruminal produjeron ácidos butírico, valérico, isovalérico, hexanoico, heptanoico y octanoico en un período de 22 d (Figura 8). Considerando la alta diversidad de ACCM obtenida con este inóculo, se realizó un segundo lote para evaluar las capacidades del inóculo. El experimento completo duró 44 días y se dividió en dos lotes. El segundo lote comenzó a los 22 días, momento en el que se añadió más sustrato (15 g de etanol y 3 g de acetato). Para este inóculo, una prueba ANOVA de factor único entre ambos lotes indicó una diferencia significativa para la producción de ACCM, excepto para el ácido heptanoico (valor de p de 0.0109, 0.00389, 0.0727 y 0.0321 para los ácidos valérico, hexanoico, heptanoico y octanoico, respectivamente).

Durante el primer lote, la formación de ácido hexanoico comenzó después de 11 días, lo que indica que se necesitaba un período de adaptación más largo que el de los otros inóculos probados. La producción máxima de ácido hexanoico se alcanzó el día 21 (3.81 g/L) en el primer lote y la concentración alcanzó los 5.97 g/L para el segundo lote. Es importante señalar que, de todos los inóculos estudiados con este inóculo, se produjo la mayor concentración de valerato (1.22 g/L), y posteriormente el valerato se convirtió en ácido heptanoico durante el segundo lote (2.10 g/L). El ácido octanoico (2.79 g/L), además de los ácidos hexanoico y heptanoico, se generó cuando el fluido ruminal fue el inóculo (Figura 8) en el día 22. Después de 33 días, la concentración de ácido hexanoico alcanzó una producción de 5.97 g/L. El porcentaje total de consumo de etanol fue de 44% y 58% para el primer y segundo lote, respectivamente. Los rendimientos de producción de ACCM utilizando fluido ruminal e inóculos de vino tinto fueron de 0.11 g DQO ACCM/g DQO y 0.10 g DQO ACCM/g DQO.

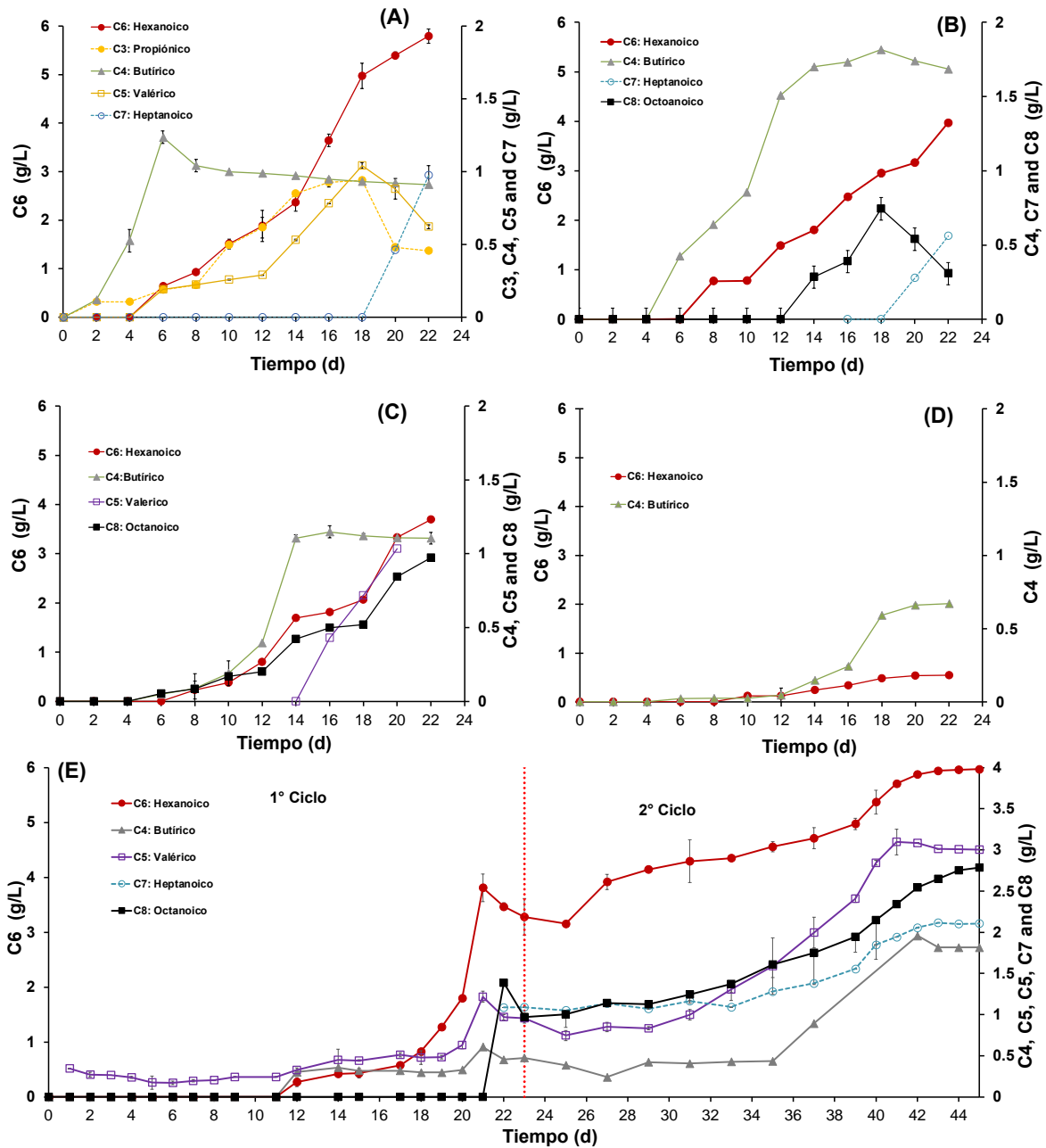


Figura 8. Producción de ACCM en función del tiempo para los diferentes inóculos probados. (A) efluente de vino tinto; (B) efluente de vino blanco; (C) lodo granular anaerobio; (D) digestato acidogénico y (E) fluido ruminal.

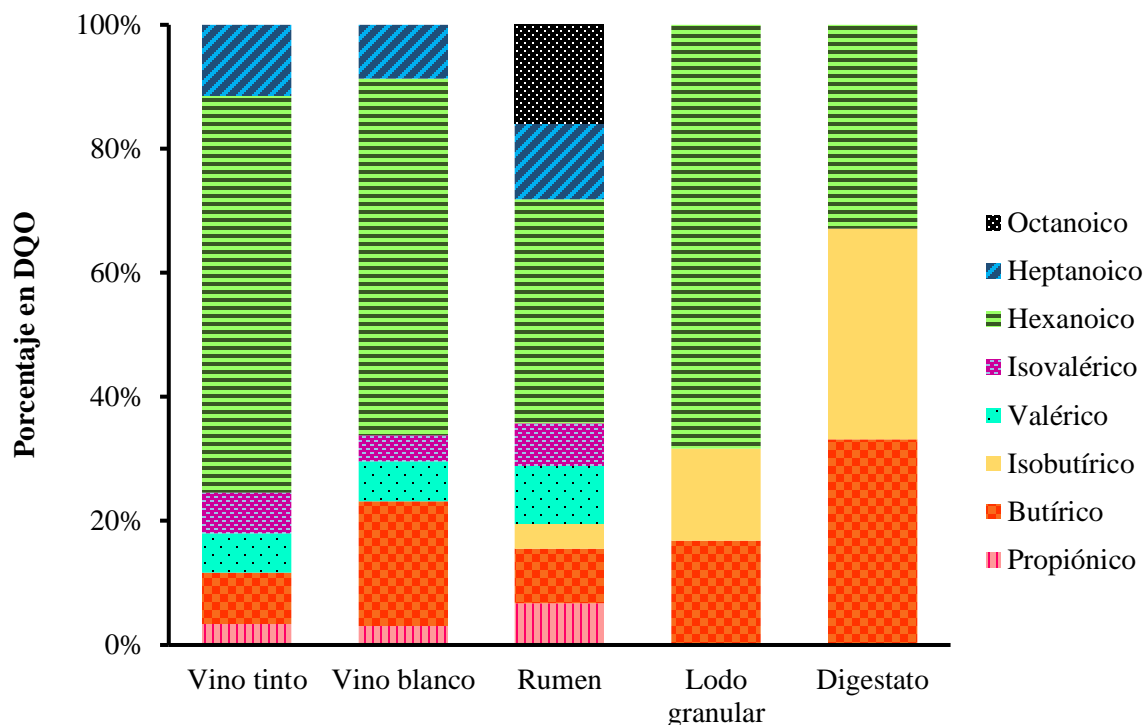
La disminución en la producción de ACCM podría deberse a las altas concentraciones de etanol presentes durante la fermentación. Lonkar *et al.*, (2016) mostró que la eficiencia de conversión de etanol disminuyó de más del 80% a menos del 25% cuando la concentración inicial de etanol aumentó de 5 a 40 g/L. Otra posible explicación para la baja generación de ACCM podría ser la inhibición debida a la acumulación de ACCM. Se ha informado que el ácido hexanoico en altas concentraciones puede provocar toxicidad para la microbiota. En la literatura ha sido reportada una amplia gama de concentraciones de ácido hexanoico (0.8 g/L a 8.6 g/L) en medios de fermentación (Liu and Jarboe, 2012; Weimer *et al.*, 2015; Steinbusch *et al.*, 2011; Lonkar *et al.*, 2016; Vasudevan *et al.*, 2014; Ganigué *et al.*, 2016).

En consecuencia, se ha propuesto que la separación del ácido hexanoico de los medios de fermentación puede mejorar el rendimiento final (Jeon *et al.*, 2013).

La mayor producción de ácido hexanoico en este estudio se obtuvo utilizando la microbiota efluente de vino tinto (5.8 g/L) o blanco (3.97 g/L). La diferencia en cuanto a producción de ácido hexanoico entre ambas microbiotas de efluentes vitivinícolas se puede explicar por el mayor contenido de carbohidratos en la biomasa del primero. Seguido en cuanto a productividad siguieron los lodos granulares anaerobios (3.7 g/L) y el fluido ruminal (3.5 g/L). La menor producción de ácido hexanoico se obtuvo con el digestato acidogénico (0.547 g/L). La productividad de ácido hexanoico obtenida con el inóculo del efluente de vino tinto fue de 0.26 g/L-d en un periodo de 22 d, y se obtuvo un rendimiento de 0.61 g DQO ACCM/g DQO. Este valor es muy similar (0.33 g/L-d) al obtenido utilizando un cultivo puro de *C. kluyveri* (Grootscholten *et al.*, 2013). En dicho estudio se alcanzó la máxima producción de ácido hexanoico (12 g/L) en un periodo de 38 d con un rendimiento de 0.56 g DQO ACCM/g DQO. Estos resultados confirman la idoneidad de la microbiota nativa en términos de productividad y rendimiento, generando una cantidad equivalente de ACCM sin las desventajas de manejar un cultivo puro. Esta característica es significativa cuando se van a utilizar aguas residuales y otros desechos agroindustriales para la producción de ACCM.

No se produjo ácido heptanoico con el lodo granular anaerobio ni con el digestato acidogénico. Esto debido a la ausencia de ácido propiónico cuando se usaron estos dos inóculos, ya que el ácido propiónico es precursor del ácido valérico el cual a su vez es necesario para la formación del ácido heptanoico. Grootsholten *et al.* (2020) informaron de la producción de heptanoato (3.2 g/L) cuando se añadía ácido propiónico (10.4 g/L) a una mezcla de etanol y acetato (proporción ETOH/AA de 19.5/0.9) para promover la elongación del butirato. En el presente estudio, se produjo heptanoato al utilizar fluido ruminal (1.09 g/L) y los microorganismos autóctonos presentes en los inóculos de efluentes de vino tinto y blanco (0.97 y 0.56 g/L, respectivamente). Aunque se observaron concentraciones más bajas de ácido heptanoico en comparación con las de otros estudios, vale la pena considerar que no se agregó propionato externo para la elongación. La presencia residual de lactato (800 mg/L) en el rumen podría haber inducido la formación de estos ACCM por  $\beta$ -oxidación inversa usando dos fuentes donadoras de electrones (Weimer *et al.*, 2015). El fluido ruminal fue el único inóculo con el que se formó ácido octanoico (1.38 g/L).

La Figura 9 muestra el porcentaje en DQO de los metabolitos cuantificados a los 22 días para cada uno de los inóculos utilizados. La mayor proporción de ácido hexanoico (24.7%) se obtuvo con el efluente vitivinícola (vino tinto) seguido del de vino blanco (17.0%) y lodos anaerobios granulares (15.9%). Aparte del ácido hexanoico, también se produjeron ácidos heptanoico y octanoico con fluido ruminal. Esos resultados subrayan las capacidades de estas dos microbiotas naturales.



**Figura 9.** Porcentaje de los metabolitos cuantificados (como DQO) a los 22 días para cada uno de los inóculos utilizados.

La Tabla 5 resume las concentraciones máximas de ácido carboxílico y las productividades volumétricas y específicas para cada inóculo analizado. El inóculo recolectado del efluente de vino tinto presentó las mayores productividades volumétricas y específicas de ácido hexanoico (263 g ácido hexanoico/L-d y 13 g/g ST/d), seguido por el efluente de vino blanco y el lodo anaerobio granular. Las productividades más bajas se observaron para el digestato fermentativo. El fluido ruminal generó ACCM en el primer lote con productividades equivalentes a las obtenidas con el efluente de vino blanco y lodo granular. Sin embargo, en el segundo lote, las tasas de producción de ACCM casi se duplicaron (Tabla 5), lo que indica que se produjo cierta adaptación del microbioma. Este es un resultado prometedor que sugiere que la operación del reactor por lotes consecutivos o modo continuo puede aumentar las tasas de producción de ACCM. A partir de estos resultados, es posible concluir que tanto los fluidos ruminales como los efluentes vitivinícolas son una fuente prometedora de microbiomas nativos.

**Tabla 5.** Valores promedio y desviación estándar (DE) para la concentración máxima de ácido carboxílico y las tasas de formación volumétrica y específica para cada inóculo probado.

	<b>Máxima concentración (g/L)</b>		<b>Productividad volumétrica (g/L-d)</b>		<b>Productividad Específica (g/gTS/d)</b>	
	Promedio	D.E	Promedio	D.E	Promedio	D.E
<b>Fluido Ruminal 1er lote</b>						
Butírico	0.61	0.03	29.05	1.62	1.45	0.08
Valérico	1.20	0.03	57.14	1.43	2.86	0.07
isovalérico	0.72	0.07	32.73	3.18	1.64	0.16
Hexanoico	3.81	0.06	181.43	2.86	9.07	0.14
Heptanoico	1.09	0.02	49.36	0.91	2.47	0.05
Octanoico	1.39	0.03	63.18	1.36	3.16	0.07
<b>Fluido Ruminal 2do lote</b>						
Butírico	1.86	0.09	80.87	4.27	4.04	0.22
Valérico	3.00	0.28	130.43	13.14	6.52	0.66
isovalérico	1.86	0.39	80.87	16.80	4.04	0.84
Hexanoico	5.97	0.18	259.57	7.98	12.98	0.40
Heptanoico	2.10	0.40	91.30	17.39	4.57	0.86
Octanoico	2.79	0.36	121.30	9.33	6.07	0.47
<b>Efluentes (vino tinto)</b>						
Butírico	0.91	0.013	43.38	0.62	2.17	0.03
Valérico	0.88	0.013	41.90	0.62	2.10	0.03
Hexanoico	5.79	0.14	263.18	6.36	13.16	0.32
Heptanoico	0.97	0.06	44.09	2.73	2.20	0.14
<b>Efluentes (vino blanco)</b>						
Butírico	1.57	0.3	71.36	13.64	3.57	0.68
Valérico	0.48	0.004	21.82	0.18	1.09	0.01
Hexanoico	3.97	0.29	180.45	13.18	9.02	0.66
Heptanoico	0.56	0.03	25.45	1.36	1.27	0.07
Octanoico	0.31	0.06	14.09	2.73	0.70	0.14
<b>Lodo granular anaerobio</b>						
Butírico	1.10	0.19	50.00	8.64	2.50	0.43
Valérico	1.03	0.01	46.82	0.45	2.34	0.02
Isovalérico	0.64	0.01	30.48	0.52	1.52	0.03
Hexanoico	3.70	0.10	168.18	4.55	8.41	0.23
Octanoico	0.97	0.01	44.09	0.45	2.20	0.02
<b>Digestato acidogénico</b>						
Butírico	0.67	0.04	30.45	1.82	1.52	0.09
Hexanoico	0.54	0.62	24.55	28.18	1.23	1.41

### 4.3.2 Análisis de la comunidad microbiana

Se realizaron análisis filogenéticos de la secuencia del gen 16S rRNA en los niveles de phylum y clase para caracterizar las comunidades microbianas (Figura 10A y 10B). Como los rendimientos más bajos se obtuvieron con el inóculo de digestato (Tabla 1) en comparación con los otros inóculos utilizados en este estudio, no se realizó la caracterización microbiana para este inóculo.

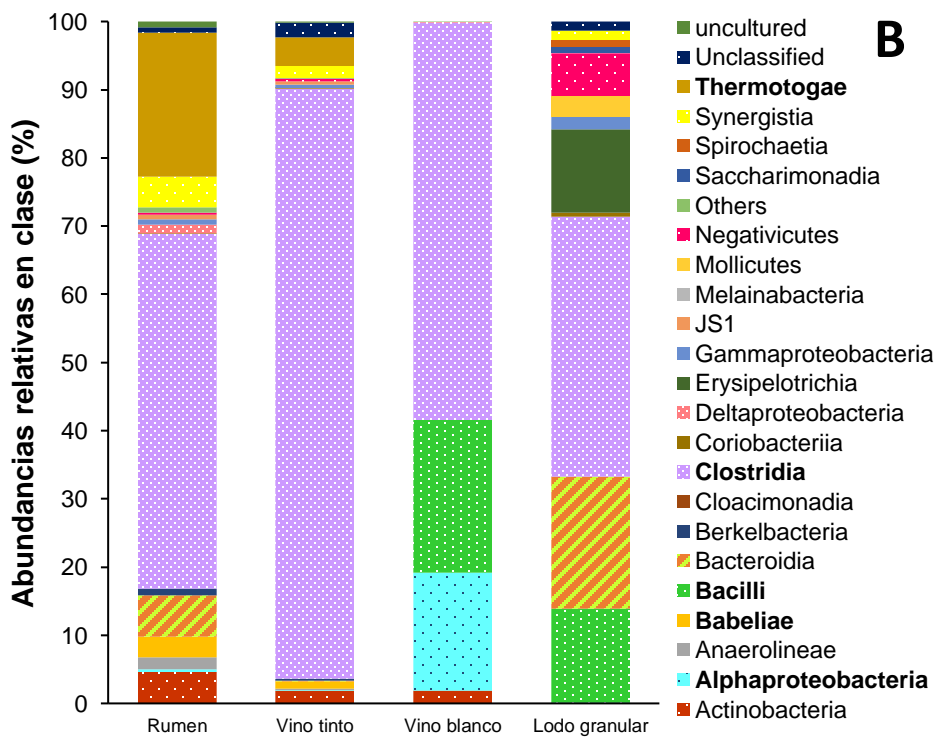
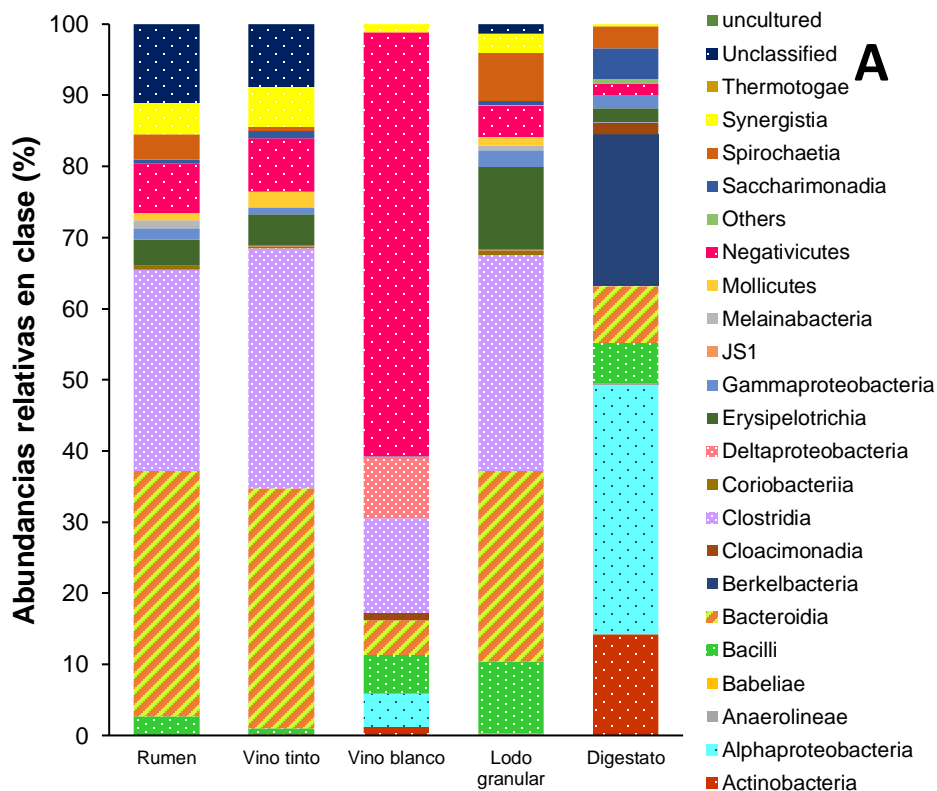
La clase Clostridia es una de las principales clases de microorganismos que contribuyen al proceso de elongación de la cadena (Angenent *et al.*, 2016; Bornstein and Barker, 1947; Thauer *et al.*, 1968). Curiosamente, se encontró que *Clostridium* estaba presente en una abundancia relativa muy baja (3%) en el inóculo de digestato.

Este hecho puede sugerir que las bacterias pertenecientes a la clase Clostridia son microorganismos clave y necesarios en una alta proporción en el inóculo al inicio del cultivo para tener una cantidad relativamente alta de producción de ACCM, como fue el caso de los otros cuatro inóculos (Figura 9A). Las OTU detectadas en los inóculos iniciales analizados sugieren la presencia de Clostridia, Bacilli y Negativicutes que se han descrito como responsables del alargamiento de la cadena (Agler *et al.*, 2012; Kuceck *et al.*, 2016; Angenent *et al.*, 2016; Kuceck *et al.*, 2016b; Jeon *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020). Se ha informado que el filo Firmicutes contribuye positivamente a la elongación de la cadena y está significativamente enriquecido en los microbiomas presentes en los efluentes de vino tinto y el fluido ruminal (Agler *et al.*, 2012; Kuceck *et al.*, 2016; Angenent *et al.*, 2016). La clase Negativicutes se ha asociado con la producción de ACCM (Jeon *et al.*, 2017). Adicionalmente, en el fluido ruminal se encontró Gammaproteobacteria, cuya participación en el proceso de elongación de la cadena ha sido descrita (Kuceck *et al.*, 2016). Coriobacteria (observada en el fluido ruminal y en la microbiota de los efluentes vitivinícolas) puede estar asociada con la generación de ácido octanoico (Kuceck *et al.*, 2016). La abundancia relativa de *Clostridium* encontrada en todos los inóculos sugirió la fuerte adaptabilidad y capacidad metabólica de este microorganismo. Estudios previos con inóculos similares también revelaron correlaciones positivas entre la productividad de ACCM y la abundancia relativa de OTU para *Bacteroides spp.* y *Oscillospira spp.* cuando los donadores de electrones eran



lactato y etanol, respectivamente (Kuceck *et al.*, 2016; Angenent *et al.*, 2016; Kuceck *et al.*, 2016b). Spirochaetia, presente en gran abundancia, son bacterias fermentativas que producen acetato, etanol, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.

Después de la fermentación, Clostridia fue claramente la clase más abundante. Cabe señalar que este microorganismo estuvo presente en gran proporción tanto en el fluido ruminal como en los inóculos de efluentes vitivinícolas. Dado que estos dos inóculos presentaron el mayor rendimiento, se puede sugerir que Clostridia fue la razón de tan buen rendimiento. La abundancia relativa para los cuatro inóculos evaluados pasó de 13-33% para la condición inicial a 38-86% al final de la fermentación (Figura 4B). Se detectaron especies como *Clostridium luticellarii*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sp.*, *Clostridium carboxidivorans* y *Clostridium cellulolyticum*. Las OTU de *Clostridium cellulolyticum* representaron la mayor abundancia observada en las cuatro biomásas ensayadas al final de la fermentación y, seguidas por *Clostridium kluyveri* encontradas los efluentes de vino tinto y blanco. Esa observación se correlaciona bien con el inóculo que presenta la mayor productividad (inóculo de vino tinto) que presenta un 86% de abundancia relativa para *Clostridium cellulolyticum*. También se detectaron *Lactobacillus hilgardii* y *Lactobacillus parafarraginis* DSM 18390 (clase Bacilli) al final de la fermentación utilizando nativos del efluente de vino blanco. Se ha descrito que esos microorganismos están presentes durante la formación del ácido hexanoico (Contreras-Dávila *et al.*, 2020). Para el inóculo más versátil (líquido ruminal) que generó ácidos carboxílicos de cadena más larga, como los ácidos heptanoico y octanoico, aumentó la abundancia relativa de cuatro clases de bacterias. Clostridia aumentó de 28% en el inóculo a 51% al final de la fermentación, la clase Thermotoga pasó de 0 a 21% donde el género *Mesotoga* está involucrado en la degradación sintrófica de acetato (Klang *et al.*, 2020), Actinobacteria de 0 a 5% y Babeliae de 0 a 3% (Figuras 10A y 10B). Bacteroidales como *Prevotella* están asociados con la producción de propionato, isobutirato e isovalerato, lo que puede explicar la formación de ácido heptanoico reportada en este trabajo cuando se usa el rumen como inóculo (Henderson *et al.*, 2015). Se ha informado que *Olsenella*, perteneciente a la clase Actinobacteria, está involucrada en el proceso de elongación de la cadena y estaba presente en el fluido ruminal, así como en la biomasa del lodo granular (Liu *et al.*, 2020).



**Figura 10.** Caracterización microbiana de los diferentes microbiomas probados (nivel de clase) para las comunidades bacterianas: A) Inóculo inicial; B) estado final después de la fermentación (día 22).

#### 4.4 CONCLUSIONES

Se determinaron las capacidades de diferentes cultivos endógenos para la generación de ACCM. Se obtuvieron productividades de ACCM similares con los cultivos mixtos evaluados que aquellos que utilizan cepas puras reportadas en la literatura, lo cual es relevante en términos de escalamiento e implementación industrial del proceso. Se encontró que la presencia de *Clostridium* es esencial en un inóculo de cultivo mixto eficiente. En este sentido, los cultivos que mostraron mayor potencial para la producción de ACCM fueron el cultivo con la microbiota nativa presente en los efluentes vitivinícolas y el cultivo con la microbiota nativa en el fluido ruminal esto debido a que con los microorganismos nativos de efluentes vitivinícolas se obtuvo la mayor concentración de ácido hexanoico y aunque con el inóculo del fluido ruminal se obtuvo una concentración menor de C6, éste resultó más versátil ya que se generaban ácidos carboxílicos de cadena más larga, como los ácidos heptanoico y octanoico. El cultivo de digestato acidogénico produjo la concentración más baja de ácido hexanoico, limitada por la ausencia de Clostridia en el inóculo

## CAPÍTULO V

### **Producción de ACCM utilizando un consorcio nativo de efluentes vitivinícolas enriquecido con microorganismos ruminales**

#### **Resumen**

La bioaumentación es un proceso en el cual generalmente se agrega una cepa pura con características específicas a un cultivo que permita mejorar el desempeño del cultivo. Sin embargo, aunque este proceso ha podido incrementar las productividades de ACCM también ha conllevado a un incremento en los costos de producción de estos, debido no solo por la utilización de las cepas puras sino además por la necesidad del uso de medios específicos y condiciones estériles para conservar la comunidad microbiana durante el proceso. En este trabajo, para incentivar la producción de ACCM de cadenas más largas (como ácido octanoico), se realizó el estudio del enriquecimiento con microorganismos ruminales en diferentes concentraciones a una microbiota endógena de efluentes vitivinícolas, evitando así el uso de cepas puras. Fue posible producir ACCM de cadena de 6 y 8 carbonos. La mayor producción de ácido hexanoico fue de 12.42 g/L en un periodo de 26 días utilizando una proporción 80/20% microorganismos nativos de efluentes de vino tinto (VT)-rumen (R), seguido por la producción de 3.97 g/L en el mismo periodo de tiempo por la microbiota de 50/50% VT-R. Sin embargo, utilizando una concentración mayor de rumen fue posible producir además de ácido hexanoico (8.52 g/L), 4.1 g/L de ácido octanoico, ACCM con mayor valor agregado. Estos resultados muestran que los cultivos abiertos utilizados son capaces de adaptarse y mantener una relación sintrófica favoreciendo la producción de ACCM en mayor concentración y con cadenas más largas, por lo que podrían resultar en una gran alternativa para sustituir la utilización de cepas puras en procesos de bioaumentación.

## 5.1 INTRODUCCIÓN

Muy pocos microorganismos actualmente aislados pueden sintetizar ácido hexanoico, y entre ellos se encuentran *Eubacterium pyruvativorans*, *Megasphaera elsdeni*, *Clostridium sp.* BS-1 y *Clostridium kluyveri*. A pesar de la producción de ácido hexanoico por otros microorganismos, el productor más conocido es *C. kluyveri* (Kenealy *et al.*, 1995). Cuando se usan sustratos complejos como fuentes de carbono y energía, se necesitan otras especies en el cultivo abierto para producir los precursores (ácidos acético y butírico) para el alargamiento de la cadena (Kumar *et al.*, 2015). Por lo tanto, una forma de mejorar el proceso de alargamiento de la cadena carboxílica podría ser mediante la adición de un microorganismo específico a un cultivo en un proceso denominado bioaumentación. Este procedimiento se ha utilizado para aumentar la producción de metano e hidrógeno con arqueas, así como con microorganismos facultativos y acidogénicos (Tale *et al.*, 2015)

Weimer *et al.*, (2015), obtuvieron una producción máxima de 6.1 g/L de ácido hexanoico utilizando microorganismos ruminales enriquecidos con *Clostridium kluyveri*. Sin embargo, este proceso puede resultar más costoso y complejo en cuanto a control y mantenimiento de la cepa durante la operación del proceso.

Como ya se ha mencionado el uso de consorcios nativos en lugar de cepas puras en el proceso de elongación de cadena presenta diversas ventajas que minimizan los costos y permiten la operación de reactores de manera continua.

Además, se sabe que los cultivos abiertos tienen una mayor producción de metabolitos, un crecimiento bacteriano de alta diversidad e interacciones sintróficas entre microorganismos (Agler *et al.*, 2011).

Entre los cultivos nativos para la producción de ACCM más utilizados se encuentra el fluido ruminal, debido a su diversidad poblacional en la que se han identificado microorganismos como *Megasphaera elsdeni*, *Megasphaera hexanoica sp.*, *Eubacterium limosum* y *Eubacterium pyruvativorans* los cuales son capaces de realizar el proceso de  $\beta$ -oxidación inversa (Dams *et al.*, 2018; Jeon *et al.*, 2017; Weimer y Kohn, 2016; Kenealy *et al.*, 1995).

Con la finalidad de mejorar la producción de ACCM, en esta etapa de la experimentación, se evaluó la implementación de un tipo de bioaugmentación utilizando los inóculos con mejor desempeño en la etapa anterior: fluido ruminal en donde además de ácido hexanoico (C6), fue posible obtener ácido octanoico (C8) y la microbiota nativa del efluente vitivinícola, la cual está constituida en mayor proporción por microorganismos del género *Clostridium* de acuerdo a la información obtenida del análisis microbiano y con la cual se obtuvo la mayor producción de ácido hexanoico.

## **5.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***5.2.1 Preparación de inóculo***

Los inóculos fueron seleccionados de acuerdo con la presencia de microorganismos reportados capaces de llevar a cabo la elongación de cadena y al mejor desempeño mostrado en la primera etapa de este trabajo. Se trabajó con **a)** un consorcio nativo del efluente vitivinícola (vino tinto), proveniente de una cava de vino en la ciudad de Querétaro. La microbiota se tomó de la fracción sólida sedimentada, la cual se mantuvo a temperatura ambiente por 72 h, **b)** fluido ruminal de borrego, proveniente de un rastro de la ciudad de Querétaro, el rumen se mantuvo en una incubadora a 37 °C por un periodo de no más de 2 h hasta ser utilizado.

### ***5.2.2 Condiciones experimentales***

Los experimentos se realizaron en botellas serológicas de 120 ml con un volumen de trabajo de 80 mL; El espacio de cabeza se purgó con N<sub>2</sub> durante 20 s, posteriormente las botellas se incubaron a 37 °C con agitación a 150 rpm durante 22 días. Cada experimento se realizó por triplicado.

Como sustrato se utilizó un medio sintético constituido por un medio mineral (Angelidaki *et al.*, 2009), un buffer de fosfatos como solución amortiguadora de pH constituido por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, con la finalidad de evitar la inhibición por la disminución del pH al producir ACCM y como donadores y aceptores de electrones se utilizaron reactivos analíticos. La relación utilizada fue 500/84 mM; 23/5 g/L ETOH/AA

Las relaciones utilizadas en el enriquecimiento del inóculo fueron: 100/0, 80/20, 50/50, 20/80 y 0/100% nativos de efluentes vitivinícolas/rumen. Todas las botellas fueron inoculadas con 2 g de ST/L de cada inóculo en las relaciones mencionadas anteriormente, el pH se ajustó a 5.5 con hidróxido de sodio 5 M.

### 5.2.3 Métodos analíticos

Para la cuantificación de metabolitos estos se determinaron de acuerdo con lo descrito en la metodología general. La determinación de sólidos totales y volátiles se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en los métodos estándar (APHA, 2005).

## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

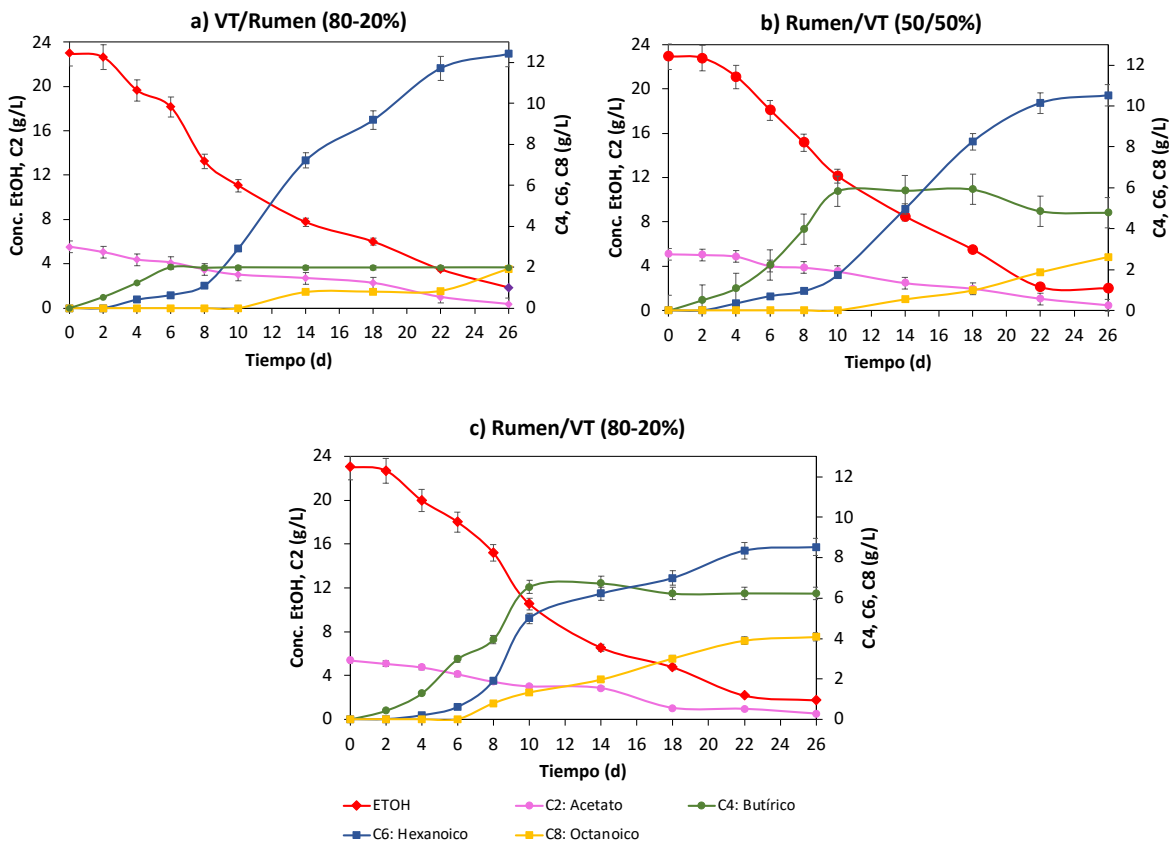
### 5.3.1 Producción de ACCM utilizando consorcios bacterianos como inóculo

En la Tabla 6, se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica correspondientes a los diferentes inóculos empleados en la experimentación.

**Tabla 6.** Caracterización fisicoquímica de los inóculos utilizados en la producción de ACCM

Caracterización fisicoquímica	Rumen	Vino tinto
DQOs (g/L)	2.5	124
pH	6	6
ST (g/L)	0.13	67.46
STV (g/L)	0.12	52.55
Lactato (g/L)	1.34	N.A

Como se mencionó en la metodología, se realizaron mediciones de AGVV cada 48 h, los resultados que se muestran representan el valor promedio de cada una de las mediciones realizadas. Las cinéticas de producción de AGVV y consumo de sustratos para las diferentes relaciones utilizadas se muestran en la Figura 11, mientras que para los cultivos utilizados como control las cinéticas se muestran en la Figura 12.



**Figura 11.** Producción de ACCM utilizando diferentes relaciones de inóculos

Como es posible observar en la Figura 11, en todos los cultivos se llevó a cabo la producción de ácido hexanoico, sin embargo el porcentaje de composición del inóculo tuvo un impacto directo no solo en la producción de este ACCM sino también en la velocidad de su producción, obteniéndose concentraciones equivalentes a casi el doble en el día 14 (7.3 g C6/L) en el cultivo VT/R (80/20%) Figura 11a, comparado con el cultivo control de vino tinto en donde en el día 14 se obtuvieron 3.8 g C6/L como es posible observar en la Figura 12.

Es importante resaltar que el enriquecimiento de la microbiota endógena con microorganismos ruminales no solo permitió la obtención de ácido octanoico en todos los cultivos, el cual no había sido posible obtener en las etapas anteriores de esta investigación utilizando solo la microbiota endógena del efluente vitivinícola, además permitió obtener los valores más elevados para este ACCM hasta ahora reportados.

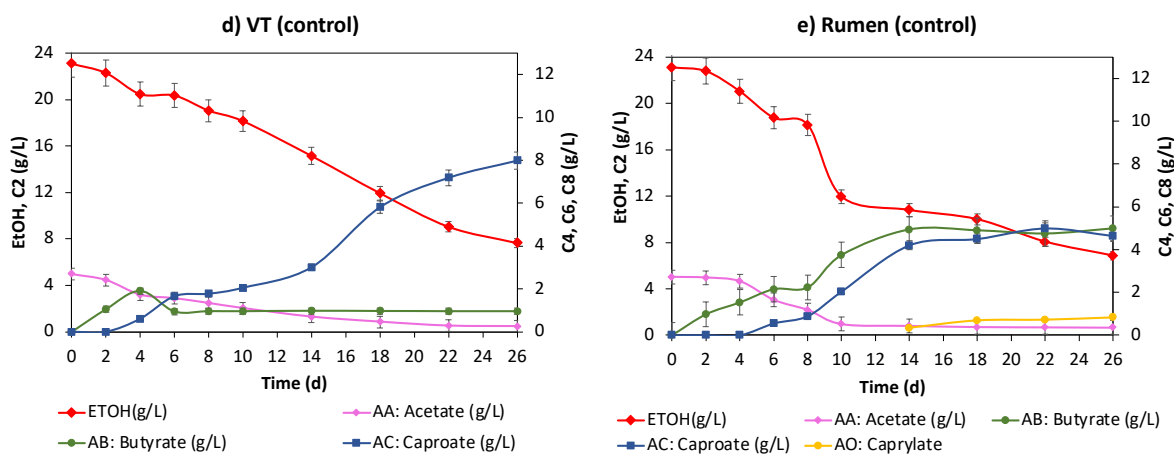


El favorecimiento en cuanto a la producción de este ACCM conformado por 8 carbonos podría deberse a diversos factores entre los que destacan las interacciones sintróficas entre los microorganismos, ya que ha sido reportado que el rumen posee diversos microorganismos productores de ácido butírico como *Clostridium acetobutylicum* (Dams *et al.*, 2018), el cual es necesario para que se lleve a cabo la elongación de cadena de manera más eficiente, ya que al no ser necesaria la elongación de cadena del acetato como primer paso, los microorganismos presentes en la microbiota del efluente vitivinícola pueden utilizar la energía del proceso para llevar la elongación de butirato hasta caprilato en 2 etapas. Esto podría confirmarse de acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 11, en donde en los cultivos con mayor concentración de microorganismos ruminales, se generó una mayor concentración de butirato, el cual mantuvo un comportamiento lineal durante todo el proceso, y fue en estos mismos cultivos donde se produjo la mayor concentración de caprilato.

En cuanto al ácido hexanoico, la mayor producción se obtuvo utilizando un cultivo con mayor concentración de microorganismos endógenos del efluente vitivinícola (Figura 11a) obteniéndose una concentración de este ACCM de 12.42 g/L en un periodo de 26 días, valor que supera 1.57 veces a los resultados obtenidos con el cultivo control en donde en el mismo periodo de tiempo se obtuvo una producción de ácido hexanoico de 7.9 g/L. En cuanto a la producción de ácido octanoico la menor producción se obtuvo con este cultivo, teniendo una producción de 1.91 g/L en el mismo periodo de tiempo. También es posible observar que el consumo de los sustratos ocurrió de manera más eficiente teniendo un consumo final de etanol correspondiente al 92% mientras que para el acetato fue del 93%.

El cultivo mostrado en la Figura 11b, constituido por 50/50% VT-R, presentó la segunda mejor producción de ácido hexanoico (10.5 g/L), además se observó un incremento en la producción de ácido octanoico, alcanzándose una concentración de 2.6 g/L. En cuanto al consumo de sustratos para este cultivo, tanto para el etanol como el acetato fue del 91%

En cuanto al cultivo mostrado en la Figura 11c, constituido 20/80% VT-R, presentó la mayor producción de ácido octanoico siendo de 4.1 g/L, valor superior a los trabajos hasta ahora reportados, además se obtuvo una producción de ácido hexanoico con este cultivo de 8.52 g/L, valor competitivo comparado con resultados obtenidos con los otros cultivos de este trabajo. Además cabe resaltar que utilizando solo un 20% de microorganismos nativos del efluente vitivinícola se logró obtener el doble de ácido hexanoico y 4 veces más de ácido octanoico comparado con el cultivo control. Este cultivo presentó además la mayor eficiencia ya que fue posible aumentar en un 50% su velocidad de producción comparado con los cultivos utilizados con rumen en experimentos anteriores en donde se requirieron tiempos más prolongados de hasta 40 días para obtener valores incluso inferiores a los obtenidos en este trabajo, lo cual podría deberse a que en el rumen la acumulación de ACCC a concentraciones de 0.15 M ocurre durante un tiempo de retención relativamente corto (1-3 d), lo que impide el establecimiento de especies de crecimiento lento como los acetógenos reductores de protones (que convierten los ACCC en acetato) y metanógenos acetoclásticos (que convierten el acetato en metano) (Ungerfeld and Kohn, 2006), además dicha mejora podría estar influenciada también a la relación 6:1 etanol/acetato utilizada en esta etapa. El consumo de etanol en este cultivo fue del 92% mientras que para el acetato fue del 91%.



**Figura 12.** Cultivos control para la producción de ACCM

En la Figura 12 se observan las cinéticas de consumo de sustrato y generación de productos para los controles de vino tinto y rumen sin bioaumentación, mostrando que para el caso del nativo de vino tinto (Figura 12 d) se obtuvo una producción de ácido hexanoico de 7.98 g/L sin embargo no se llevó a cabo la producción de ácido octanoico, lo cual podría indicar que la cantidad de energía aportada por el etanol está siendo utilizada por los microorganismos para elongar la cadena de acetato a butirato y posteriormente a caproato dificultando así que se produzca una etapa más de elongación para generar caprilato ya que la cantidad de butirato presente es muy baja comparada con los cultivos con bioaumentación mostrados en la Figura 11. En cuanto al control del fluido ruminal (Figura 12 e) aunque presenta la menor producción de ácido hexanoico (4.63 g/L), fue posible obtener la misma cantidad de este ACCM en la mitad de tiempo comparada con los cultivos en donde fue utilizada una relación 10:1 de etanol/acetato en una etapa anterior, en cuanto a la producción de caprilato, se detectó una producción de 0.85 g/L.

El consumo de sustratos por estos cultivos ocurrió de manera similar y en ambos casos fue inferior al consumido por cultivos enriquecidos, siendo de 67 y 70.3% de consumo de etanol y del 90 y 87% de acetato para la microbiota de vino tinto y rumen respectivamente.

En la Tabla 7 se resumen los rendimientos obtenidos y la comparación con otros trabajos en donde se ha llevado a cabo la bioaumentación para mejorar la producción de ACCM. En donde es posible observar que los resultados obtenidos en este trabajo presentan valores competitivos de productividad superior a la mayoría reportados, solo por debajo de Weimer *et al.*, (2015) quien obtuvo una productividad de 1.7 g/L-d utilizando una cepa pura. En este trabajo no solo se obtuvieron resultados competitivos eludiendo el uso de una cepa pura sino también fue posible obtener ácido octanoico a diferencia de otros de los trabajos mostrados que también utilizaron rumen como inóculo.

**Tabla 7.** Tasa de producción y rendimiento de ACCM (C6 y C8) reportado por diversos autores utilizando bioaumentación

<i>Inóculo</i>	<i>Substrato</i>	<i>Xmax g/L</i>	<i>Productividad g/L-d</i>	<i>Bibliografía</i>
<i>Rumen + C.kluyveri 3231B</i>	Biomasa celulósica + ETOH	6.1 C6	1.7	Weimer <i>et al.</i> , 2015
<i>Rumen + C.kluyveri ATCC 8527</i>	Celulosa purificada + ETOH	4.4 C6	NR	Kenealy <i>et al.</i> , 1995
<i>Lodo granular + Eubacterium pyruvatorans + C.kluyveri</i>	Glicerol + 200 mmol de ETOH	3.82, 1.72 C6, C8	0.27, 0.12	Grootscholten <i>et al.</i> , 2013.
80/20% VT-R	23:5 g/L ETOH/AA	12.4, 1.91 C6, C8	0.56, 0.91	<i>Este trabajo</i>
50/50% VT-R	23:5 g/L ETOH/AA	10.5, 2.6 C6, C8	0.47, 0.12	<i>Este trabajo</i>
20/80% VT-R	23:5 g/L ETOH/AA	8.5, 4.1 C6, C8	0.38, 0.2	<i>Este trabajo</i>

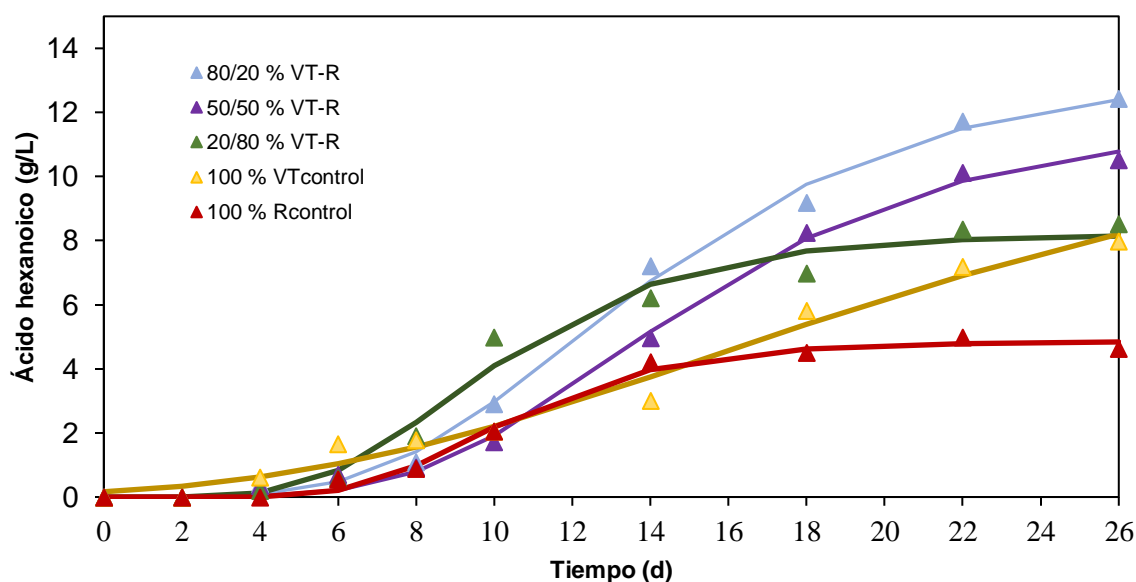
Como es posible observar en todos los trabajos reportados hasta la actualidad, la bioaumentación se lleva a cabo utilizando cepas puras teniendo como desventaja los elevados costos como se mencionó anteriormente y la pérdida de dichos microorganismos durante la operación de los reactores utilizados para el proceso.

### 5.3.2 Cinéticas de producción de ACCM

Las producciones de ácido hexanoico y octanoico utilizando diferentes relaciones de inóculos se evaluaron utilizando el modelo Gompertz modificado. En la Tabla 8 se resumen los parámetros obtenidos de la ecuación de Gompertz modificada para ácido hexanoico correspondiente a cada cultivo, y las curvas ajustadas se muestran en las Figura 13.

**Tabla 8.** Producción de ácido hexanoico calculada usando una ecuación de Gompertz modificada

Consortio	$P_{\max}$ (g/L)	$R_{\max}$ (g/L/d)	$\lambda$ (d)	$R^2$
100% VTcontrol	12.0	0.41	4.90	0.98
80/20% VT-R	13.18	0.97	6.99	0.99
50/50% VT-R	11.60	0.85	7.94	0.99
20/80% VT-R	8.19	0.89	5.40	0.98
100% Rcontrol	4.85	0.62	6.46	0.99



**Figura 13.** Ajuste del modelo de Gompertz modificado a la producción de ácido hexanoico utilizando cultivos bioaumentados en diferentes relaciones

Es posible observar que la microbiota de vino tinto enriquecida con 20% rumen presenta la producción máxima potencial de ácido hexanoico con 13.18 g/L contando además con la mejor tasa de producción 0.97 g/Ld, con el cultivo constituido por un 80% rumen se muestra el menor tiempo de latencia y la segunda mejor máxima tasa de producción siendo de 0.89

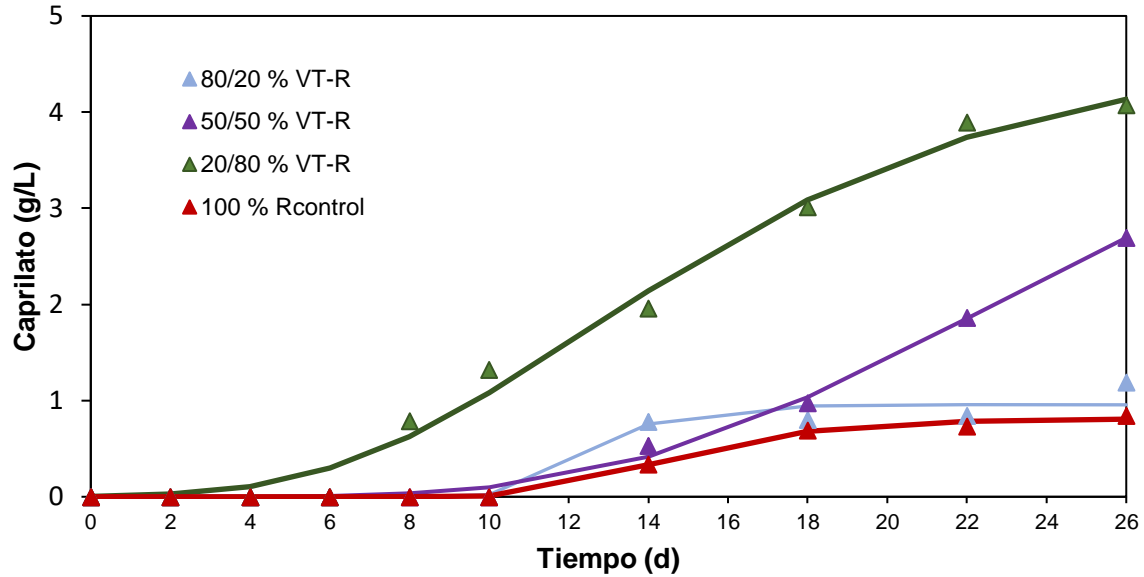
g/L-d. Aunque el cultivo constituido 50/50% VT-R presentó el mayor tiempo de latencia de 7.94 d, con este inóculo se tiene un potencial de producción de ácido hexanoico de 11.60 g/L. Todos los inóculos presentaron un buen ajuste al modelo de Gompertz modificado ( $R^2 > 0.9$ ) obteniéndose en su mayoría producciones competitivas para cultivos en lotes sin extracción de ACCM.

En la Tabla 9 se resumen los parámetros obtenidos de la ecuación de Gompertz modificada para ácido octanoico correspondiente a cada cultivo, y las curvas ajustadas se muestran en las Figura 14. En cuanto a la producción de ácido octanoico el cultivo constituido por 50-50% VT-R presentó la producción máxima potencial de ácido octanoico con 5.25 g/L contando sin embargo con el mayor tiempo de latencia de 13 días. Por otro lado, con el cultivo constituido por 80% microorganismos ruminales no solo se obtuvo la mejor tasa de producción (0.25 g/L-d), además muestra el menor tiempo de latencia con 6 días y la segunda mejor producción máxima potencial de ácido octanoico siendo de 4.63 g/L-d.

De igual manera todos los inóculos presentaron un buen ajuste al modelo de Gompertz modificado ( $R^2 > 0.9$ ) a excepción del control de vino tinto en donde no se llevó a cabo la producción de este ACCM. Los resultados menos competentes se corresponden al inóculo de control (100% rumen).

**Tabla 9.** Producción de ácido octanoico calculada usando una ecuación de Gompertz modificada

<b>Consortio</b>	<b>P<sub>max</sub> (g/L)</b>	<b>R<sub>max</sub> (g/L/d)</b>	<b>λ (d)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
80/20% VT-R	1.96	0.24	10.45	0.96
50/50% VT-R	5.25	0.22	13.37	0.99
20/80% VT-R	4.63	0.25	6.07	0.98
100% Rcontrol	0.82	0.12	11.19	0.99



**Figura 14.** Ajuste del modelo de Gompertz modificado a la producción de ácido octanoico utilizando cultivos bioaumentados en diferentes relaciones.

### 5.3.3 Análisis de la comunidad microbiana

Los resultados del análisis de la dinámica poblacional se muestran a nivel de género en la Figura 15. Es posible observar que al inicio del experimento Figura 15A, en los cultivos con mayor contenido ruminal géneros como *Lactobacillus*, *Olsenella* y *Veillonellaceae* dominaron el cultivo, presentes hasta en un 42, 19 y 11% respectivamente. Mientras que en el cultivo con una relación igualitaria de microorganismos ruminales y nativos de efluentes vitivinícolas más del 59% correspondía a la clase Clostridia con géneros como *C. sensu stricto 12* (20%), *Veillonellaceae* (12.6 %) *Clostridium* (10.7%) y *C. sensu stricto 19* (19.5%). Para los cultivos con mayor relación de nativos de efluentes de vino tinto géneros como *Clostridium* (30%) y *C. sensu stricto 12* (26%) dominaron los cultivos y los cuales relacionados positivamente con la producción de ácido hexanoico (Candry y Huang, 2020). En estos cultivos se observó menos del 1% de *Lactobacillus* y una disminución del género *Caproiciproducens*.

En la Figura 15B, se muestran las comunidades después de 31 días, en donde es posible observar que para el cultivo de rumen (R2 100%), géneros como *Veillonellaceae* UCG el cual ha sido relacionado al género *Megasphaera* y puede producir ácido hexanoico a partir de ETOH y acetato (Duber *et al.*, 2020) se enriqueció casi 3 veces alcanzando una abundancia relativa del 17.4%. Sin embargo, fue el género *Megasphaera* quien dominó el cultivo presente en un 35%.

Resulta importante resaltar que en todos los cultivos con presencia de nativos de vino tinto Clostridia fue la clase dominante, lo cual podría estar justificado a una velocidad de crecimiento mayor por parte de estos microorganismos. Kenealy y Waselefsky (1985) determinaron las tasas de crecimiento de un cultivo de *C. kluyveri* ATCC 8527 (DSM 555) en un quimiostato. Encontraron valores máximos de crecimiento de  $0.287 \text{ h}^{-1}$ , pero como no se determinó el punto de lavado, la velocidad podría ser incluso mayor. Este valor máximo es comparable a los informados para organismos acidogénicos y es más alto que los valores asumidos para consumidores de ácido n-butírico y acético en digestores mesófilos (Batstone *et al.*, 2002). Por su parte Rezvani *et al.*, (2017), estudiaron el crecimiento cinético de diferentes especies de *Lactobacillus* en medios sintéticos y reportaron velocidades de crecimiento máximo de  $0.058$  a  $0.183 \text{ h}^{-1}$ .

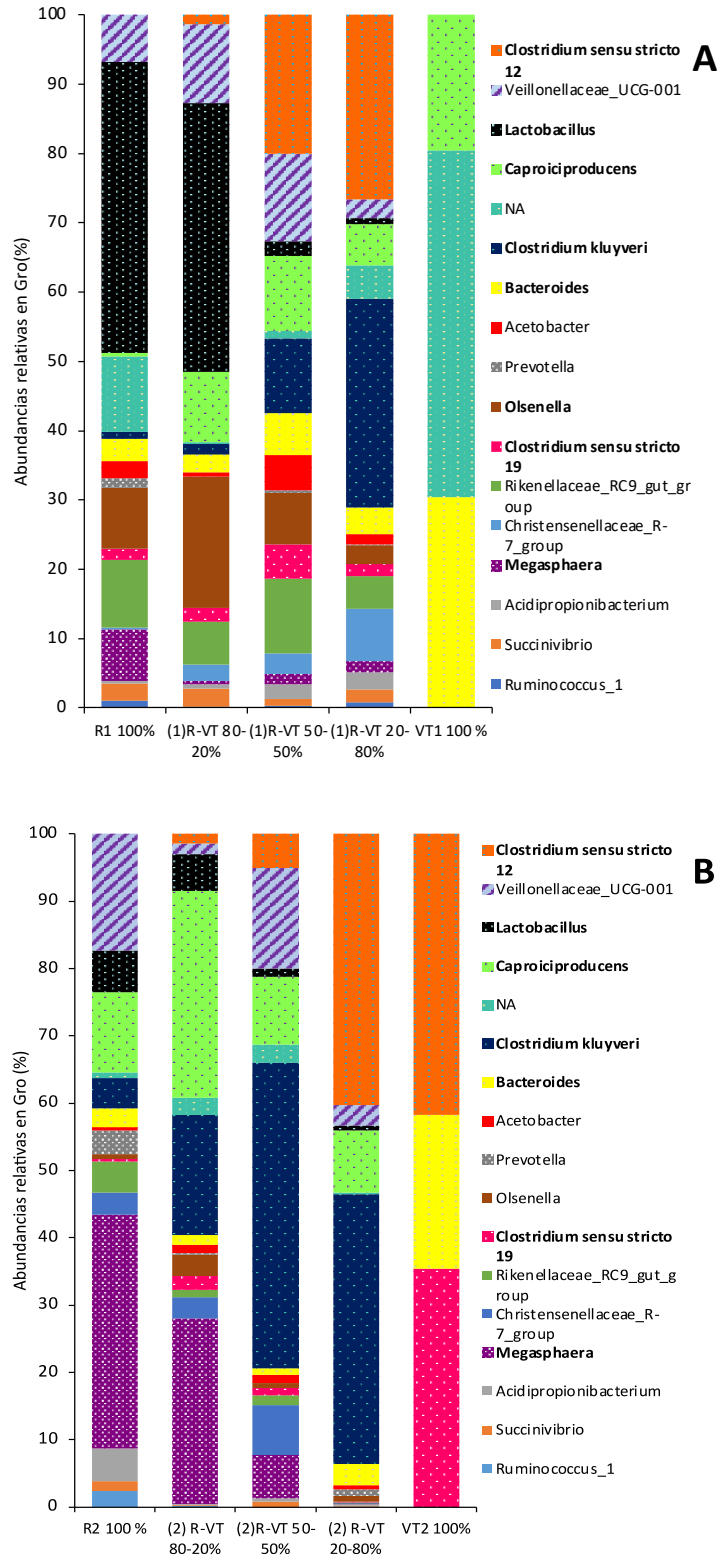
En el cultivo R-VT (80-20%) se observó la presencia de géneros como *Olsenella* y *Lactobacillus* hidrolíticos y productores de acetato lo cual podría justificar el incremento del ácido hexanoico, ya que *Caproiciproducens* y *Megasphaera* también detectados en el cultivo en un 30 y 27% respectivamente, pueden utilizar lactato como donador de electrones, por lo que la presencia de lactato pudo haber favorecido la producción de C6 a partir de otra ruta metabólicas además de la de etanol.

Contreras-Dávila *et al.*, (2020) y Candry *et al.*, (2020), observaron un microbioma enriquecido y dominado por *Lactobacillus spp.* y *Caproiciproducens spp.* En donde una alta abundancia de *Caproiciproducens* y su coexistencia con *Lactobacillus* sugirió el uso de lactato producido por *Lactobacillus* como donador de electrones por parte de *Caproiciproducens* para la elongación de la cadena.



Si bien no se ha comprobado la utilización de etanol por el género *Caproiciproducens* una disminución de su abundancia relativa cuando disminuyó *Lactobacillus* en los cultivos 50-50 y 20-80% R-VT confirma la relación de ambos géneros y la preferencia de esta bacteria por lactato. De igual manera se observó una disminución del 73% de *Megasphaera* la cual utiliza lactato para la producción de ácido hexanoico (Candry *et al.*, 2020).

Finalmente en el cultivo R-VT (20-80%) con el cual se alcanzó la mayor producción de ácido hexanoico se observó una comunidad conformada principalmente por *C.kluyveri* y *C.sensu stricto* 12, este último reportado como productor de butírico y hexanoico (Liu *et al.*, 2020). Otros géneros como *Caproiciproducens*, *Veillonellaceae* y *Bacteroides* también estuvieron presentes hasta en un 10 y 3% respectivamente.



**Figura 15.** Caracterización microbiana de las diferentes relaciones de microbiomas probados (nivel de género): A) Inóculo inicial; B) estado final después de la fermentación (día 26).

#### 5.4 CONCLUSIONES

Se encontró que para la producción de ACCM la mejor relación es aquella conformada por una proporción minoritaria de microorganismos ruminales (20%) y un 80% de nativos de efluentes vitivinícolas que permite la generación de ácido hexanoico a una velocidad de 565 mg/L-d manteniendo concentraciones competitivas de ácido octanoico (1.91 g/L) debido a la presencia de microorganismos como *C.kluyveri*, *C.sensu stricto 12*, *Caproiciproducens*, *Veillonellaceae* y *Bacteroides* que favorecen la utilización de la energía del proceso de manera más eficiente confirmando la hipótesis de que el uso de consorcios nativos presentes en los efluentes vitivinícolas fueron los responsables del favorecimiento de la producción de ACCM debido a la presencia de Clostridiales.

## CAPÍTULO VI

### **Efecto del pH y la temperatura en la producción de ácidos carboxílicos de cadena media utilizando efluentes vitivinícolas**

#### Referencia al trabajo enviado:

Villegas-Rodríguez, S, Arreola-Vargas, J, Buitrón, G., 2023. Influence of pH and temperature on the performance and microbial community during the production of medium-chain carboxylic acids using winery effluents as substrate. *Environmental Science and Pollution Research*.

#### **Resumen**

Los efluentes vitivinícolas que contienen altas concentraciones de etanol y materia orgánica diversa son sustratos ideales para producir ácidos carboxílicos de cadena media (ACCM) mediante fermentación y elongación de cadena. Sin embargo, es necesario comprender mejor el proceso debido a la necesidad de realizar más investigaciones que vinculen el funcionamiento del proceso y el análisis microbiano. En este trabajo, presentamos conocimientos novedosos sobre los mecanismos de bioconversión de ACCM al correlacionar los perfiles cinéticos de fermentación y alargamiento de cadena con el estudio de comunidades microbianas en las diferentes condiciones de pH (5 a 7) y temperaturas (30 a 40 °C). Las pruebas por lotes se realizaron utilizando una mezcla de efluentes vitivinícolas y fluido ruminal como inóculo en una proporción 20/80 microorganismos ruminales/nativos de efluentes vitivinícolas respectivamente. Como sustrato se utilizaron efluentes vitivinícolas. Nuestros resultados indican que la presencia de Clostridia (*Clostridium sensu stricto 1*, *Clostridium sensu stricto 12*, *Christenellaceae-R7*) Bacteroidia y Negativicutes promueven altas producciones de ACCM. La mayor producción de ácidos hexanoico y octanoico (13.58 y 6.65 g/L) se encontró a 35 °C y pH 6 después de 21 d de fermentación. La mayor producción de ácidos acético, propiónico y valérico se observó a valores de pH altos cuando estaban presentes microorganismos pertenecientes a los géneros *Cutibacterium*, *Veillonella* y *Aminobacterium*. El ácido heptanoico sólo se observó a 30 °C y pH 5 (5.97 g/L), correlacionado con *Mogibacterium* y *Burkholderia*. En general, esta etapa de estudio demuestra que el pH y la temperatura iniciales influyen significativamente en la proliferación

de microorganismos específicos y, por tanto, en las vías metabólicas implicadas durante la producción de ACCM.

## 6.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los factores que actualmente limitan los rendimientos de ACCM es la competencia con la generación de metano. Las estrategias propuestas para bloquear la metanogénesis, sin la adición de inhibidores químicos, incluyen el pretratamiento del inóculo por choque térmico para seleccionar bacterias formadoras de esporas que son principalmente fermentativas (Zhang *et al.*, 2018), sin embargo un pretratamiento podría afectar la presencia de otros microorganismos que si bien no realizan la  $\beta$ -oxidación inversa, mantienen relaciones sintróficas importantes en la degradación de compuestos complejos o en la formación de los ácidos carboxílicos de cadena corta (ACCC) necesarios para la producción de ACCM. Lo cual convierte al pH es uno de los factores más importantes en el proceso de elongación de cadena, ya que si se trabaja con valores bajos es posible mejorar la eficiencia del proceso al minimizar la competencia de las bacterias sulfato reductoras y de las arqueas metanogénicas las cuales son generalmente más sensibles a un pH más bajo (<6) (De Groof *et al.*, 2020).

El rendimiento máximo de producción de ácido hexanoico por *Clostridium kluyveri* se produce a un pH de alrededor de 7 (San-Valero *et al.*, 2019), además trabajar a pH cercanos a la neutralidad favorece la formación de ACCM en su forma disociada los cuales no son tóxicos para el medio (Vasudevan *et al.*, 2014). Por lo tanto, un rango de pH entre 5 y 6 podría ser adecuado para la producción de ácido hexanoico y octanoico, porque inhibe la mayor parte de la actividad metanogénica disminuyendo los efectos tóxicos de los ACCM sobre la microbiota (Wang *et al.*, 2014; Candry *et al.*, 2020).

El control de la temperatura es otro factor importante en cualquier proceso microbiológico ya que afecta la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Cada bacteria muestra una curva característica de tasa de crecimiento en función de la temperatura, al margen entre la temperatura mínima y la máxima se suele llamar margen de crecimiento, y en muchas bacterias suele comprender unos 40 grados (Forrest *et al.*, 2010).

Temperaturas por debajo de la mínima de las temperaturas reportadas como óptimas para los microorganismos productores de ACCM pueden generar un descenso de la fluidez de la membrana, de modo que se detienen los procesos de transporte de nutrientes. Mientras que una temperatura por encima de la temperatura mínima la tasa de crecimiento va aumentando proporcionalmente hasta alcanzar la temperatura óptima, debido a que las reacciones metabólicas catalizadas por enzimas se van aproximando a su óptimo. En dicha temperatura las enzimas y reacciones se dan a su máxima tasa posible. A temperaturas por encima de la óptima se produce la desnaturalización e inactivación de proteínas enzimáticas esenciales, colapso de la membrana citoplásmica y a veces lisis térmica de la bacteria (Agler *et al.*, 2011). El alargamiento de la cadena ocurre a bajas temperaturas ( $\leq 40^{\circ}\text{C}$ ) y diversos autores sugieren que las condiciones ideales de pH y temperatura no solo están relacionadas al desarrollo de los microorganismos e inhibición de la competencia por sustrato, sino que varían de acuerdo al tipo sustrato seleccionado, en donde la solubilidad e hidrólisis de compuestos complejos presentes puede verse afectada o favorecida de acuerdo a estos dos factores (Kuceck *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del pH y la temperatura en la producción de ácidos carboxílicos de cadena media, utilizando efluentes vitivinícolas como sustrato y como inóculo una mezcla de microorganismos nativos de efluentes vitivinícolas y microorganismos ruminales. Se utilizó la proporción con mejor desempeño evaluado en la etapa anterior, es decir 80% en peso de inóculo nativo de efluentes vitivinícolas y 20% en peso de microorganismos ruminales. Bajo estas condiciones se obtuvo la mayor producción de ácido hexanoico (12 g/L) y además fue posible obtener ácido octanoico (1.2 g/L) reduciendo hasta tres días el tiempo de producción de estos ACCM. Las condiciones evaluadas fueron 30, 35 y 40 °C para temperatura y 5, 5,5 y 6 para pH.

La experimentación se realizó en botellas serológicas con un volumen de trabajo de 80 mL. Se utilizaron efluentes vitivinícolas como sustrato, la relación etanol/acetato fue seleccionada de acuerdo a los mejores resultados obtenidos en la segunda etapa de esta investigación, relación (ETOH/AA): 6:1. Las botellas fueron colocadas en incubadoras de acuerdo a la temperatura de estudio y todas fueron agitadas a 150 rpm en condiciones anaerobias.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.2.1 Diseño experimental

Para este estudio fueron seleccionados tres niveles de temperatura (30, 35 y 40 °C). En donde para cada nivel de temperatura se evaluaron seis valores de pH (de 5-7) como se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Variables y niveles del diseño experimental utilizado

Variables	
Temperatura de estudio (°C)	Valores de pH evaluados
30	5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5
35	5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5
40	5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5

### 6.2.2 Inóculo

De acuerdo con los mejores resultados de la producción de ACCM en trabajos anteriores, el inóculo fue una combinación de 80% de consorcios nativos presentes en la fracción sólida sedimentada de efluentes de vino tinto (Estado de Querétaro, México) y 20% de fluido ruminal incluyendo sólidos, proveniente de un rastro de bovinos en la ciudad de Querétaro. El líquido ruminal recolectado se mantuvo a 35 °C y se utilizó dentro de las 2 h desde el momento del muestreo en el rastro. Para ambos inóculos se determinaron los sólidos suspendidos totales y volátiles.

### 6.2.3 Condiciones experimentales

Los experimentos se realizaron en botellas serológicas con un volumen de trabajo de 80 mL. Los efluentes vitivinícolas utilizados como sustrato fueron caracterizados y ajustados a una relación etanol-acetato a 6:1 (23g/ 5; 500/83 mmol o 90/10% demanda química de oxígeno, DQO). Como amortiguador de pH, el medio se complementó con medio MES (4-Morpholineethanesulfonic acid monohydrate, CAS Number: 145224-94-8) para evitar variaciones en las condiciones establecidas. El pH en cada botella fue ajustado con HCl 5 M.

Las botellas se inocularon con 1.6 g de ST, dando una concentración final de 20 g de ST/L, y el espacio de cabeza se purgó con N<sub>2</sub> por 45 segundos para asegurar condiciones anaerobias. Las botellas se colocaron en diferentes incubadoras según la temperatura correspondiente con agitación orbital a 150 rpm. Todas las mediciones y pruebas se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar.

#### ***6.2.4 Métodos analíticos***

Para la determinación de etanol y ácidos grasos volátiles, se recolectaron muestras líquidas (2 mL) cada 48 y 72 h de las botellas serológicas. Las muestras fueron centrifugadas (600 mg), y el sobrenadante se filtró usando filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m. Las muestras se preservaron agregando HCl para disminuir el pH a 2 y posteriormente se mantuvieron a 4 °C. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890B, USA.). Equipado y programado de acuerdo a las instrucciones del fabricante ya antes mencionadas.

La determinación de sólidos totales y volátiles se realizó de acuerdo con procedimiento descrito en los métodos estándar (APHA, 2005). Para la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO), se determinó de acuerdo con el método Hach, 2008.

Las tasas volumétricas para la producción de cada ácido carboxílico fueron evaluadas dividiendo la concentración máxima entre el tiempo necesario para alcanzar esa concentración. La tasa específica se calculó dividiendo la tasa volumétrica entre la concentración de sólidos totales del inóculo agregado a cada prueba.

#### ***6.2.5 Análisis de la comunidad microbiana***

Al inicio del experimento, se recolectaron muestras de todas las botellas todos los inóculos para caracterizar la composición microbiana. Sin embargo, después de la fermentación, solo se caracterizaron microbiológicamente las muestras de biomasa con la mejor producción de ACCM.



Para el muestreo, las botellas se mezclaron vigorosamente y se recolectaron muestras de 2 mL en tubos Eppendorf. Luego, las muestras se centrifugaron y los pellets de biomasa sedimentadas se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento. El ADN genómico de las muestras de biomasa se extrajo en tampón fosfato. Para la extracción de ADN, se utilizó el kit de aislamiento de ADN PowerLyzer (QIAGEN, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se determinó con un equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.). Las muestras de ADN fueron enviadas al Recurso de microbioma integrado ubicado en la Universidad de Dalhousie (Halifax, Nova Scotia, Canada) para su amplificación y secuenciación a través de la plataforma de secuenciación en masa MiSeq (Illumina, San Diego, EE. UU.). Los primers universales utilizados fueron B969F (ACGCGHNRAACCTTACC) y BA1406R (ACGGGCRGTGWGTRCAA) que amplificaron las regiones V6-V8 del rADN 16s. La integridad y concentración de las muestras de ADN se evaluaron utilizando gel de agarosa teñido con SYBR Green (1%) y se cuantificaron mediante espectrofotometría utilizando un NANODrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.).

Las secuencias se analizaron utilizando el software Rstudio (R Core Team, 2021). Se obtuvieron secuencias demultiplexadas, libres de errores y agrupadas mediante el algoritmo DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). La composición taxonómica de las muestras se determinó utilizando el clasificador 16S basado en Silva (Quast *et al.*, 2013). Se aplicaron límites de rarefacción inferiores de 5379 secuencias para el análisis de la diversidad de muestras bacterianas. El algoritmo USEARCH se utilizó para seleccionar solo secuencias no menores de 100 pb y no mayores de 250 pb con un puntaje de calidad superior a 25 (Edgar, 2013), además, las secuencias quiméricas fueron eliminadas usando UCHIME (Edgar *et al.*, 2011). Las secuencias seleccionadas se conservaron para análisis de la comunidad.

La clasificación taxonómica de cada variante de secuencia de amplicones (ASV) se realizó utilizando su secuencia de consenso, donde la secuencia se analizó en el clasificador del proyecto de base de datos ribosomales (RDP) mediante comparaciones con secuencias de alta calidad derivadas de la base de datos NCBI (Wang *et al.*, 2007).

## 6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.3.1 Producción de ACCM

Los resultados de consumo de sustrato y producción de metabolitos netos en el día 31, se muestran en la Figura 16. Los cuales están agrupados de acuerdo con la temperatura de estudio: grupo 1 (30 °C pH 5 a 7.5), grupo 2 (35 °C pH 5 a 7.5) y grupo 3 (35 °C pH 5 a 7.5). En el grupo 1 (Figura 16A), ACCM dominaron consistentemente como producto en los cultivos a valores de pH inferior a 6.5, específicamente ácido hexanoico (2.58-6.40 g/L), ácido heptanoico (C7) (1.96-5.97 g/L) y ácido octanoico (0.73- 2.01 g/L). Mientras que en los cultivos a valores de pH mayor a 6 no se observó la formación de C7 y C8, y la concentración de C6 disminuyó hasta un valor de 0.73 g/L. Por otro lado, ACCC como ácido propiónico (0.86-7.69 g/L) y ácido valérico (2.8-5.25 g/L) dominaron los cultivos.

Adicionalmente, a valores de pH mayor a 6 también se observó un incremento en la concentración de ácido acético (aceptor de electrones en el proceso de elongación) alcanzando concentraciones de hasta 3.89 g/L en el cultivo a pH 7.5.

Las concentraciones más bajas de toda la experimentación tanto de C6 como de C8 se obtuvieron en este grupo y la causa podría estar relacionada a la presencia de 1.2 g/L de lactato (proveniente del rumen utilizado como inóculo) que bajo condiciones tanto de pH como de temperatura bajos se favorece el desarrollo de microorganismos que utilizan este donador de electrones como fuente de energía mediante la ruta del acrilato, la cual es una ruta competitiva en la que el lactato se transforma en propionato (Wu *et al.*, 2019). Esta ruta es irreversible, es decir, una vez que el lactato ingresa a la ruta del acrilato, no puede volver a la ruta de  $\beta$ -oxidación inversa (Kucek *et al.*, 2016a). Además, debe tenerse en cuenta que cuando el acetato o butirato de carbono par como aceptores de electrones se reemplazan por ácido propiónico de carbono impar, se pueden generar ácidos como valérico y heptanoico como principales productos de la elongación de cadena. Y si bien el ácido heptanoico es un ACCM de mayor valor en el mercado que el ácido hexanoico, las condiciones para su generación son muy diferentes a las requeridas para ACCM pares.

En el alargamiento de cadena, cuando se usa etanol como DE, este se convierte primero en acetil-CoA. Este acetil-CoA se puede combinar con una molécula de propionil-CoA durante el alargamiento de la cadena impar, para eventualmente producir valerato. Sin embargo, por cada 5 moléculas de acetil-CoA utilizadas para producir valerato, una se oxida aún más a acetato para generar energía para la célula, este acetato luego está disponible para ser alargado hasta obtener butirato y caproato (Roghair *et al.*, 2018). En consecuencia, el alargamiento de la cadena impar siempre producirá algunos carboxilatos de cadena par en el espectro del producto. Candry *et al.*, (2020) reportó que mantener bajas las concentraciones de etanol en el sistema durante todo el crecimiento del lote y, por lo tanto, mantener bajas proporciones de etanol:propionato podría orientar el espectro de productos aún más hacia productos de cadena impar y maximizar la eficiencia del etanol hacia la  $\beta$ -oxidación inversa. Sin embargo, el impacto de este enfoque en las tasas de producción debe evaluarse cuidadosamente, ya que limitar el suministro de etanol puede obstaculizar las tasas de conversión y reducir la viabilidad del proceso.

En el grupo 2 (Figura 16B), se obtuvieron las mayores producciones de C6 y C8 alcanzando concentraciones de hasta 13.58 y 6.65 g/L respectivamente. De igual manera se observó que bajo esta condición de temperatura, pH más cercanos a la neutralidad (pH>6) favorecieron la formación de ácido propiónico (1.24-9.81 g/L) y ácido valérico (2.11-5.19 g/L). En cuanto a la producción de C7, aunque de igual manera la mayor producción (2.45 g/L) ocurrió a pH 5, esta fue 2.5 veces menor respecto a la concentración obtenida a 30 °C. A pH >6 no se llevó a cabo la formación de C7 o C8 y a pH 7.5 se inhibió completamente la formación C6. Para este grupo la formación de acetato únicamente se observó en el cultivo a pH de 7.5 con una producción de 3.12 g/L.

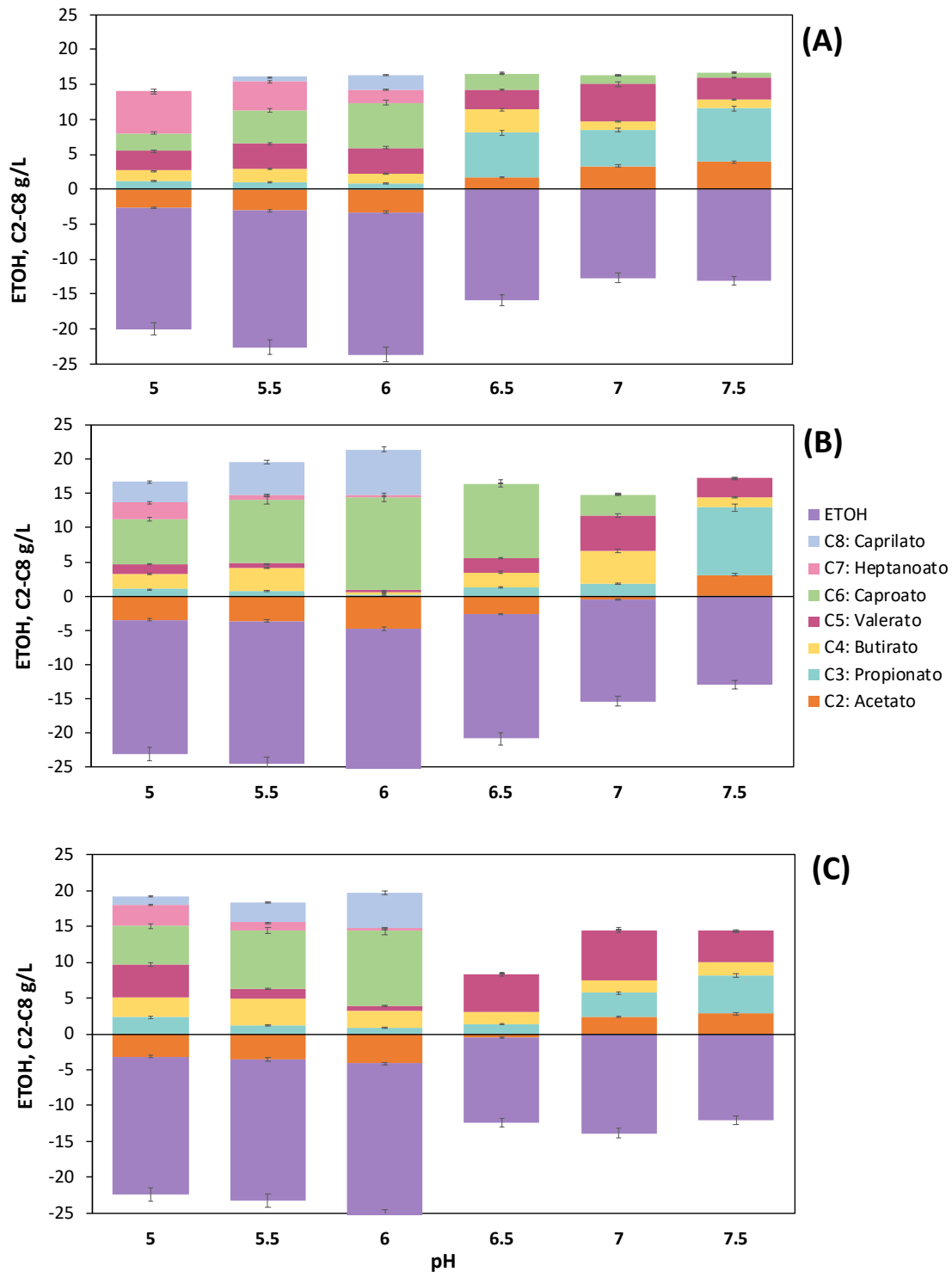
En el último grupo de estudio a 40 °C (Figura 16C) se obtuvieron las segundas mejores producciones de C6 y C8, y a diferencia de los 2 grupos anteriores, la producción de ACCM ocurrió únicamente a valores de pH ácidos, alcanzándose producciones de hasta de 10.44 y 4.98 g/L para C6 y C8 respectivamente a pH 6. Mientras que para C7 se obtuvo la mayor concentración de este grupo a pH 5 (igual que en los 2 grupos anteriores) de 2.95 g/L, muy similar a la obtenida a 35 °C. La mayor concentración de C5 (7.02 g/L) de todos los cultivos

se obtuvo bajo esta condición de temperatura a pH 7. Otras concentraciones de ACCC como acetato (2.84 g/L) y ácido propiónico (5.37 g/L) también fueron detectadas.

Como es posible observar en la Figura 16, solo en los cultivos a pH 6 se llevó a cabo un consumo mayor al 90% tanto de etanol como de ácido acético mientras que para los demás cultivos no se consumieron por completo, indicando así que no fueron el reactivo limitante. También es posible observar que para todos los cultivos que a medida que el pH se incrementó el porcentaje de consumo de etanol disminuyó. Sin embargo, caso contrario ocurrió con el acetato que al incrementarse el pH se detectó un incremento de este metabolito en los cultivos.

Para el grupo 1 el mayor consumo de etanol (90.5%) y acetato (68.90%) se observó en el cultivo a pH 6, mientras que a pH 7 se observó un consumo correspondiente al 54%. En el cultivo a pH 6 y 35 °C (grupo 2) se observó el mayor consumo de ambos sustratos de toda la experimentación siendo del 97% para el ETOH y del 97.8% de acetato.

El menor consumo de etanol (55.9%) en el grupo 2, se observó en el cultivo a pH 7.5 lo cual podría justificar la ausencia de ACCM bajo estas condiciones. Finalmente, en el grupo 3 (Figura 16C) se alcanzó un consumo de hasta el 95.13% de ETOH y del 84.5% para acetato a pH 6. El menor consumo de ETOH (52%) en este grupo se observó a pH 7.5. La formación de acetato en todos los cultivos a pH >7 coincide con los resultados obtenidos por (Luo *et al.*, 2017), en donde demostró que a valores de pH de 6.5-7 diversas especies son productoras de C2 y C3 a partir de lactato.



**Figura 16.** Tasas netas de producción y consumo durante la fermentación por lotes bajo las diferentes condiciones de pH y temperatura estudiadas: (A) 30 °C; (B) 35 °C; 40 °C. Los valores negativos indican el consumo de sustrato, mientras que los valores positivos indican la formación de productos

La disminución en la producción de los ACCM podría deberse a la inhibición debido a su acumulación en el medio. Se ha informado que el ácido hexanoico en altas concentraciones puede resultar tóxico para la microbiota (Jeon *et al.*, 2013). En la literatura se ha informado de una amplia gama de concentraciones de ácido hexanoico (0.8 g /L a 12.8 g /L) en medios de fermentación sin extracción (Vasudevan *et al.*, 2014; Weimer *et al.*, 2015; Lonkar *et al.*, 2016; Ganigué *et al.*, 2016). En consecuencia, se ha propuesto que la separación del ácido hexanoico de los medios de fermentación puede mejorar el rendimiento final (Jeon *et al.*, 2013).

La Tabla 11 resume las concentraciones máximas de ácido carboxílico y las tasas volumétricas y específicas para cada grupo de pH y temperatura estudiada. Las mejores productividades tanto de ácido hexanoico (714.95 mg/L-d) como de ácido octanoico (349.97 mg/L-d), se obtuvieron bajo condiciones de pH de 6 y una temperatura de 35 °C. La tasa de producción de ácido hexanoico más alta en este estudio es de 5 a 7.23 veces mayor que en otros estudios que trabajan con desechos orgánicos sólidos (Grootscholten *et al.*, 2013; Bolaji y Dionisi, 2017) e incluso hasta 27.2 veces mayor que el valor obtenido por Kuceck *et al.*, (2016) en un sistema continuo utilizando lias de vino como sustrato.

En los experimentos a 35 °C y pH 6.5 y 40 °C y pH 6 se obtuvo una concentración (10.85 y 10.44 g/L respectivamente) similar al máximo obtenido por Duber *et al.*, (2018) de 10.45 g/L utilizando suero de leche ácido como sustrato. Ge *et al.*, (2015), reportó un límite tóxico de 5.87 g/L para inhibir la producción de ácido hexanoico en el alargamiento de la cadena utilizando etanol como donador de electrones. Sin embargo, la concentración de ácido n-hexanoico no disociado el día 6, cuando aún se observaba formación de ácido hexanoico, superó dicho valor en todos los cultivos estudiados.

Estas observaciones muestran que la microbiota desarrollada en nuestros experimentos podría funcionar en entornos más ácidos que los informes anteriores y en presencia de concentraciones más altas de ácido hexanoico no disociado tóxico lo cual podría deberse que a que los microorganismos provenientes de efluentes vitivinícolas (utilizados como inóculo) se encuentran previamente adaptados a pH bajos así como a las altas concentraciones de etanol que poseen dichos efluentes.

Para el ácido heptanoico la mayor productividad (314.11 mg/L/d) se obtuvo a 30 °C y pH 5. Mientras que para el ácido valérico la mayor productividad (369.47 mg/L/d) se obtuvo a 40 °C y pH 7.

Grootscholten *et al.*, (2013) reportaron una producción de ácido heptanoico (3.2 g/L) cuando se añadió ácido propiónico (10.4 g/L) a una mezcla de etanol y acetato (relación ETOH/AA de 19.5/0.9) para promover el alargamiento del valerato. Posteriormente en otro trabajo de investigación Grootscholten *et al.*, (2013b) reportaron una producción de 1.5 g/L de ácido heptanoico, pero esta vez utilizando la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos como sustrato, como donador de electrones realizaron diversas adiciones de etanol en concentraciones de 100 mmol. Roghair *et al.*, 218 obtuvieron una producción de 1.8 g/L en un reactor alimentado con ácido propiónico (10.9 g/L-d) y etanol (32.5 g/L-d). En un estudio más reciente por Zhang *et al.*, (2020) separando el proceso de digestión anaerobia en dos etapas alcanzaron producciones de hasta 2.7 g/L de C7 utilizando estiércol porcino como sustrato.

En el presente estudio, se obtuvieron valores mayores a los reportados por dichos autores. Además, es importante resaltar que no se agregó propionato externo para el alargamiento siendo la presencia residual de lactato en el medio proveniente del rumen lo que favoreció la ruta del acrilato en las condiciones antes mencionadas.

La respuesta a las temperaturas probadas en este estudio indicó claramente que los microorganismos nativos de efluentes vitivinícolas prefieren el rango de temperatura de 35 a 40 °C para la producción de ácido hexanoico y octanoico. Del mismo modo, la mayoría de los microorganismos reportados productores de ácido hexanoico son mesófilos, por ejemplo, *C. kluyveri* (Weimer y Stevenson, 2012) y *M. elsdenii* (Marounek *et al.*, 1989), como se informó anteriormente.

**Tabla 11.** Valores promedio y desviación estándar (DE) para la concentración máxima de ácido carboxílico y tasas de formación volumétrica y específica para cada condición dada.

	Máxima concentración (g/L)		Productividad volumétrica (mg/L/d)		Productividad Específica (g/gTS/d)	
	Promedio	D.E	Promedio	D.E	Promedio	D.E
<b>30 °C pH 5</b>						
Butírico	1.41	0.10	74.00	5.21	3.70	0.26
Valérico	2.80	0.01	147.37	0.37	7.37	0.02
Isovalérico	1.95	0.01	102.61	0.74	5.13	0.04
Hexanoico	2.58	0.01	135.58	0.74	6.78	0.04
Heptanoico	5.97	0.08	314.11	4.09	15.71	0.20
Octanoico	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>30 °C pH 5.5</b>						
Butírico	1.87	0.01	98.45	0.74	4.92	0.04
Valérico	3.71	0.07	195.00	3.72	9.75	0.19
Isovalérico	1.41	0.02	74.21	1.12	3.71	0.06
Hexanoico	4.73	0.01	248.95	0.74	12.45	0.04
Heptanoico	4.11	0.02	216.08	1.12	10.80	0.06
Octanoico	0.73	0.04	38.16	2.23	1.91	0.11
<b>30 °C pH 6</b>						
Butírico	1.29	0.01	68.05	0.37	3.40	0.02
Valérico	3.80	0.04	200.00	2.23	10.00	0.11
Isovalérico	1.37	0.01	72.18	0.74	3.61	0.04
Hexanoico	6.40	0.07	337.05	3.72	16.85	0.19
Heptanoico	1.96	0.00	103.24	0.00	5.16	0.00
Octanoico	2.02	0.64	106.21	33.49	5.31	1.67
<b>30 °C pH 6.5</b>						
Butírico	3.30	0.02	173.68	0.74	8.68	0.04
Valérico	2.84	0.07	149.47	3.72	7.47	0.21
Isovalérico	0.19	0.01	10.00	1.12	0.50	0.05
Hexanoico	2.33	0.03	122.63	0.74	6.13	0.07
Heptanoico	0.00	0.02	0.00	1.12	0.00	0.04
Octanoico	0.00	0.04	0.00	2.23	0.00	0.01
<b>30 °C pH 7</b>						
Butírico	1.23	0.04	64.74	0.74	3.24	0.01
Valérico	5.25	0.06	276.32	3.72	13.82	0.21
Isovalérico	0.35	0.01	18.42	1.12	0.92	0.08
Hexanoico	1.29	0.09	67.89	0.74	3.39	0.03
Heptanoico	0.00	0.07	0.00	1.12	0.00	0.05
Octanoico	0.00	0.01	0.00	2.23	0.00	0.09
<b>30 °C pH 7.5</b>						
Butírico	1.29	0.03	67.89	0.74	3.39	0.07
Valérico	3.10	0.08	163.16	3.72	8.16	0.05
Isovalérico	0.51	0.01	26.84	1.12	1.34	0.01
Hexanoico	0.73	0.03	38.47	0.74	1.92	0.02
Heptanoico	0.00	0.02	0.00	1.12	0.00	0.07
Octanoico	0.00	0.06	0.00	2.23	0.00	0.04



**Tabla 12.** Valores promedio y desviación estándar (DE) para la concentración máxima de ácido carboxílico y tasas de formación volumétrica y específica para cada condición dada, continuación.

	Máxima concentración (g/L)		Productividad volumétrica (mg/L/d)		Productividad Específica (g/gTS/d)	
	Promedio	D.E	Promedio	D.E	Promedio	D.E
<b>35 °C pH 5</b>						
Butírico	2.15	0.11	113.16	5.95	5.66	0.30
Valérico	1.44	0.18	75.82	9.30	3.79	0.47
Isovalérico	0.97	0.02	51.16	1.12	2.56	0.06
Hexanoico	6.62	0.01	348.16	0.74	17.41	0.04
Heptanoico	2.45	0.02	128.92	1.12	6.45	0.06
Octanoico	3.07	0.21	161.61	11.16	8.08	0.56
<b>35 °C pH 5.5</b>						
Butírico	3.31	0.07	174.21	3.72	8.71	0.19
Valérico	0.67	0.04	35.00	2.23	1.75	0.11
Isovalérico	0.12	0.03	6.50	1.49	0.33	0.07
Hexanoico	9.23	0.08	485.97	4.09	24.30	0.20
Heptanoico	0.88	0.01	46.05	0.37	2.30	0.02
Octanoico	4.74	0.04	249.45	1.86	12.47	0.09
<b>35 °C pH 6</b>						
Butírico	0.36	0.25	18.95	13.03	0.95	0.65
Valérico	0.30	0.03	15.61	1.49	0.78	0.07
Isovalérico	0.18	0.23	9.39	12.28	0.47	0.61
Hexanoico	13.58	1.27	714.95	66.99	35.75	3.35
Heptanoico	0.32	0.04	17.08	1.86	0.85	0.09
Octanoico	6.65	0.17	349.97	8.93	17.50	0.45
<b>35 °C pH 6.5</b>						
Butírico	2.24	0.01	117.89	5.95	5.89	0.25
Valérico	2.11	0.19	111.05	9.30	5.55	0.54
Isovalérico	1.57	0.04	82.63	1.12	4.13	0.07
Hexanoico	10.85	0.03	571.05	0.74	28.55	0.03
Heptanoico	0.00	0.01	0.00	1.12	0.00	0.08
Octanoico	0.00	0.22	0.00	11.16	0.00	0.60
<b>35 °C pH 7</b>						
Butírico	4.80	0.08	252.63	3.72	12.63	0.16
Valérico	5.19	0.05	273.16	2.23	13.66	0.09
Isovalérico	0.00	0.02	0.00	1.49	0.00	0.05
Hexanoico	3.09	0.09	162.63	4.09	8.13	0.23
Heptanoico	0.00	0.03	0.00	0.37	0.00	0.30
Octanoico	0.00	0.08	0.00	1.86	0.00	0.08
<b>35 °C pH 7.5</b>						
Butírico	1.50	0.27	79.11	13.03	3.96	0.07
Valérico	2.78	0.02	146.32	1.49	7.32	0.06
Isovalérico	1.59	0.30	83.68	12.28	4.18	0.56
Hexanoico	0.00	1.10	0.00	66.99	0.00	2.30
Heptanoico	0.00	0.05	0.00	1.86	0.00	0.08
Octanoico	0.00	0.18	0.00	8.93	0.00	0.55

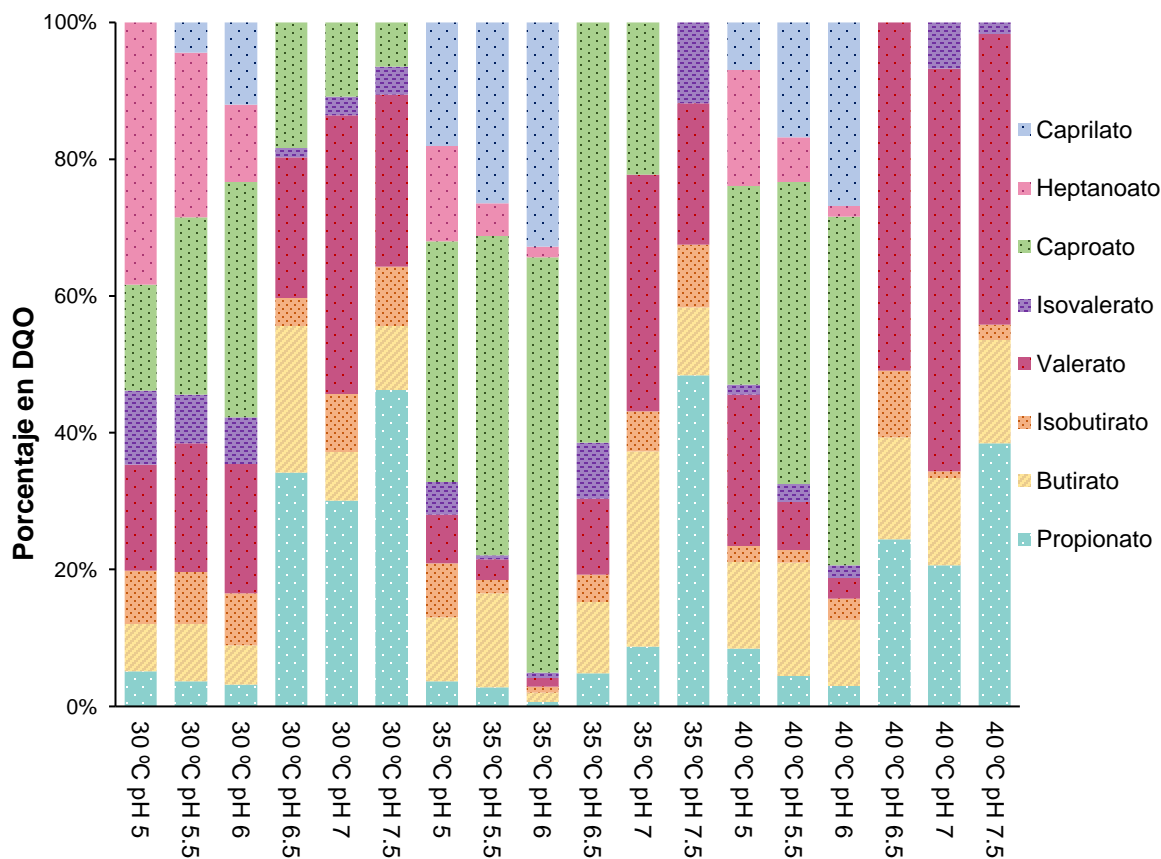
**Tabla 13.** Valores promedio y desviación estándar (DE) para la concentración máxima de ácido carboxílico y tasas de formación volumétrica y específica para cada condición dada, continuación.

	Máxima concentración (g/L)		Productividad volumétrica (mg/L/d)		Productividad Específica (g/gTS/d)	
	Promedio	D.E	Promedio	D.E	Promedio	D.E
<b>40 °C pH5</b>						
Butírico	2.86	0.16	150.53	8.19	7.53	0.41
Valérico	4.47	0.30	235.26	15.63	11.76	0.78
Isovalérico	0.30	0.19	15.79	10.05	0.79	0.50
Hexanoico	5.40	0.21	284.24	11.16	14.21	0.56
Heptanoico	2.95	0.47	155.29	24.93	7.76	1.25
Octanoico	1.18	0.49	62.08	26.05	3.10	1.30
<b>40° C pH 5.5</b>						
Butírico	3.70	0.78	194.74	40.94	9.74	2.05
Valérico	1.40	0.06	73.68	2.98	3.68	0.15
Isovalérico	0.52	0.35	27.37	18.61	1.37	0.93
Hexanoico	8.12	0.28	427.16	14.89	21.36	0.74
Heptanoico	1.12	0.28	58.95	14.89	2.95	0.74
Octanoico	2.79	0.01	146.97	0.74	7.35	0.04
<b>40 °C pH6</b>						
Butírico	2.39	0.95	125.92	49.87	6.30	2.49
Valérico	0.67	0.30	35.00	15.63	1.75	0.78
Isovalérico	0.40	0.18	21.13	9.68	1.06	0.48
Hexanoico	10.44	1.27	549.37	66.99	27.47	3.35
Heptanoico	0.30	0.19	15.63	10.05	0.78	0.50
Octanoico	4.98	0.01	261.95	0.37	13.10	0.02
<b>40° C pH 6.5</b>						
Butírico	1.71	0.77	90.00	40.94	4.50	2.09
Valérico	5.23	0.05	275.32	2.98	13.77	0.17
Isovalérico	0.00	0.03	0.00	18.61	0.00	0.88
Hexanoico	0.00	0.19	0.00	14.89	0.00	0.79
Heptanoico	0.00	0.20	0.00	14.89	0.00	0.65
Octanoico	0.00	0.02	0.00	0.74	0.00	0.03
<b>40° C pH 7</b>						
Butírico	1.71	0.71	90.00	40.94	4.50	1.98
Valérico	7.02	0.07	369.47	2.98	18.47	0.18
Isovalérico	0.81	0.31	42.63	18.61	2.13	0.87
Hexanoico	0.00	0.24	0.00	14.89	0.00	0.72
Heptanoico	0.00	0.30	0.00	14.89	0.00	0.80
Octanoico	0.00	0.04	0.00	0.74	0.00	0.06
<b>40° C pH 7.5</b>						
Butírico	1.75	0.80	91.84	40.94	4.59	2.08
Valérico	4.39	0.08	231.05	2.98	11.55	0.12
Isovalérico	0.17	0.41	9.11	18.61	0.46	0.89
Hexanoico	0.00	0.30	0.00	14.89	0.00	0.69
Heptanoico	0.00	0.22	0.00	14.89	0.00	0.71
Octanoico	0.00	0.03	0.00	0.74	0.00	0.07

La Figura 17 muestra el porcentaje como DQO de los metabolitos cuantificados después de 31 días para cada una de las condiciones estudiadas. Resulta muy importante mencionar que el pH no solo juega un papel fundamental en cuanto a la formación de ACCM, sino también en cuanto a la conformación del metabolito final formado (pares o impares), en donde el rango de pH para la producción de ACCM pares (C6-C8) resultó estar más limitado, observándose la mayor concentración de C6 y C8, a valores de pH entre 5.5-6 en todos los cultivos. En cuanto a la temperatura se observó que la formación de ACCM pares se ve mayormente favorecida a valores  $>30^{\circ}\text{C}$ , lo cual podría estar justificado a que la temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de microorganismos productores de C6 como *C.kluveri*, están reportadas en un rango de  $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$ . El mayor porcentaje en DQO de C6 y C8 (57.55 y 31.02% respectivamente) se observó en el cultivo a  $35^{\circ}\text{C}$  y pH 6.

En cuanto a la formación de ácidos carboxílicos impares, se observa que la producción puede llevarse tanto en condiciones ácidas como alcalinas, sin embargo, solo en condiciones ácidas es posible alargar la cadena hasta ácidos como C7 en donde a  $30^{\circ}\text{C}$  y pH 5 se obtuvo el mayor porcentaje de la composición de este metabolito (27%). Mientras que en los cultivos a pH neutros solo se observó la producción de ácidos de hasta 5 carbonos en donde el cultivo a  $40^{\circ}\text{C}$  y pH 7 mostró el mayor porcentaje de composición de este ácido correspondiente al 26.7%.

En cuanto a la temperatura, valores bajos (menor a  $35^{\circ}\text{C}$ ) favorecen en mayor medida la formación de estos ACCM. Ganigué *et al.*, (2019) estudió la producción de C5 separando el proceso en 2 etapas, la primera enfocada en la producción de C3 empleando glicerol y la segunda etapa dirigida al alargamiento de cadena añadiendo etanol como donador de electrones y utilizando para cada una en cada etapa una cepa pura, obteniendo como resultados que la presencia de acetato y ácido butírico incluso en bajas concentraciones, favorece la formación de ACCM pares por lo que es de suma importancia evitar la presencia de estos 2 precursores si se desea obtener C5. Lo cual resalta la importancia de los resultados obtenidos en esta investigación para vislumbrar como el pH podría favorecer una u otra ruta sin importar los metabolitos intermediarios presentes. Ya que como se observa, los microorganismos presentes en el inóculo utilizado en el presente trabajo presentan gran sensibilidad a las variaciones de pH.



**Figura 17.** Porcentaje de los metabolitos cuantificados (como DQO) después de 31 días para cada una de las condiciones estudiadas.

Además de ácido hexanoico, heptanoico y octanoico, otros ácidos como valérico también fueron generados y resulta importante resaltar que, si bien estos ácidos carboxílicos no entran dentro de la denominación de cadena media, poseen un alto valor agregado debido a sus diversas aplicaciones en las industrias química, alimentaria y farmacéutica (Veras *et al.*, 2020). Y aunque si bien ya han sido estudiados diversos factores que permitan la producción de ACCM impares de manera robusta, estos han sido enfocados en el control de la relación ETOH-C3 y en su mayoría utilizando medios sintéticos y cepas puras. Smit *et al.*, (2019) por su lado demostró por primera vez la producción de ácido valérico a partir de ácido propiónico y metanol obteniendo una concentración de 20 g/L a los 90 días a pH 5.5.

Ganigué *et al.*, (2019) estudió la producción de ácido valérico separando el proceso en 2 etapas utilizando glicerol como sustrato alcanzando una producción de hasta 5.3 g/L sin

embargo utilizó diferentes cepas puras para cada etapa, mientras que en el presente trabajo fue posible obtener una mayor concentración de ácido valérico a 40 °C pH 7 (7.02 g/L) utilizando un cultivo mixto y sin la utilización de etanol exógeno.

### **6.3.2 Análisis de la comunidad microbiana**

Para el análisis de la comunidad microbiana 5 muestras fueron seleccionadas de acuerdo a la mayor producción de ACCC y ACCM (30 °C pH 5, 35 °C pH 5.5 y 6, 40 °C pH 6 y 7). En la Figura 18, se muestran las abundancias relativas por género presentes en un porcentaje mayor al 10% para cada uno de los cultivos analizados y agrupadas por color se indica la clase a la que pertenecen, en donde clases como Clostridia (68.9%), Negativicutes (35.4%) y Bacteroidia (23.4%) presentaron los mayores porcentaje de abundancias de esta experimentación. En cuanto a la formación de las comunidades microbianas, se observó una selección de microorganismos en dos grupos principales: los productores de ACCM pares y los productores de ACCC y ACCM impares.

Para la comunidad productora de ácidos carboxílicos de cadena corta impares como se mencionó anteriormente se observa que los microorganismos presentan tolerancia tanto a valores de pH ácidos como alcalinos. En donde el cultivo 30 °C a pH 5 presentó gran similitud en su composición con el cultivo a 40 °C pH 7 con microorganismos pertenecientes a los géneros *Cutibacterium* (10-15%), los cuales se ha demostrado producen ácido acético y propiónico a valores de pH de aproximados de 6.5–7 (Luo *et al.*, 2017). Otros géneros como *Veillonella* (16-19%) y *Aminobacterium* (15-16%) también encontrados en ambos cultivos fueron reportados por Candry *et al.*, (2020), en donde encontró que valores de pH por encima 6 dieron como resultado una comunidad (dominada por estos dos géneros) productora mayoritariamente de ácido propiónico además de ácido acético y valérico. Sin embargo la formación de ácido heptanoico (C7), solo se llevó a cabo a 30 °C pH 5 (5.97 g/L) cuando géneros como *Mogibacterium* (8.6%) y *Burkholderia* (8.2%) estuvieron presentes. Lo cual podría darnos una idea de que para producir C7 a partir de estos efluentes son necesarios ciertos microorganismos que sólo se ven favorecidos bajo condiciones de pH muy ácidas, así los microorganismos presentes en estos cultivos que aunque no han sido aún reportados como productores de ACCM podrían estar implicados en dicho alargamiento, sin embargo estudios más especializados tendrían que llevarse a cabo para confirmar dicha hipótesis.

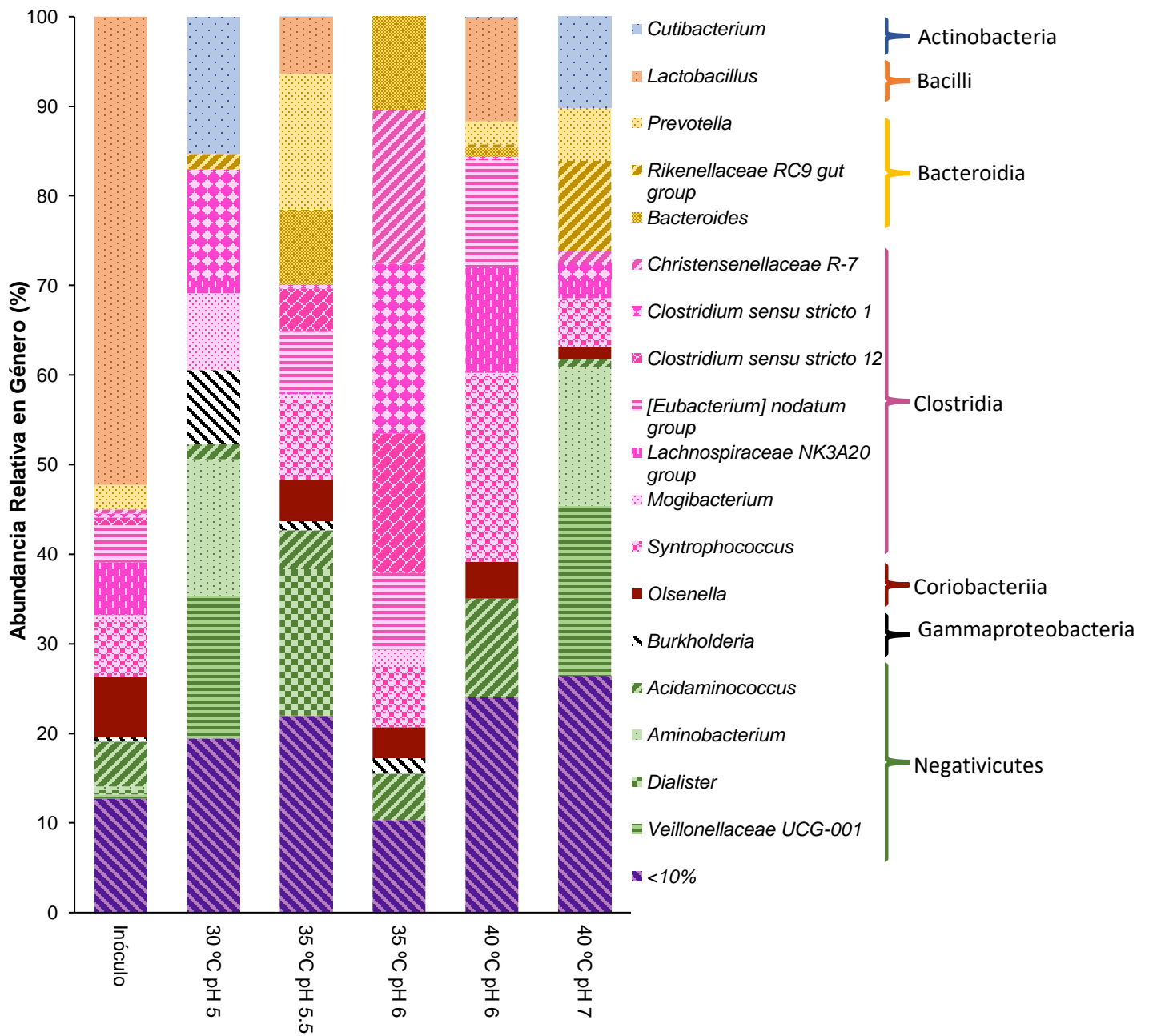


Figura 18. Abundancias relativas de los géneros más abundantes en todas las muestras

En la comunidad productora de ACCM pares tanto el pH como la temperatura resultó ser menos flexible, en donde la mayor producción de C6 y C8 (13.58 y 6.65 g/L) se obtuvo a 35 °C y pH 6 en un periodo de 21 días. Comunidades dominadas por *Clostridium sensu stricto 1* (18.9%), *Clostridium sensu stricto 12* (15.5%), *Christenellaceae-R7* (17.2%), y *Bacteroides* (10.3%) dominaron el cultivo.

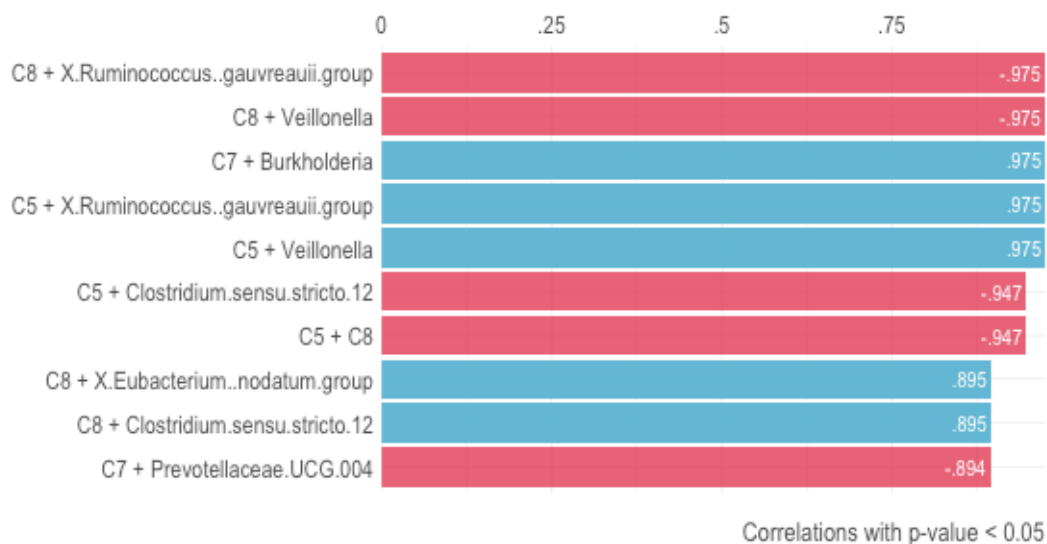
En cuanto a *Clostridium sensu stricto 1* y *Clostridium sensu stricto 12*, Candry y Huang (2020), estudiaron el enriquecimiento y caracterización de comunidades que alargan la cadena a partir de etanol. En donde estos 2 géneros fueron identificados en todas las comunidades y mediante el uso de una secuencia consenso en una búsqueda BLAST, hallaron una coincidencia del 100% con *C. kluyveri DSM555* y *C. kluyveri 3231B*. Por lo que se les puede atribuir a ambas la capacidad de producir ácido hexanoico utilizando etanol a partir de la BOI. La presencia de Clostridiales en todos los cultivos, podría indicar que presencia de esta clase puede resultar fundamental cuando se usa etanol como donador de electrones y que la dirección de la ruta hacia ACCM pares o impares, está determinada principalmente por los ACCC los cuales pueden ser seleccionados mediante el pH y la temperatura que permiten un control sobre los microorganismos formadores de estos precursores.

En la Figura 19, se muestra un diagrama de correlación de Spearman (con un valor de  $p < 0.05$ ) con las 10 correlaciones más significativas, en donde las barras en color rojo indican una correlación negativa mientras que las barras azules indican una correlación positiva. Los números en las barras indican la correlación existente entre las variables analizadas.

Como es posible observar se muestra una correlación positiva entre la producción de ácido heptanoico y microorganismos del género *Burkholderia*, lo cual podría explicar por qué únicamente en el cultivo donde se detectó este género se llevó a cabo la producción de C7.

Aunque aún no ha sido reportada la producción de ácido octanoico por *Clostridium sensu stricto 12*. Una correlación positiva entre este género y la producción de ácido octanoico demuestra que este género podría ser capaz de producir ácido octanoico además de ácido hexanoico.

Otras correlaciones positivas entre los géneros *Ruminococcus* y *Veillonella* con la producción de ácido valérico confirma los resultados reportados por los diversos autores ya antes mencionados.



**Figura 19.** Diagrama de Spearman para las 10 correlaciones más significativas

Observando el comportamiento de los diferentes cultivos bajos los diferentes rangos de pH nos proporciona otra de las ventajas de trabajar con cultivos abiertos ya que bajo el control de este factor puede seleccionarse la ruta en dirección al ACCM de interés, prescindiendo así de fermentaciones en 2 etapas lo cual conlleva a un mayor gasto energético así como de la elusión de cepas específicas en cada etapa (Ganigué *et al.*, 2019).

Estos resultados que podrían estar justificados a la procedencia del inóculo, ya que son microorganismos adaptados de los mismos efluentes vitivinícolas lo cual permitió trabajar a altas concentraciones de etanol sin comprometer al cultivo podrían estar acotados únicamente al sustrato utilizado en el presente trabajo (efluentes vitivinícolas), que además permite prescindir de utilización de etanol exógeno.



## 6.4 CONCLUSIONES

Este estudio permitió observar cómo los diferentes microbiomas funcionales se ven afectados bruscamente por cambios en el pH. Observamos que a un pH superior a 6, el perfil del producto cambió bruscamente de una mezcla de ácidos predominantemente hexanoico y octanoico a una mezcla de ácido propiónico y valérico. El uso del pH como control hacia el alargamiento de la cadena se confirmó una vez más cuando a valores de pH por debajo de 5.5 se obtuvo una producción de ácido heptanoico. Estos cambios en la producción de productos también se observó en la estructura de la comunidad microbiana, un aumento en el pH de 5 a 6 hizo que la comunidad cambiara de uno compuesto principalmente de *Cutibacterium*, *Veillonella*, *Aminobacterium*, *Mogibacterium* y *Burkholderia* a uno dominado por *Clostridium sensu stricto 1*, *Clostridium sensu stricto 12*, *Christenellaceae-R7* y *Bacteroides*, mientras que el uso de un pH superior a 6 generó otro cambio en la comunidad dominada nuevamente por *Veillonella* y *Aminobacterium*.

Finalmente se concluye que la mayor productividad de ácido hexanoico (714 mg/L-d) y octanoico (350 mg/L-d) se obtuvo bajo condiciones de pH 6 y 35 °C. Además, se observó que aunque la presencia de Clostridiales es esencial para la formación de ACCM, la temperatura y en mayor medida el pH son factores que influyen la selección de los microorganismos y, en consecuencia, la ruta metabólica que se llevará a cabo. Los análisis de la comunidad microbiana indicaron que las variantes de secuencias de amplicones (ASV) para Clostridia y Negativicutes se correlacionaron positivamente con la producción de ACCM.

## CAPÍTULO VII

### **Producción de ACCM utilizando efluentes vitivinícolas como sustrato e inóculo y su subsecuente extracción in-situ**

#### **Resumen**

La elongación de cadena es una fermentación anaerobia que produce ácidos grasos de cadena media (ACCM) a partir de ácidos grasos volátiles y etanol. Producir ACCM a partir de efluentes vitivinícolas resulta atractivo no solo por el alto contenido de etanol que poseen y que es necesario para que ocurra la elongación de cadena, sino también por la utilización de su microbiota (como inóculo) que al estar previamente adaptada a altas concentraciones de etanol permite mejorar la producción de estos ACCM. Sin embargo una acumulación de ACCM en el medio resulta en la inhibición del proceso debido a sus efectos tóxicos sobre la microbiota cuando se encuentran en su forma no disociada, por lo cual resulta indispensable una extracción oportuna de estos ácidos. En este estudio se evaluó la producción y extracción de ACCM a escala laboratorio en un reactor SBR bajo condiciones de pH 6 y de temperatura de 35 °C. Las pruebas por lotes se realizaron en un reactor con un volumen útil de 3 L utilizando una mezcla de efluentes vitivinícolas y fluido ruminal como inóculo. Como sustrato se utilizaron efluentes vitivinícolas. Se determinó la cinética de ACCM durante toda la operación. En conclusión, se encontró que la operación por lotes permite mantener una producción de ácido de ACCM estable alcanzando producciones de hasta 7.2 g/L de ácido hexanoico en un periodo de 10 d. La separación oportuna de ACCM permitió triplicar la productividad pasando de 205.6 hasta valores de 728 mg/Ld. La gran sensibilidad de los microorganismos ante pequeñas variaciones de pH permite un control de la ruta metabólica hacia el ACCM de interés durante todo el cultivo.

## 7.1 INTRODUCCIÓN

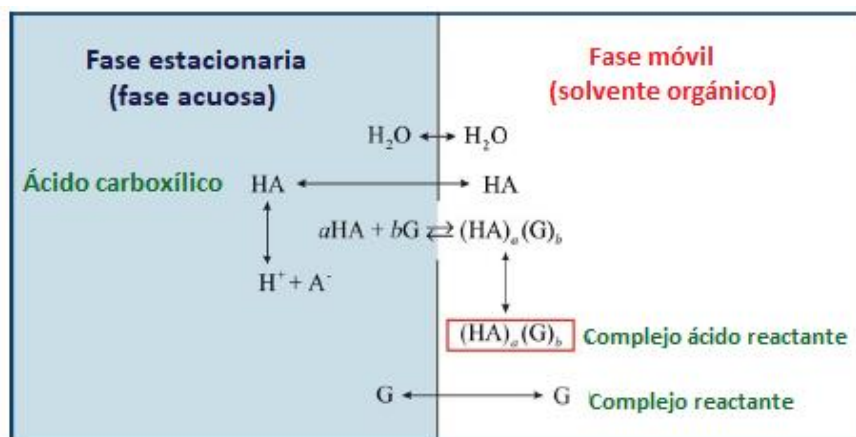
Aunque determinar las condiciones de cultivo iniciales ha sido una pieza clave para mejorar los rendimientos de ACCM, existen otros factores que de igual manera afectan el proceso durante la fermentación cuando se busca escalar el proceso. Entre dichos factores se encuentra la selección del reactor, en donde deben ser considerados diferentes factores como el tipo materia prima a utilizar como sustrato y el tipo de inóculo. Otro factor de suma importancia es la separación de los ACCM del medio de cultivo. Esto debido a que al trabajar con valores de pH ácidos o cercanos al pKa del ácido formado se favorece la formación de las especies en su forma no disociada que, si bien facilitan su extracción, son más tóxicos que sus homólogos aniónicos disociados, ya sea a través de la importación de protones a la célula o al cambiar las propiedades de la membrana y alterar los procesos asociados a ésta (Candry *et al.*, 2020a).

La extracción es el método más aplicado para recuperar ácidos carboxílicos del cultivo de fermentación. Este método incluye precipitación, extracción líquido-líquido, destilación, diálisis por membrana, electrodiálisis e intercambio iónico (Wu *et al.*, 2019). Con suficientes datos, se puede realizar un análisis del ciclo de vida y los resultados podrían ser relevantes para escalar las mejores tecnologías.

Entre los métodos más utilizados se encuentra la extracción bifásica el cual se basa en la utilización de un disolvente de extracción alamina 333, disuelto en un aceite oleílico, que evita la mezcla con el medio biótico.

El proceso de extracción implica dos fases inmiscibles (Figura 20) una fase estacionaria (fase acuosa) que incluye el ácido carboxílico y una fase de transporte (disolvente orgánico como alcohol oleílico que contiene un reactante complejante como Trioctilamina. El paso clave del proceso de extracción reactiva es la formación de un complejo formado por el ácido carboxílico y el reactante complejante, que es soluble en la fase de transporte a diferencia del ácido carboxílico. El reactivo complejante forma un complejo con un ácido carboxílico. La reacción de formación del complejo es reversible. Una vez completado el proceso de

separación, el reactivo complejante se recupera del complejo aumentando la temperatura o añadiéndolo a una solución alcalina como tetraborato de sodio (Djas y Henczka, 2018)



**Figura 20.** Esquema de extracción reactiva de ácido carboxílico de solución acuosa (modificada de Djas y Henczka, 2018)

En resumen, para una implementación industrial exitosa de ACCM además de cultivos nativos mixtos, desechos como sustratos se necesita una forma simple y económica de recuperar los ácidos generados.

El objetivo de esta parte del estudio fue evaluar la producción de ácidos carboxílicos de cadena media a escala laboratorio, utilizando como inóculo una mezcla de microorganismos nativos de efluentes vitivinícolas y microorganismos ruminales en la proporción con mejor desempeño seleccionada en la etapa anterior: 80/20% g STV (nativos de efluentes vitivinícolas/microorganismos ruminales). Las condiciones de cultivo fueron 35 °C y un pH de 6. La experimentación se realizó en un sistema operado como SBR con volumen de trabajo de 3 L y una agitación de 300 rpm. Se utilizaron efluentes vitivinícolas como sustrato, la relación etanol/acetato fue de 15/5 g (ETOH/AA). Se llevó a cabo la separación bifásica de los ACCM producidos del medio de cultivo.

## **7.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

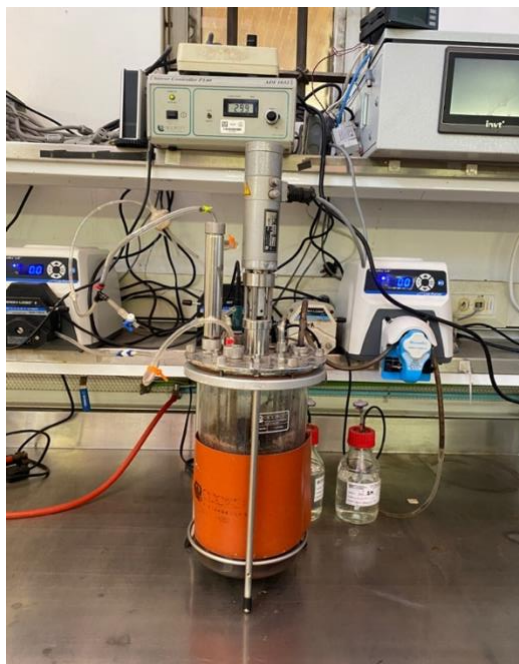
### ***7.2.1 Inóculo***

De acuerdo con los mejores resultados de la producción de ACCM en trabajos anteriores, el inóculo fue una combinación de 80% de consorcios nativos presentes en la fracción sólida sedimentada de efluentes de vino tinto (Estado de Querétaro, México) y 20% de fluido ruminal incluyendo sólidos, proveniente de un rastro de bovinos en la ciudad de Querétaro. El líquido ruminal recolectado se mantuvo a 35 °C y se utilizó dentro de las 2 h desde el momento del muestreo en el rastro. Para ambos inóculos se determinaron los sólidos suspendidos totales y volátiles.

### ***7.2.2 Diseño del reactor***

El proceso anaerobio consistió en un SBR acidogénico (Applikon Biotechnology) (Figura 21) con un volumen nominal de 7 L y un volumen de trabajo de 3 L, operado en condiciones mesófilas (35 °C) con una velocidad de mezcla de 300 rpm. La mezcla se logró mediante el uso de impulsores y deflectores Rushton incluidos por el fabricante del biorreactor. El pH se controló durante el funcionamiento del reactor a  $6.0 \pm 0.1$  utilizando NaOH y HCl 5 M.

El proceso se operó como lecho móvil. En donde parte de la biomasa estaba en suspensión y otra parte estaba fija en soportes. Como soportes de la biomasa se utilizaron anillos de polietileno de alta densidad (2H, BCN 009 plus, Alemania), con dimensiones de largo, alto y ancho aproximadas de 1 cm x 1 cm x 0.7 mm, respectivamente, con una densidad de 0.92 g/cm<sup>3</sup> y una relación área/volumen (A/V) de 68.7 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>.



**Figura 21.** Reactor acidogénico operado en lotes.

### ***7.2.3 Condiciones experimentales***

Para la aclimatación de la biomasa se tomó una cantidad de la fracción sólida de los efluentes vitivinícolas y se colocó en botellas serológicas con una relación de ETOH/AA 10/4 g, posteriormente las botellas se introdujeron en una incubadora a 35 °C con agitación horizontal de 100 rpm durante 7 días.

La colonización de los soportes se realizó colocando una cantidad de soportes equivalente a 750 mL, se introdujeron dentro del reactor y se agregó en inóculo compuesto por 80% nativos de efluentes vitivinícolas y 20% microorganismos ruminales, se alimentó con los efluentes vitivinícolas ajustando una relación ETOH/AA 6:1, y se mantuvo una agitación de 50 rpm por un periodo de 12 días para permitir que la colonización se llevara a cabo.

El reactor se inculó con 1.6 g de ST, dando una concentración final de 20 g de ST/L, el espacio de cabeza se purgó con N<sub>2</sub> por 4 min para asegurar condiciones anaerobias.

Transcurrida la etapa de colonización se aumentó la velocidad de agitación a 300 rpm. La relación etanol-acetato a (23 g/ 5; 500/83 mmol o 90/10% demanda química de oxígeno, DQO) alimentada al inicio de la experimentación se mantuvo únicamente para el primer lote, ya que al observar que no todo el etanol estaba siendo consumido, en los lotes posteriores se decidió cambiar la relación a 15/5 g/L ETOH-AA.

La duración de cada lote se fijó de acuerdo a la máxima concentración de C6 reportada (6- 8 g/L) incapaz de inhibir el proceso. Una vez alcanzada dicha concentración se detenía la agitación y se dejaba sedimentar por aproximadamente una hora con la finalidad de conservar la mayor cantidad de biomasa, una vez sedimentada la mayor parte de la biomasa, se retiraba una parte del volumen utilizado (2.5 L), y el volumen restante dentro del reactor era caracterizado y se alimentaba nuevamente con efluentes vitivinícolas en concentraciones que permitieran conservar la relación ETOH/AA establecida inicialmente.

Todas las mediciones y pruebas se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar.

#### ***7.2.4 Cuantificación de biomasa en los soportes***

Para la cuantificación de la biomasa adherida en los soportes, se extrajeron y pesaron 20 soportes del reactor. Posteriormente con la finalidad de desprender la biomasa de los soportes se sumergieron en una solución de NaOH 0.5 N y se colocaron en un sonicador por 30 minutos. Una vez transcurridos los 30 minutos se retiraron los soportes verificando que toda la biomasa quedara en la solución de sosa. Seguido se aforó a un volumen conocido. Y se realizaron SV al volumen obtenido.

Finalmente, tomando en cuenta el número de soportes que ocupan 100 mL, se determinaron los gramos de SSV por soporte y por volumen total de soportes utilizados en la experimentación.

### **7.2.5 Métodos analíticos**

Para la determinación de etanol y ácidos grasos volátiles, se recolectaron muestras líquidas (2 mL) cada 48 y 72 h directamente del reactor. Las muestras fueron centrifugadas (600 mg), y el sobrenadante se filtró usando filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm. Las muestras se preservaron agregando HCl para disminuir el pH a 2 y posteriormente se mantuvieron a 4 °C. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890B, USA.). Equipado y programado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las determinaciones de sólidos totales, volátiles y la demanda química de oxígeno (DQO), se llevaron a cabo como se describe en la metodología general.

Las tasas volumétricas para la producción de cada ácido carboxílico fueron evaluadas dividiendo la concentración máxima entre el tiempo necesario para alcanzar esa concentración. La tasa específica se calculó dividiendo la tasa volumétrica entre la concentración de sólidos totales del inóculo agregado a cada prueba.

### **7.2.6 Separación bifásica de ACCM del medio de cultivo**

Esta fase de la experimentación se separó en 2 etapas, a) selección de la concentración del extractor y b) extracción de ACCM del medio real operado por lotes.

Para la primera etapa a) la solución extractora estuvo compuesta por una mezcla de Trioctilamina (TOA, CAS: 1116-76-3; Sigma-Aldrich) en alcohol oleílico (CAS: 143-28-2; Sigma-Aldrich). Las concentraciones probadas fueron 10, 20 y 30% de TOA. Posteriormente se prepararon medios sintéticos a diferentes concentraciones de ACCM (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 M) y se ajustó el pH a 5.5. Enseguida se mezclaron volúmenes iguales del medio sintético y la solución extractora, se agitaron a 100 rpm, velocidad a la que se mantuvo el sistema bifásico.



Para medir los metabolitos extraídos en la capa de disolvente, la capa superior de disolvente se tomó del cultivo de fermentación bifásica y luego se diluyó en metanol. Las concentraciones de ACCM tanto en el caldo de fermentación acuoso como en las fases del disolvente de extracción se midieron por cromatografía.

Para la segunda etapa b), una vez que se alcanzaba una concentración de 6-8 g/L de C6 en el reactor, se detuvo la agitación y se dejó sedimentar la biomasa por 2 horas. Posteriormente se retiraron 2.5 L los cuales se mantuvieron en agitación para tomar una muestra homogénea de 20 mL de dicho volumen. Posteriormente se realizó la extracción siguiendo la metodología mencionada en la primera etapa. Todas las extracciones se realizaron por duplicado.

### ***7.2.7 Análisis de la comunidad microbiana***

Se recolectaron muestras al inicio y al final de cada lote durante toda la operación del reactor para caracterizar la composición microbiana. Para el muestreo, se recolectaron muestras de 2 mL en tubos Eppendorf. Luego, las muestras se centrifugaron y los pélet de biomasa sedimentada se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento. El ADN genómico de las muestras de biomasa se extrajo en tampón fosfato. Para la extracción de ADN, se utilizó el kit de aislamiento de ADN PowerLyzer (QIAGEN, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se determinó con un equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.). Las muestras de ADN fueron enviadas al Recurso de microbioma integrado ubicado en la Universidad de Dalhousie (Halifax, Nova Scotia, Canada) para su amplificación y secuenciación a través de la plataforma de secuenciación en masa MiSeq (Illumina, San Diego, EE. UU.). Los primers universales utilizados fueron B969F (ACGCGHNRAACCTTACC) y BA1406R (ACGGGCRGTGWGTRCAA) que amplificaron las regiones V6-V8 del rADN 16s. La integridad y concentración de las muestras de ADN se evaluaron utilizando gel de agarosa teñido con SYBR Green (1%) y se cuantificaron mediante espectrofotometría utilizando un NANODrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.). Las secuencias se analizaron utilizando el software Rstudio (R Core Team, 2021). Se obtuvieron secuencias demultiplexadas, libres de errores y agrupadas mediante el algoritmo DADA2 (Callahan *et al.*, 2016).

La composición taxonómica de las muestras se determinó utilizando el clasificador 16S basado en Silva (Quast *et al.*, 2013). Se aplicaron límites de rarefacción inferiores de 5379 secuencias para el análisis de la diversidad de muestras bacterianas. El algoritmo USEARCH se utilizó para seleccionar solo secuencias no menores de 100 pb y no mayores de 250 pb con un puntaje de calidad superior a 25 (Edgar, 2013), además, las secuencias quiméricas fueron eliminadas usando UCHIME (Edgar *et al.*, 2011). Las secuencias seleccionadas se conservaron para análisis de la comunidad. La clasificación taxonómica de cada variante de secuencia de amplicones (ASV) se realizó utilizando su secuencia de consenso, donde la secuencia se analizó en el clasificador del proyecto de base de datos ribosomales (RDP) mediante comparaciones con secuencias de alta calidad derivadas de la base de datos NCBI (Wang *et al.*, 2007).

## **7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.3.1 Producción de ACCM**

Se investigó el efecto de la extracción bifásica durante la fermentación de efluentes vitivinícolas para la producción de ácidos carboxílicos de cadena media en un reactor SBR. Los resultados de consumo de sustrato y producción de metabolitos obtenidos en cada uno de los lotes se muestran en las Figuras 22 y 23. El tiempo de operación del reactor fue de 140 días divididos en los 6 lotes siguientes: Lote A: periodo de aclimatación (11 d), Lote 1 (32 d), Lote 2 (33 d), Lote 3 (12 d), Lote 4 (10 d), Lote 5 (10 d). Del día 11 al 31 no se operó el reactor por periodo vacacional por lo que se mantuvo apagado y bajo condiciones de temperatura ambientales.

La duración de cada lote (a excepción de la etapa de aclimatación) se determinó por el tiempo que se requirió para producir de 6-8 g/L de ácido hexanoico.

Durante la etapa de aclimatación (0-11 d) Figura 22 Lote A, se observó la formación de ACCM alcanzándose una producción de 3.015 g/L de ácido hexanoico (C6). Sin embargo, comparado con la etapa anterior realizada en botellas serológicas, en el mismo periodo de tiempo se produjo casi el doble (5.59 g/L) para el mismo ácido.

Este comportamiento podría indicar que los microorganismos bajo esta configuración necesitan de un mayor tiempo para la reacción. Esto está relacionado con el escalamiento, lo cual podría deberse a diversos factores como deficiencias en el mezclado.

Durante el periodo del día 11 al 31 (Figura 22 periodo vacacional), no fue posible operar el reactor, por lo que se mantuvo a temperatura ambiente y sin control de pH o seguimiento de las concentraciones de ACCM formadas. Una vez finalizado dicho periodo, se realizó una caracterización del reactor para conocer su estado, los resultados mostraron que sin un control tanto de pH como de temperatura la ruta metabólica se desvía hacia la formación de butirato (C4) y en menor medida propionato (C3) y valerato (C5) alcanzándose concentraciones de hasta 4.33, 2.07 y 2.03 g/L respectivamente, la generación de estos ácidos se debió principalmente a un decremento del pH (5.6). Adicionalmente, también se observó un incremento en las concentraciones de ácido acético (aceptor de electrones en el proceso de elongación), pasando de una concentración de 2.97 g/L de la etapa de aclimatación hasta una concentración de 6.4 g/L. La formación de acetato en esta etapa coincide con los resultados obtenidos por (Luo *et al.*, 2017), en donde demostró que a valores de pH menores a 6 diversas especies son productoras de C2 y C3 a partir de lactato.

Posteriormente se inició el Lote 1 (Figura 23 Lote 1, día 31 al día 63) no sin antes ajustar las condiciones de pH, agitación y temperatura a los valores ya antes mencionados establecidos al inicio del experimento con la finalidad de observar si el cultivo era capaz de dirigir nuevamente la ruta hacia la producción de los ACCM de interés. Se observó que el sistema tardó un periodo de 21 días en dirigir la ruta hacia la formación de ácido hexanoico nuevamente. Esto comprueba nuevamente los resultados obtenidos en la etapa anterior en donde los microorganismos demostraron gran sensibilidad ante pequeñas variaciones de pH. Además, estos resultados demostraron como mediante el control del pH es posible seleccionar el metabolito de interés durante cualquier etapa de la fermentación, lo cual resulta interesante.

En un estudio realizado por Wu *et al.*, (2019) demostraron que cuando el cultivo se desvía hacia la ruta del acrilato, en donde los metabolitos formados son impares, fue imposible volver a la ruta de  $\beta$ -oxidación inversa. Por lo que podría inferirse que el inóculo generado en esta investigación presentaba microorganismos que al ser tan sensibles a las condiciones de pH pueden retomar la ruta deseada o bien, que las habilidades que poseen la clase Clostridia (presentes en mayor proporción) ante medios hostiles les permite entrar en estado de dormancia y desarrollarse nuevamente una vez restablecidas sus condiciones óptimas de crecimiento, aunque hay que resaltar que se requieren de tiempos mayores a los 20 días para cambiar de una ruta a otra.

En el día 52 fue posible observar un consumo de butirato y por lo tanto la formación de ácido hexanoico, las máximas concentraciones alcanzadas en el Lote 1 fueron de 6.59 g/L para C6 y hasta 1.6 g/L de C8 que como bien se ha observado es necesario un tiempo mayor para la generación de este metabolito.

Como bien se mencionó en la metodología la duración de cada lote se estableció de acuerdo con la máxima concentración reportada de C6 que puede estar en el medio sin inhibir el proceso (entre 6 y 8 g/L). Por lo que en este lote al alcanzar 6.52 g/L de C6 se detuvo el proceso para iniciar el segundo lote. Para ello, se dejó sedimentar por 2 h la biomasa y se retiró el 83.3% (2.5 L) del volumen de trabajo. Enseguida, se alimentó nuevamente el reactor en la misma relación ETOH/AA establecida, considerando las concentraciones del sustrato residual presente en el volumen conservado dentro del reactor.

En el Lote 2 (Figura 22 Lote 2, día 63 al 96) se presentaron fallas en el biocontrolador de pH provocando una acidificación accidental del medio durante la noche. Esto tuvo como consecuencia la formación de ácido heptanoico (C7) y en mayor medida valerato (C5). Las concentraciones máximas alcanzadas en este lote de éstos ácidos fueron de 2.35 g/L y 6.4 g/L respectivamente. Mientras que para C6 se observó una disminución de su concentración, a 5.4 g/L.

En el Lote 3, se logró estabilizar el sistema, lo cual permitió obtener una concentración similar de C6 (7.28 g/L) en un lapso 3 veces más corto de tiempo (10 d) comparado con el lote anterior.

En cuanto a los lotes 4 y 5 se observó un comportamiento muy similar entre ellos en cuanto a la formación de ACCM y consumo de sustrato, alcanzándose producciones de hasta  $7.14 \pm 0.09$  g/L en un periodo de 10 d en cada lote. Cabe mencionar que para todos los lotes el consumo de sustrato fue mayor al 80% para etanol y de más del 85% para AA (Figura 23). La Tabla 12 resume las concentraciones máximas de ácido carboxílico y las tasas volumétricas y específicas para cada lote.

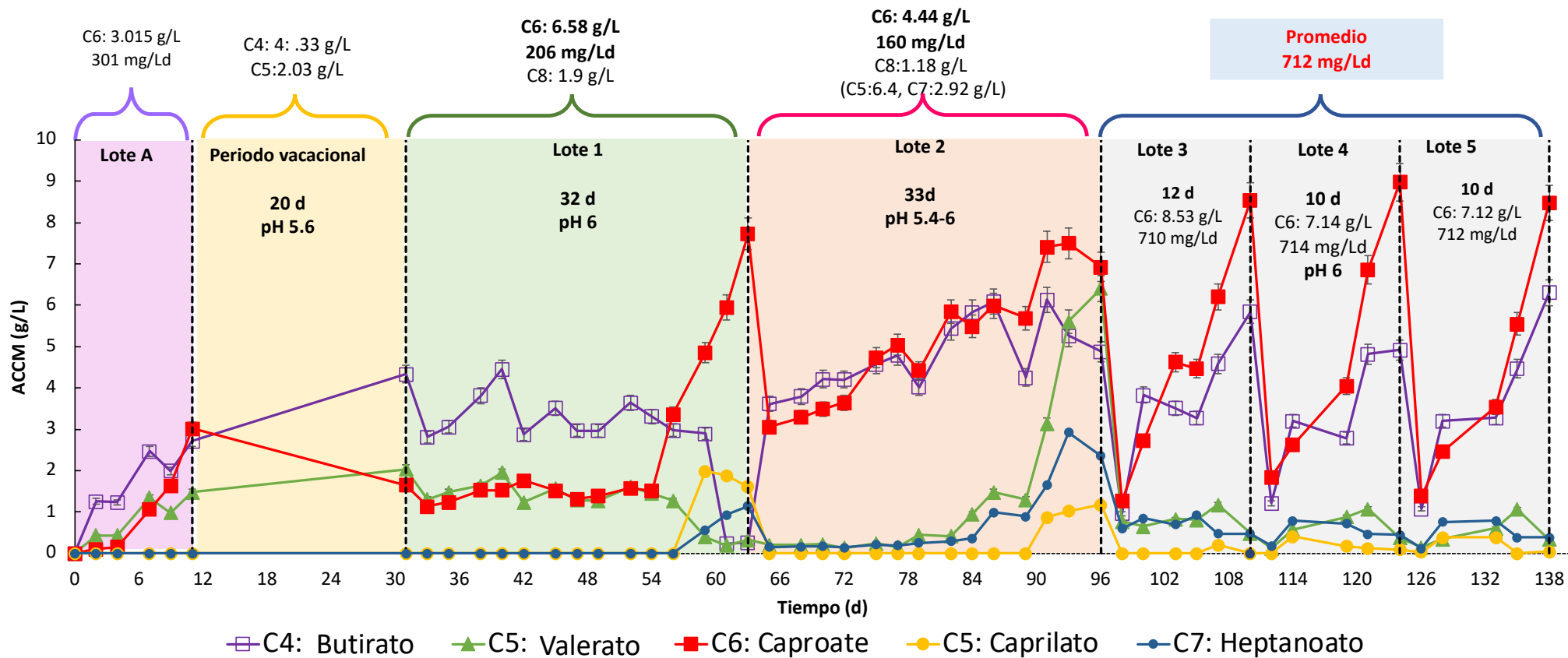
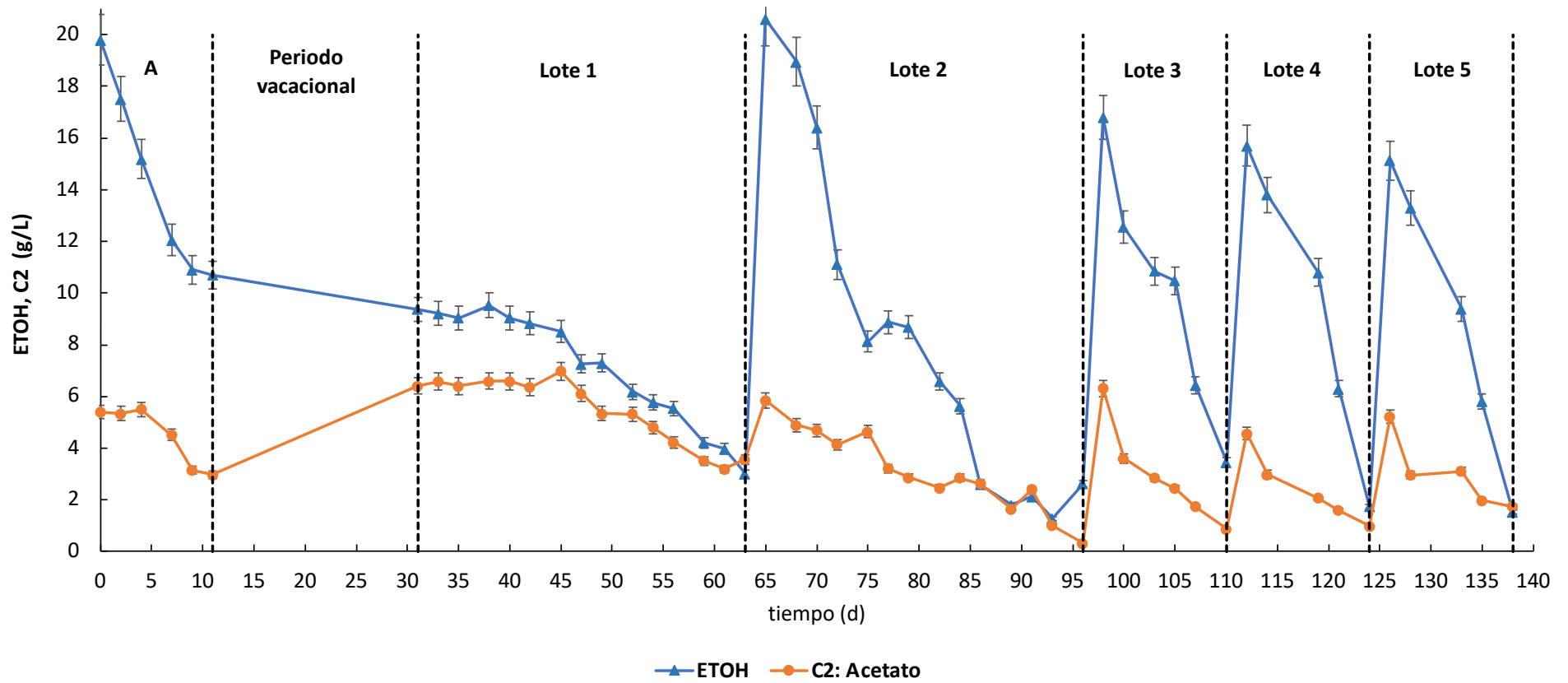


Figura 22. Producción de ACCM durante la fermentación por lotes.



**Figura 23.** Consumo de sustrato durante la fermentación por lotes.

Las mejores productividades de ácido hexanoico se obtuvieron una vez estabilizado el proceso, es decir, cuando no hubo variaciones de temperatura y de pH. Por lo que a partir del lote 3, fue posible aumentar la productividad de C6 hasta 3.3 veces, pasando de valores de 205 mg/L-d a valores de 728 g/L-d. La prueba ANOVA de un solo factor indicó que no existe diferencia significativa entre los lotes 3, 4 y 5 en términos de producción de ácido hexanoico (valor de p de 0.21).

La productividad alcanzada en el presente trabajo (728 mg/L-d) fue mayor a la reportada por Contreras-Dávila *et al.*, (2020) de 500 mg/L-d operando un reactor agitado con un volumen de trabajo de 1 L bajo las mismas condiciones de pH y temperatura, utilizando lactato como donador de electrones y como inóculo un microbioma generado de la fermentación de residuos alimentarios. Así mismo, la tasa de producción de ácido hexanoico en este estudio es 7.2 veces mayor que en otros estudios que trabajan con desechos orgánicos sólidos (Grootscholten *et al.*, 2013; Bolaji y Dionisi, 2017), 27.2 veces mayor que el valor obtenido por Kucek *et al.*, (2016) en un sistema continuo utilizando lias de vino como sustrato. Duber *et al.*, (2018) reportó una concentración de 8.45 g/L de ácido hexanoico utilizando suero de leche ácido como sustrato en un sistema operado por lotes.

En cuanto a la formación de ACCM de cadena más larga como ácido heptanoico, la mayor concentración se detectó en el lote 2 en donde al no haber un control de pH, el medio se acidificó promoviendo la formación de este ácido hasta una concentración de 2.35 g/L. Como se ha discutido anteriormente los géneros *Mogibacterium* y *Burkholderia* están relacionados con la producción de éstos ácidos (De Smit *et al.*, 2019). En esta tesis estos géneros fueron detectados previamente en condiciones donde el pH fue menor a 6. De manera similar, Roghair *et al.* (2018) obtuvieron una producción de 1.8 g/L de C7 en un reactor alimentado con ácido propiónico (10.9 g/L-d) y etanol (32.5 g/L-d). Zhang *et al.*, (2020) separando el proceso de digestión anaerobia en dos etapas alcanzaron concentraciones de hasta 2.7 g/L de C7 utilizando estiércol porcino como sustrato.



**Tabla 14.** Valores promedio y desviación estándar (DE) para la concentración máxima de ácido carboxílico y tasas de formación volumétrica y específica para cada lote.

	Concentración máxima (g/L)		Productividad (mg/L/d)		Productividad específica (mg/gTS/d)	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
<b>Aclimatación</b>						
Propiónico	1.86	0.01	186.00	0.37	9.30	0.02
Isobutírico	1.22	0.04	122.00	2.23	6.10	0.11
Butírico	2.71	0.01	271.00	0.74	13.55	0.04
Valérico	1.47	0.03	147.00	2.1	7.35	0.1
Hexanoico	3.02	0.07	301.50	3.72	15.08	0.19
<b>Periodo con acidificación</b>						
Propiónico	2.07	0.02	103.5	0.74	5.18	0.04
Butírico	4.33	0.01	216.5	1.12	10.83	0.05
Valérico	2.03	0.03	101.5	0.74	5.08	0.07
Isovalérico	0.44	0.01	22	1.67	1.10	0.9
Hexanoico	1.14	0.83	56.75	1.01	2.84	0.25
<b>Lote 1</b>						
Propiónico	1.13	0.1	35.31	5.21	1.77	0.26
Isobutírico	1.98	0.01	61.88	0.37	3.09	0.02
Butírico	0.26	0.01	8.06	0.74	0.40	0.04
Valérico	0.33	0.01	10.16	0.74	0.51	0.04
Isovalérico	0.28	0.08	8.59	4.09	0.43	0.2
Hexanoico	6.59	0.06	205.94	3.78	10.30	0.54
Heptanoico	1.14	0.42	35.70	2.11	1.79	0.08
Octanoico	1.61	0	50.39	0	2.52	0
<b>Lote 2</b>						
Propiónico	0.68	0.01	24.29	0.74	1.21	0.04
Isobutírico	0.09	0.07	3.21	3.72	0.16	0.19
Butírico	4.88	0.02	174.29	1.12	8.71	0.06
Valérico	6.41	0.01	228.79	0.74	11.44	0.04
Isovalérico	0.07	0.02	2.50	1.12	0.13	0.06
Hexanoico	5.40	0.06	192.86	1.89	9.64	0.97
Heptanoico	2.35	0.02	84.04	1.09	4.20	0.31
Octanoico	1.18	0.04	41.96	2.23	2.10	0.11
<b>Lote 3</b>						
Propiónico	0.44	0.01	44.30	0.37	2.22	0.02
Isobutírico	0.10	0.04	10.20	2.23	0.51	0.11
Butírico	5.85	0.01	584.60	0.74	29.23	0.04
Valérico	0.48	0.03	47.85	2.1	2.39	0.1
Isovalérico	0.32	0.01	31.60	1.03	1.58	0.06
Hexanoico	7.28	0.07	728.00	3.72	36.40	0.19
Heptanoico	0.48	0	47.70	0	2.39	0
<b>Lote 4</b>						
Propiónico	0.51	0.02	51.2	0.74	2.56	0.04
Isobutírico	0.11	0.07	11.32	3.72	0.57	0.21
Butírico	5.92	0.01	592	1.12	29.60	0.05
Valérico	0.37	0.03	37.1	0.74	1.86	0.07
Isovalérico	0.37	0.01	36.8	1.67	1.84	0.9
Hexanoico	7.14	0.83	714	1.01	35.70	0.25
Heptanoico	0.44	0.02	44	1.12	2.20	0.04
Octanoico	0.09	0.04	9.2	2.23	0.46	0.01
<b>Lote 5</b>						
Propiónico	0.45	0.04	45	0.74	2.25	0.01
Isobutírico	0.22	0.06	22	3.72	1.10	0.21
Butírico	5.23	0.01	523	1.12	26.15	0.08
Valérico	0.33	0.02	33.1	1.52	1.66	0.54
Isovalérico	0.33	0.01	32.8	2.6	1.64	0.02
Hexanoico	7.12	0.09	712	1.74	35.60	0.03
Heptanoico	0.38	0.07	38	1.12	1.90	0.05
Octanoico	0.03	0.01	3	2.23	0.15	0.09

La Figura 24 muestra el porcentaje, como DQO, de los metabolitos cuantificados después de la finalización de cada lote. Es posible observar que el ácido octanoico se produjo únicamente en los dos primeros lotes en donde estuvo presente en un 9.2 y 5.4% en DQO respectivamente. La ausencia de este ACCM conformado por 8 carbonos en los lotes posteriores se debe a que la duración de los lotes se redujo de 30 a 10 días. Se ha reportado (Zhang *et al.*, 2020) que la formación de este ACCM requiere de tiempos mayores a 20 días que permitan la elongación de la cadena del butirato (C4). También es posible observar que debido a la acidificación generó ACCM impares como ácido propiónico, valérico y heptanoico en 6.9, 24.9 y 10.6% en DQO, respectivamente.

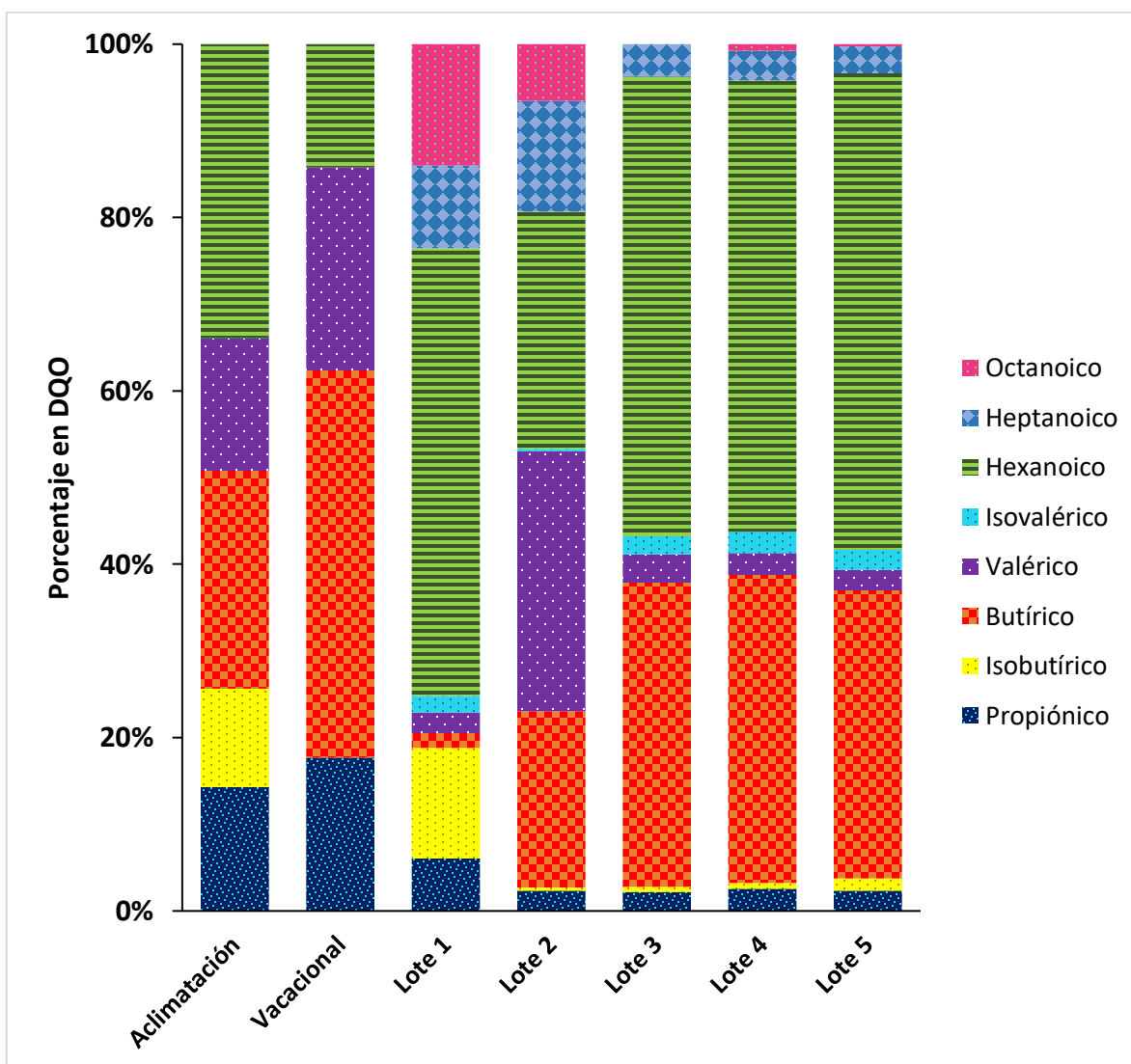


Figura 24. Porcentaje de los metabolitos cuantificados (como DQO) para cada uno de los lotes

### ***7.3.2. Extracción de ACCM del medio***

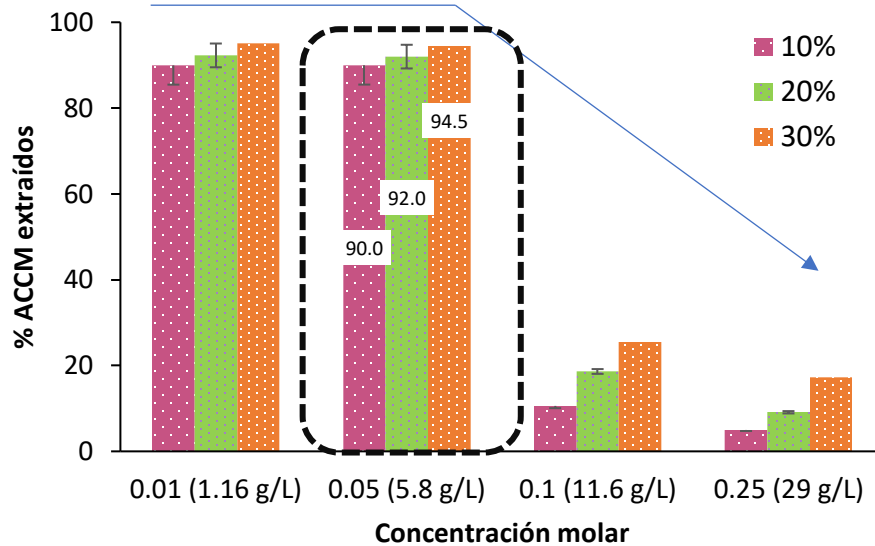
Como se mencionó en la metodología la evaluación de la separación de ACCM del medio estuvo dividida en 2 etapas, etapa A: la selección del porcentaje del extractor y determinación de concentración de ACCM a separar en medio sintético; etapa B: la separación in-situ del medio real de cultivo operado por lotes.

Etapa A: En la Figura 25, se muestran los porcentajes de extracción de ACCM utilizando las tres diferentes concentraciones del extractor propuestas y las cuatro concentraciones molares de C6 también mencionadas en la metodología.

Los resultados obtenidos en esta etapa mostraron que la concentración de ACCM es quien determina la eficiencia del extractor, ya que al trabajar con concentraciones igual o mayores a 0.1 M (11.6 g/L) de ácido hexanoico el porcentaje de extracción disminuye hasta un 69%.

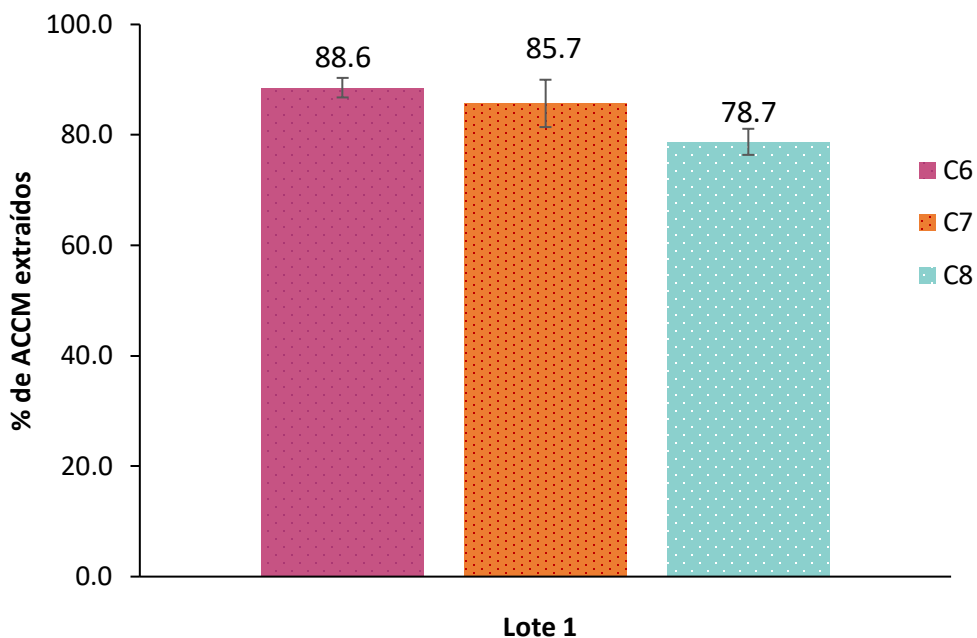
En cuanto a la selección del porcentaje de extractor, un incremento de la concentración de éste del 10 al 20 o 30% no fue significativo para la extracción de los ACCM, por lo que económicamente 10% es adecuado. La prueba ANOVA de un solo factor indicó que no existe diferencia significativa entre el extractor al 10 y 20% en términos de ACCM separados del medio (valor de p de 0.35).

Por lo que se puede concluir que la mejor concentración para llevar a cabo la extracción bifásica líquido-líquido es 0.05 M de ACCM con la cual es posible recuperar hasta el 90% de ácido hexanoico utilizando el extractor al 10% en medio sintético.



**Figura 25.** Porcentajes de extracción de ACCM utilizando diferentes concentraciones de extractor.

En cuanto a la extracción de ACCM del medio real durante la operación por lotes (etapa B), en la Figura 26 se presentan los porcentajes de separación para los ácidos C6, C7 y C8 en el primer lote. En donde si bien no se alcanzaron los porcentajes de extracción reportados en la etapa a) utilizando medio sintético, fue posible extraer más del 85% de C6 y de C7, mientras que para C8 se logró extraer el 78.7%. Por lo que con base en los resultados obtenidos en la etapa B, se puede concluir que además de la concentración de ACCM en el medio, la cantidad de carbonos que componen a los ACCM influyen en el proceso de extracción de los mismos, en donde cadenas más largas de ACCM como C8 disminuyen la efectividad del extractor.



**Figura 26.** Porcentajes de extracción obtenidas durante el primer lote.

De este modo, se puede asumir que el aumento de la productividad ACCM se debe a la extracción oportuna de C6. En la literatura se ha reportado una amplia gama de concentraciones de ácido hexanoico (0.8 g/L a 12.8 g/L) en medios de fermentación sin extracción (Vasudevan *et al.*, 2014; Weimer *et al.*, 2015; Lonkar *et al.*, 2016; Ganigué *et al.*, 2016). Sin embargo, en todos los casos se han requerido de tiempos mayores a los 30 días para obtener dichas concentraciones. Por otro lado también se ha demostrado que la separación del ácido hexanoico de los medios de fermentación ha permitido tasas de producción de ácido hexanoico alrededor de cuatro veces más altas que en los ensayos sin extracción (Choi *et al.*, 2013; Jeon *et al.*, 2013).

Ge *et al.*, (2015), reportaron un límite tóxico de 5.87 g/L para inhibir la producción de ácido hexanoico en el alargamiento de la cadena a utilizando etanol como donador de electrones. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la microbiota desarrollada en nuestros experimentos podría funcionar en entornos más ácidos que los informes anteriores y en presencia de concentraciones más altas de ácido hexanoico no disociado tóxico.

### 7.3.3 Biomasa adherida en los soportes

En la Figura 27 se muestra algunos de los soportes extraídos del reactor, en donde es posible observar la biomasa adherida a estos. De acuerdo con la metodología mencionada la biomasa adherida a cada soporte fue de 0.01 g SV dando una concentración total de 7.66 g SV por todos los soportes utilizados en el reactor, así en el reactor el 54% (7.66 g SV) estaba fija en soportes mientras que el 46% (6.54 g SV) de la biomasa se encontraba en suspensión. Una proporción mayoritaria de biomasa en los soportes pudo haber sido otro de los factores (además de la separación oportuna de ácido hexanoico) que incrementaron la producción de ACCM hasta 1.5 veces respecto a los experimentos anteriores, ya que se ha reportado que los sistemas de crecimiento adherido se ven menos afectados por la inhibición causada por compuestos tóxicos y se disminuye el lavado de biomasa durante el intercambio del sustrato (Buitron *et al.*, 2014).

Por lo que evaluar el uso de soportes en producciones a mayor escala de ACCM brindaría información muy valiosa en cuanto a mejora del proceso, ya que a nivel industrial donde en la mayoría se trabaja con sistemas continuos, estos presentan mayores pérdidas por el lavado de biomasa.



**Figura 27.** Biomasa adherida a los soportes utilizados durante la experimentación por lotes

#### 7.3.4. Análisis de la comunidad microbiana

Para el análisis de la comunidad microbiana se tomaron muestras en los días 0, 31, 63, 96, 110, 124 y 138 que corresponden al inicio y al final de cada lote. En la Figura 28 se muestran las abundancias relativas a nivel género y agrupadas por color de acuerdo a la clase que pertenecen. Durante toda la operación del reactor como clases dominantes se observan Clostridia, Actinobacteria, Negativicutes, Bacilli y Bacteroida. Siendo la clase Clostridia la de mayor abundancia en cada uno de los lotes (27- 58%).

En el inóculo inicial es posible observar una gran diversidad de comunidades microbianas en donde las clases Bacilli y Clostridia estuvieron presentes en el mayor porcentaje, 26 y 37.2% respectivamente.

En el periodo de acidificación del cultivo, aunque la clase Clostridia dominó el cultivo con una abundancia relativa del 27%, fue en este periodo en donde se obtuvo la menor producción de ácido hexanoico, siendo acetato, butirato y valerato los principales metabolitos formados. La producción de butirato en esta etapa podría ser atribuida principalmente al género *Butyrivibrio*, el cual estuvo presente en un 20.4%. Mientras que la generación de acetato y propionato podría estar relacionada en mayor medida al género *Bifidibacteria* presente en un 13.7% y reportado como productor de lactato, etanol y acetato (Rios *et al.*, 2013). Además en estudios más recientes Liu *et al.*, (2020) reportó la habilidad de este microorganismo de producir butirato, por lo que un cultivo dominado por estos dos géneros (*Bifidibacteria* y *Butyrivibrio*) los cuales presentaron mayor tolerancia a pH ácidos en comparación con clostridiales previamente reportados como productores de ACCM, podría explicar la alta concentración hallada de C4 (4.3 g/L) durante este periodo de acidificación.

Para el caso de ácidos carboxílicos impares como los ácidos propiónico y valérico generados en esta misma etapa, el género *Acidipropionibacterium* podría ser el principal encargado de producción de C3 ya que este género ha demostrado gran habilidad para desarrollarse en valores de hasta 3 y 4 de pH (Luo *et al.*, 2017). Mientras que para ácido valérico, el género *Veillonellaceae* reportado como productor de valerato también fue detectado en un 4.8%.

Es interesante mencionar que en esta etapa también se detectó la presencia del género *Ureibacillus* (6.9%) perteneciente a la clase Bacilli, el cual ha sido asociado a la producción de piruvato a partir de etanol (Ma *et al.*, 2022). El piruvato juega un papel importante en el proceso de elongación de cadena ya que este se oxida aún más a acetyl-CoA y CO<sub>2</sub>. Y el acetyl-CoA derivado se utiliza para la formación de los ácidos butírico y hexanoico a través de la BOI (Contreras-Dávila *et al.*, 2020).

Durante esta fase de acidificación la concentración de C<sub>6</sub> no presentó ningún incremento al obtenido en la etapa anterior y debido a que los microorganismos productores de este ácido han demostrado gran sensibilidad ante pequeñas variaciones de pH, la condición ácida en esta etapa impidió el desarrollo de estos géneros productores de este ACCM.

Si bien en el Lote 1 podemos ver un inóculo dominado por la clase Clostridia (33.2%) con géneros como *Caproiciproducens* (11.2%) y *C.kluyveri* (8.5%) también se observó la presencia de *Megasphaera hexanoica* (Clase Negativicutes) presente en un 15.6%, reportada mayoritariamente como consumidora de lactato (Candry *et al.*, 2020), lo que podría explicarse por una posible formación de lactato en la fase anterior en donde diversos géneros productores de este donador de electrones ya antes mencionados fueron detectados.

Por su parte para *Caproiciproducens* spp. hasta el momento de esta investigación, solo ha sido reportada su capacidad para utilizar azúcares y lactato para la producción de ACCM (Contreras-Dávila *et al.*, 2020; Candry y Ganigué, 2021). Por lo que se podría prever la capacidad de los organismos *Caproiciproducens* para metabolizar el etanol de manera similar al lactato y los azúcares, debido a que el alargamiento de cadena por estos microorganismos es llevado mediante la BOI (Candry y Ganigué, 2021).

Aunque en menor porcentaje en este Lote 1 también fueron detectados géneros como *Bacteroides* (5.4%), asociado previamente a la producción de C<sub>6</sub> utilizando lias vitivinícolas como sustrato (Kucek *et al.*, 2016) y *Rummeliibacillus*, un productor de ácido hexanoico a partir de etanol y acetato reportado recientemente, presente en un 8.5%. (Liu *et al.*, 2022).



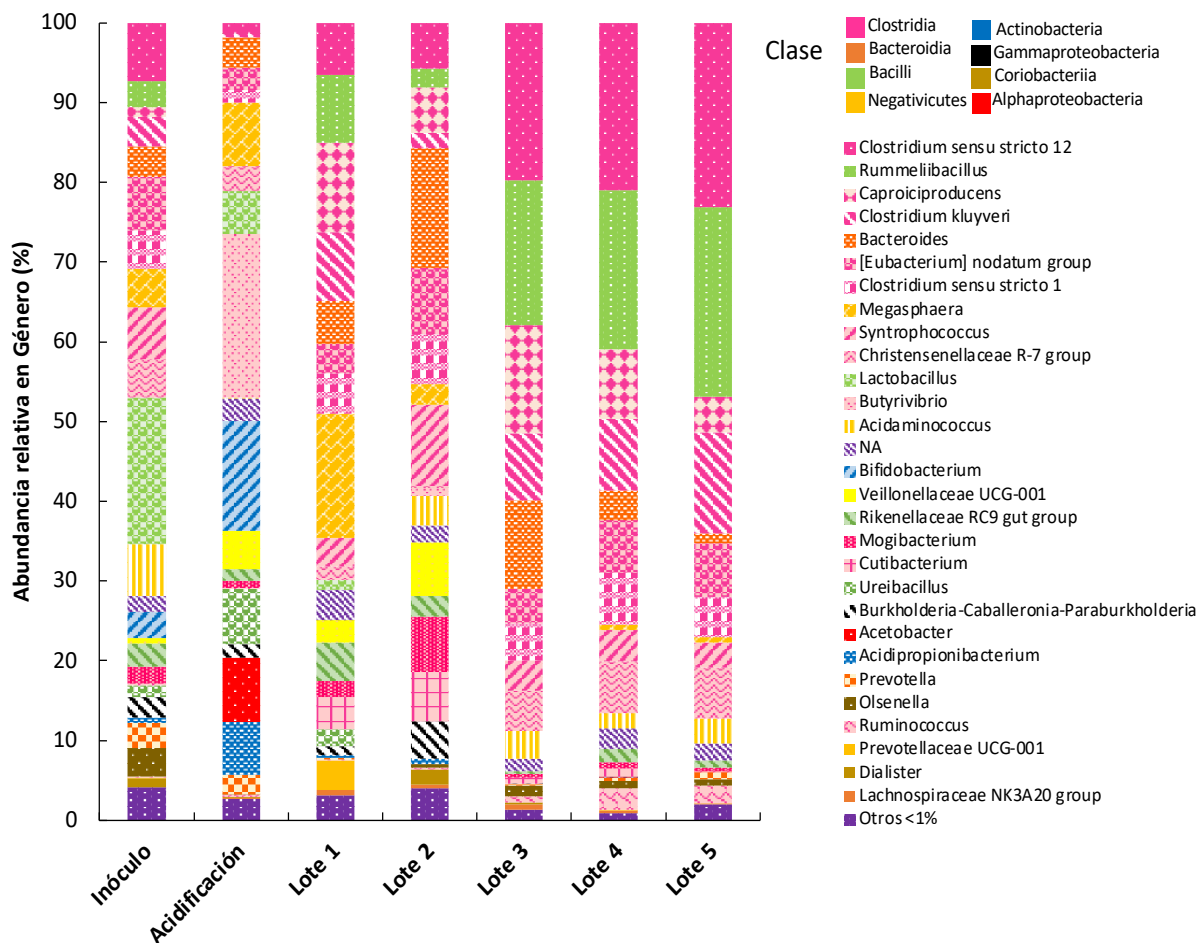
Durante el Lote 2 es posible notar que microorganismos importantes en la formación de C6 como *C.kluyveri*, *C. sensu stricto 12* y *Rummeliibacillus* las cuales prefieren valores de pH igual a 6 (Candry *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022) se vieron afectados a causa de los constantes cambios de pH debido a la falla presentada en el controlador observándose así una disminución de su abundancia comparada con el lote anterior. Caso contrario para el género *Bacteroides* el cual se vió favorecido aumentando hasta 3 veces su abundancia (15%) respecto al Lote 1. Kuceck *et al.*, (2016), utilizando lias de vino como sustrato observó que la mayor producción de C6 se obtuvo cuando trabajó a valores de pH de 5.3 lo cual podría explicar el enriquecimiento de este género durante este Lote.

El género *Mogibacterium* perteneciente a la clase Clostridia y el cual podría estar relacionado a la producción de heptanoato también se observó en un 6.9%.

Finalmente en los lotes 3, 4 y 5 se observó una comunidad semejante conformada en más del 50% por la clase Clostridia, dominada nuevamente por los géneros *C. sensu stricto 12* presente en un 19.8 a 23.1%, *C. sensu stricto 1* en 4.6 a 6.6% y *C.kluyveri* en 8 a 12%.

También es posible observar que la abundancia relativa de *Caproiciproducens* disminuyó de un 13.5 a un 4.4% lo cual podría deberse a dos principales causas: la preferencia de este género por valores de pH más ácidos (Candry *et al.*, 2020) o bien la ausencia de lactato ya que si bien no se ha comprobado si este microorganismo tiene la habilidad de consumir etanol para producir ACCM además de lactato, su crecimiento podría haberse afectado por su velocidad de crecimiento, la cual es menor a la de *C.kluyveri* por ejemplo. El mismo comportamiento fue observado con el género de *Bacteroides* el cual pasó de una abundancia del 11 al 1%, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Kuceck *et al.*, (2016) en donde valores mayores a 5.3 en pH inhibieron el crecimiento de este género afectando el rendimiento de la producción de C6.

*Rummeliibacillus* por su parte al igual que la clase Clostridia se vio favorecida con la estabilización del pH a 6, incrementando su abundancia más de 10 veces su valor comparando con el Lote 2 y manteniéndose en concentraciones del 18 hasta 23.7% en el Lote 5. Esta bacteria es capaz de utilizar otras fuentes de carbono además del etanol y según los resultados obtenidos por Liu *et al.*, (2022) es la segunda cepa con mayor producción de C6 reportada.



**Figura 28.** Abundancias relativas de la comunidad microbiana a nivel género para cada lote estudiado

El estudio de la dinámica poblacional durante la operación por lotes proporcionó información más detallada en cuanto a los gremios funcionales que participan durante la producción de ACCM y como estos se ven favorecidos o inhibidos de acuerdo a las condiciones de temperatura y en mayor medida el pH. Además, las fallas en el controlador permitieron identificar géneros productores de ACCM resistentes a pH ácidos menores de 6 pero mayores a 5.6 como *Caproiciproducens* y *Bacteroides*. También es importante resaltar la robustez de este inóculo, el cual de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, la comunidad es capaz de mantenerse y recuperarse de condiciones poco favorables sin pérdida de gremios funcionales importantes para la producción de ácido hexanoico, sin embargo para una producción estable y eficiente de ácido hexanoico es fundamental un control estricto de pH y una proporción mayoritaria de géneros pertenecientes a la clase Clostridia.

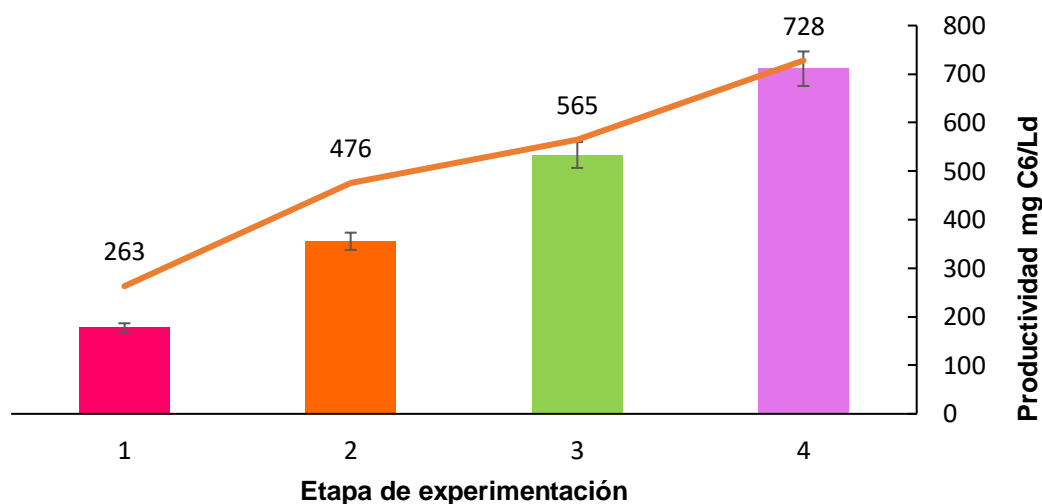
#### **7.4 CONCLUSIONES**

El funcionamiento por lotes permite mantener estable la producción de ACCM, alcanzando producciones de hasta 7.2 g/L de ácido hexanoico. Se encontró que la implementación del proceso de extracción bifásica in-situ permite triplicar la productividad de 206 a 728 mg C6/L-d confirmando la hipótesis de que la separación oportuna de ACCM a concentraciones por debajo 7 g/L fue la responsable de incrementar su producción al evitar la inhibición. De igual manera se encontró que el pH juega un papel determinante debido a la alta sensibilidad de los microorganismos a ligeras variaciones de pH, lo cual permite controlar la ruta metabólica hacia el ACCM de interés a lo largo del cultivo. Los análisis filogenéticos de la secuencia del gen 16S rRNA revelaron que la presencia de Clostridiales es esencial cuando se utiliza etanol como donador de electrones.

## CAPÍTULO VIII

### DISCUSIÓN FINAL

En la Figura 29 se muestran las productividades máximas alcanzadas en cada etapa desarrollada durante el presente trabajo de investigación, en donde resulta fácil observar como el desarrollo de cada una de las etapas permitió mejorar la productividad en un valor de casi el doble y más del triple si se compara la etapa inicial (263 mg C6) con la etapa final (728 mg C6/L-d) en donde se llevó a cabo la producción de ACCM a escala laboratorio bajo todas las condiciones halladas en las etapas anteriores y que dicho valor es hasta 27 veces superior al obtenido por Kuceck *et al.*, (2016), en donde utilizando lias de vino tinto como sustrato y bajo condiciones de pH= 5.2 y 37 °C alcanzó una productividad de 26.28 mg C6/L-d.



**Figura 29.** Productividad máxima alcanzada en cada etapa durante el presente trabajo de investigación. Etapa 1: pH 5.5, T 37 °C; Etapa 2: pH 5.5, T 37 °C, Etapa 3: pH 6, T 35 °C; Etapa 4: pH 6, T 35 °C.

Este trabajo permitió conocer que para una producción eficiente de ACCM utilizando un cultivo mixto es necesaria la presencia en mayor proporción de microorganismos pertenecientes a la clase Clostridia cuando se usa etanol como donador de electrones, ya que en aquellos inóculos en donde no se identificaron microorganismos pertenecientes a esta clase no se detectó la generación de ACCM.

En cuanto al pH y la temperatura, este trabajo de investigación demuestra como trabajar en una temperatura de 35 ° favorece la producción de ACCM pares (C6 y C8). Sin embargo es el pH quien tiene un mayor impacto en formación del ácido carboxílico final formado. En donde valored de pH < 6 favorecen la producción de ácidos carboxílicos impares como C3, C5 (y C7 si se trabaja a 30 °C). Mientras que un pH >6.5 favorece la formació de ACCC pares como C2 y C4. Siendo así un pH = 6 el ideal para la producción de C6 y C8.

Esta información es sumamente valiosa ya que siendo el pH uno de los parámetros más importantes para la producción de ACCM y del cual se ha brindando información muy escasa, mediante el conocimiento aportado en este trabajo es posible tener un mayor control sobre el cultivo, dirigiendo la ruta hacia el metabolito de interés mediante pequeñas variaciones del pH debido a la gran sensibilidad que poseen los microorganismos.

Aunque en este trabajo se identificaron principales microorganismos involucrados en el alargamiento de cadena. Se necesita una descripción detallada de la función de los microorganismos que participan en el proceso de elongación de cadena. La mayoría de los estudios discuten la presencia o ausencia de microorganismos particulares; sin embargo, determinar las relaciones e interacciones tróficas entre los organismos y su participación en la formación de ACCM resulta ya en una necesidad importante de abordarse.

El conocimiento obtenido en dicha área podría ayudar a elegir las condiciones operativas particulares requeridas para una alta productividad del proceso. También la elección del sustrato es una cuestión central para disminuir el costo de producción. El sustrato ideal es aquel que aporta simultáneamente los ácidos grasos volátiles y el agente reductor. Los residuos de la fermentación alcohólica, como los efluentes vitivinícolas o los efluentes de la industria láctea (con lactato como agente reductor), son sustratos prometedores. Finalmente un aspecto muy importante es tener un método económico para recuperar estos ácidos de los medios de cultivo.

La extracción es el método más aplicado para recuperar ácidos carboxílicos del cultivo de fermentación. Este método incluye la precipitación, la extracción líquido-líquido, la destilación, la diálisis por membrana, la electrodiálisis y el intercambio iónico. Con suficientes datos, se puede realizar un análisis del ciclo de vida y los resultados podrían ser relevantes para escalar las mejores tecnologías. En resumen, se necesitan cultivos mixtos nativos, residuos como sustratos y una forma sencilla y económica de recuperar los ACCM para una implementación industrial exitosa.

## CAPÍTULO IX

### CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ La presencia de *Clostridium* es esencial para un inóculo nativo eficiente en la producción de ACCM cuando se utiliza etanol como donador de electrones.
- ✓ El inóculo nativo de efluentes vitivinícolas posee un mayor potencial en la producción de ácido hexanoico comparado con los otros inóculos estudiados. Sin embargo, el inóculo ruminal es más versátil que el inóculo nativo de efluentes vitivinícolas ya que se generan ácidos carboxílicos de cadena con más de seis carbonos, como los ácidos heptanoico y octanoico los cuales poseen un mayor valor comercial y biotecnológico.
- ✓ Una proporción minoritaria de microorganismos ruminales (20%) y un 80% de nativos de efluentes vitivinícolas permite la generación de ácido octanoico (1.91 g/L) manteniendo concentraciones competitivas de ácido hexanoico (565 mg/L-d) debido a la presencia de microorganismos como *C.sensu stricto*, *C.kluyveri*, *Rummellibacillus* que favorecen la utilización de la energía del proceso de manera más eficiente.
- ✓ La mayor productividad de ácido hexanoico (714 mg/L-d) y octanoico (350 mg/L-d) sin separación de ACCM se obtuvo bajo condiciones de pH 6 y 35 °C, y aunque la presencia de clostridiales es esencial para la formación de ACCM, es la temperatura y en mayor medida el pH quienes seleccionan los microorganismos y en consecuencia la ruta metabólica que se lleva a cabo debido a la gran sensibilidad ante pequeñas variaciones (0.5 unidades).
- ✓ Los análisis de la comunidad microbiana indicaron que las variantes de secuencia de amplicones para Clostridia, Bacilli y Negativicutes se correlacionaron positivamente con la producción de ACCM.
- ✓ La operación discontinua permite mantener estable la producción de ACCM, alcanzando producciones de hasta 7.2 g/L de ácido hexanoico.
- ✓ La oportuna separación de dichos ácidos permitió triplicar la productividad de 206 a 728 mg C6/L-d.
- ✓ La alta sensibilidad de los microorganismos a ligeras variaciones de pH permite controlar la ruta metabólica hacia el ACCM de interés a lo largo del cultivo.

## PRODUCTOS

### ARTÍCULOS

- **Villegas-Rodríguez, S**, Buitrón, G., 2020. Performance of native open cultures (winery effluents, ruminal fluid, anaerobic sludge and digestate) for medium-chain carboxylic acid production using ethanol and acetate. *Journal of Water Process Engineering* 40:101784. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101784>.
- **Villegas-Rodríguez, S**, Arreola-Vargas, J, Buitrón, G., 2023. Influence of pH and temperature on the performance and microbial community during the production of medium-chain carboxylic acids using winery effluents as substrate. *Environmental Science and Pollution Research (Enviado)*

### CONGRESOS Y TALLERES

2022: Second International Chain Elongation Conference. Netherlands.

2022: Taller: Recuperación de recursos durante el tratamiento de aguas bajo el concepto de economía circular. En el tema de: Ácidos carboxílicos de cadena media.

2022: Aguas residuales en México: visión desde el laboratorio de investigación. (IWA-MX: Young Water Professionals). Uruguay-México.

2022: 6th Congress International Water Association (young water professionals). México.

2021: Microbial ecology and water engineering (MEWE) Specialist Conference: Microbial Ecology Data & Principles for Water Systems and Industries. Holanda.

2020: First International Chain Elongation Conference. Netherlands.

2020: XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México.

2019: 9th IWA Specialized Conference on Sustainable Viticulture, Winery Wastes and Agro-industrial wastewater management. (International Water Association).



## BIBLIOGRAFÍA

- Agler, M. T., Wrenn, B. A., Zinder, S. H., Angenent, L. T. 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends Biotechnol.* 29, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.11.006>
- Agler, M.T., Spirito C.M., Usack, J.G., Werner, J.J., Angenent, L.T. 2012. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates, *Energy Environ. Sci.* 5, 8189–8192. <https://doi.org/10.1039/c2ee22101b>
- Amaya, O.M., Barragán, M.T.C., Tapia, F.J.A. 2013. Microbial Biomass in Batch and Continuous System. in *Biomass Now – Sustainable Growth and Use*, ed Hermosillo, Sonora. México: InTech. 449-478. doi: 10.5772/55303
- Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A., Domínguez- Espinosa, R. 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 22, 477-485. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.001>
- Angenent, L. T., Richter, H., Buckel, W., Spirito, C. M., Steinbusch, K. J. J., Plugge, C. M. 2016. Chain elongation with reactor microbiomes: open-culture biotechnology to produce biochemicals. *Environ. Sci. Technol.* 50, 2796–2810. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04847>
- APHA, Awwa, WFE. 2005. Standard methods for the examination of water and waste- water, 21th ed. Washington, D.C., USA.
- Barker, H. A., Taha, S. M. 1942. *Clostridium kluyveri*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol. *J.Bacteriol.* 43 (3), 347–363. <https://doi.org/10.1128/jb.43.3.347-363.1942>
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V, Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., et al. 2002. Modeling anaerobic digestion of dairy manure using the IWA Anaerobic Digestion Model no. 1 (ADM1). *Water Sci. Technol.* 45 (2002) 65–73, <https://doi.org/10.2166/wst.2008.678>
- Barker, H.A., Kamen, M.D., Bornstein, B.T. 1945. The synthesis of butyric and caproic acids from ethanol and acetic acid by *Clostridium kluyveri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 31, 373–381. <https://doi.org/10.1073/pnas.31.12.373>
- Bolaji I.O., Dionisi D. 2017. Acidogenic fermentation of vegetable and salad waste for chemicals production: effect of pH buffer and retention time. *J. Environ. Chem. Eng.* 5 5933-5943. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.001>

- Bornstein, B.T., Baker, H.A. 1947. The energy metabolism of *Clostridium Kluyveri* and the synthesis of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 1948, 659–669. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52752-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52752-1)
- Buckel, W., Thauer, R.K. 2013. Energy conservation via electron bifurcating<sup>[1]</sup>ferredoxin reduction and proton/Na(+) translocating ferredoxin oxidation, *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 94–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.07.002>
- Buitrón, G., Kumar, G., Martínez-Arce, A., Moreno, G. 2014. Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H<sub>2</sub>-SBR + CH<sub>4</sub>-UASB) using tequila vinasses. *International Journal of Hydrogen Energy.* 39, 19249-19255. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.139>
- Butkus, M. A., Hughes, K. T., Bowman, D. D., Liotta, J. L., Jenkins, M. B., Labare, M. P. 2011. Inactivation of *Ascaris suum* by short-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (1), 363-366. <https://doi.org/10.1128/AEM.01675-10>
- Candry, P., Huang, S., Carvajal-Arroyo, J.M., Rabaey, K., Ganigue, R., 2020. Enrichment and characterisation of ethanol chain elongating communities from natural and engineered environments. *Sci. Rep.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60052-z>
- Candry, P., L. Radić, J. Favere, J.M. Carvajal-Arroyo, K. Rabaey, R. Ganigué. 2020. Mildly acidic pH selects for chain elongation to caproic acid over alternative pathways during lactic acid fermentation, *Water Res.* 186 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116396>
- Cavalcante, W, Carrhá Leitão, R, Gehring, T, Largus, T, Angenent, S. T. 2017. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. *Process Biochemistry.* 54, 106-119. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.024>
- Chen, W.S., Ye, Y., Steinbusch, K.J.J., Strik, D.P.B.T.B. Buisman, C.J.N. 2016. Methanol as an alternative electron donor in chain elongation for butyrate and caproate formation. *Biomass and Bioenergy.* 93, 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.07.008>
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour. Technol.* 99 (10), 4044-4064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>
- Cheon, Y., Kim, J.S., Park, Jun Bum, Heo, P., Lim, J.H., Jung, G.Y., Seo, J.H., Park, J.H., Koo, H.M., Cho, K.M., Park, Jin Byung, Ha, S.J., Kweon, D.H., 2014. A biosynthetic pathway for hexanoic acid production in *Kluyveromyces marxianus*. *J. Biotechnol.* 182–183, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.010>

- Choi, K., Jeon, B.S., Kim, B.C., Oh, M.K., Um, Y., Sang, B.I. 2013. In situ biphasic extractive fermentation for hexanoic acid production from sucrose by *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 1094-1107. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0310-3>
- Contreras-Dávila, C.A., Carrión, V.J., Vonk, V.R., Buisman, C.N.J., Strik, D.P.B.T.B., 2020. Consecutive lactate formation and chain elongation to reduce exogenous chemicals input in repeated-batch food waste fermentation. *Water Res.* 169. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115215>
- De Smit, S.M., De Leeuw, K.D., Buisman, C.J.N., Strik, D.P.B.T.B. 2019. Continuous n-valerate formation from propionate and methanol in an anaerobic chain elongation open-culture bioreactor. *Biotechnol. Biofuels* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1468-x>
- Desbois, A. P. 2012. Potential applications of antimicrobial fatty acids in medicine, agricultura and other industries. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 7, 111–122. [10.2174/157489112801619728](https://doi.org/10.2174/157489112801619728)
- Díaz-Báez, M., Espitia, S., Molina, F. 2002. Digestión Anaerobia una Aproximación a la Tecnología. UNIBIBLIOS Bogotá, Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/49691>
- Duber, A., Zagrodnik, R., Gutowska, N., Łężyk, M., Oleskiewicz-Popiel, P. 2022. Lactate and Ethanol Chain Elongation in the Presence of Lactose: Insight into Product Selectivity and Microbiome Composition. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 10, 3407–3416. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05869>
- Eerten-Jansen, V., Ter-Heijne, A., Grootcholten, T.I.M., Steinbusch, K. J.J., Sleutels, T.H.J.A., Hamelers, H.V.M. 2013. Bioelectrochemical production of caproate and caprylate from acetate by mixed cultures. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1, 513-518. <https://doi.org/10.1021/sc300168z>
- Elsdén, S. R., Volcani, B. E., Gilchrist, F. M. C., Lewis, D. 1956. Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. *J. Bacteriol.* 72 (5), 681–689. <https://doi.org/10.1128/jb.72.5.681-689.1956>
- Ganigué, R., Sánchez-Paredes, P., Bañeras, L., Colprim, J. 2016. Low fermentation pH is a trigger to alcohol production, but a killer to chain elongation. *Front. Microbiol.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00702>
- Ge, S.J., Usack, J.G., Spirito, C.M., Angenent, L.T. 2015. Long-Term n-Caproic Acid Production from Yeast-Fermentation Beer in an Anaerobic Bioreactor with Continuous Product Extraction. *Environmental Science & Technology*, 49 (13), 8012-8021. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00238>

- Genthner, B. R., Davis, C. L., Bryant, M. P. 1981. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1), 12–19. <https://doi.org/10.1128/aem.42.1.12-19.1981>
- Gest, H. 1995. A serendipic legacy: *Erwin Esmarch's* isolation of the first photosynthetic bacterium in pure culture. *Photosynth. Res.* 46 (3), 473–478. <https://doi.org/10.1007/BF00032302>
- González-Cabaleiro, R., Lema, J. M., Rodríguez, J., Kleerebezem, R. 2013. Linking thermodynamics and kinetics to assess pathway reversibility in anaerobic bioprocesses. *Energy Environ. Sci.* 6, 3780-3789. <https://doi.org/10.1039/C3EE42754D>
- Grootcholten, T. I. M.; Strik, D. P. B. T. B., Steinbusch, K. J. J., Buisman, C. J. N., Hamelers, H. V. M. 2014. Two-stage medium chain fatty acid (MCFA) production from municipal solid waste and ethanol. *Appl. Energy.* 116, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.11.061>
- Grootcholten, T. T., Steinbusch, K. J., Hamelers, H. V., Buisman, C. J. 2013. Improving medium chain fatty acid productivity using chain elongation by reducing the hydraulic retention time in an upflow anaerobic filter. *Bioresour. Technol.* 136, 735-738. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.114>
- Grootcholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2013b. High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation. *Bioresour. Technol.* 136, 715–718. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.085>
- Gujer, W., Zehnder, J. B. 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Sci. Tech.* 5, 127-167. <https://doi.org/10.2166/wst.1983.0164>
- Harvey, B.G., Meylemans, H.A. 2014. 1-Hexene: a renewable C<sub>6</sub> platform for full-performance jet and diesel fuels. *Green Chem.* 16, 770-776. <https://doi.org/10.1039/C3GC41554F>
- Haynes, W M. 2013. Handbook of Chemistry and Physics Online. LLC: Taylor and Francis Group, 94th edition. <https://doi.org/10.1201/b17118>
- International Organization of Vine and Wine (2021) Statistical Report on World Vitiviculture, <https://www.oiv.int>
- Jeon, B.S; Kim, B.C., Um, Y., Sang, B.I. 2010. Production of hexanoic acid from D-galactitol by a newly isolated *Clostridium sp. BS-1*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88(5), 1161-1167. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2827-5>
- Jeon, B.S., Moon, C., Kim, B.C., Kim, H., Um, Y., Sang, B.I. 2013. In situ extractive fermentation for the production of hexanoic acid from galactitol by *Clostridium sp. BS1*, *Enzyme Microb. Technol.* 53, 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.02.008>

- Kenealy, W.R., Cao, Y., Weimer, P.J. 1995. Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 507-513. <https://doi.org/10.1007/BF00169952>
- Kenealy, W.R., Waselefsky, D.M., 1985. Studies on the substrate range of *Clostridium kluyveri*; the use of propanol and succinate. *Arch. Microbiol.* 141, 187–194. <https://doi.org/10.1007/BF00408056>
- Kleerebezem, R., Joosse, B., Rozendal, R., Loosdrecht, M.C.M. Van, 2015. Anaerobic digestion without biogas? *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology.* <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9374-6>
- Kucek, L.A., Nguyen, M., Angenent, L.T. 2016a. Conversion of L-lactate into n-caproate by a continuously fed reactor microbiome, *Water Res.* 93, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.018>
- Kucek, L.A., Xu, J., Nguyen, M., Angenent, L.T. 2016. Waste conversion into n-caprylate and n-caproate: resource recovery from wine lees using anaerobic reactor microbiomes and in-line extraction. *Front. Microbiol.* 7,1892. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01892>
- Levy, P. F., Sanderson, J. E., Ashare, E., Riel, SRd. 1983. Alkane liquid fuels production from biomass. In: Wise DL. *Liquid fuels developments*. Boca Raton, FL: CRC; 159-88. <https://doi.org/10.2172/5038472>
- Liebergesell, M., Hustede, E., Timm, A., Steinbuchel, A., Fuller, R.C., Lenz, R.W., Schlegel, H.G. 1991. Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* 155, 415–421. <https://doi.org/10.1007/BF00244955>
- Lin, C.Y., Chen, C.C. 1999. Effect of heavy metals on the methanogenic UASB granule. *Wat. Res.*, 33(2), 409-416. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00211-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00211-5)
- Liu, C., Du, Y., Zheng, J., Qiao, Z., Luo, H., Zou, W. 2022. Production of caproic acid by *Rummeliibacillus suwonensis* 3B-1 isolated from the pit mud of strong-flavor baijiu. *J. Biotechnol.* 358, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.08.017>
- Liu, C., Luo, G., Liu, H., Yang, Z., Angelidaki, I., O-Thong, S., Liu, G., Zhang, S., Wang, W. 2020. CO as electron donor for efficient medium chain carboxylate production by chain elongation: Microbial and thermodynamic insights. *Chem. Eng. J.* 390, 124577. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124577>
- Liu, P., Jarboe L.R. 2012. Metabolic engineering of biocatalysts for carboxylic acids production. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 3, 1-9. <https://doi.org/10.5936/csbj.201210011>

- Lonkar, S., Fu, Z., Holtzapple, M. 2016. Optimum alcohol concentration for chain elongation in mixed-culture fermentation of cellulosic substrate. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 2597–2604. <https://doi.org/10.1002/bit.26024>
- Luo, J., Ranadheera, C.S., King, S., Evans, C., Baines, S., 2017. In vitro investigation of the effect of dairy propionibacteria on rumen pH, lactic acid and volatile fatty acids. *J. Integr. Agric.* 16, 1566–1575. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61556-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61556-3)
- Ma, H., Yu, Z., Wu, W., Fu, P., Xia, C., Shiung Lam, S., Boer Emilia, D., Wang, Q., Gao, M., 2022. Effects of ethanol addition on caproic acid production and rumen microorganism community structure from straw fermentation. *Fuel* 327, 125142. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125142>
- Marounek, M., Fliegrova, K., Bartos, S. 1989. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (6), 1570-1573. <https://doi.org/10.1128/aem.55.6.1570-1573.1989>
- Mu, Y., Wang, G and Yu HQ. 2006. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresource Technology*; 97:1302–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.014>
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rezvani, F., Ardestani, F., Najafpour, G. 2017. Growth kinetic models of five species of Lactobacilli and lactose consumption in batch submerged culture. *Brazilian J. Microbiol.* 48, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.007>
- Rios-Covian, D., Arboleya, S., Hernandez-Barranco, A.M., Alvarez-Buylla, J.R., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., De Los Reyes-Gavilan, C.G. 2013. Interactions between Bifidobacterium and Bacteroides species in cofermentations are affected by carbon sources, including exopolysaccharides produced by bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7518–7524. <https://doi.org/10.1128/AEM.02545-13>
- Roghair, M., Liu, Y., Adiatma, J.C., Weusthuis, R.A., Bruins, M.E., Buisman, C.J.N., Strik, D.P.B.T.B. 2018. Effect of n-Caproate Concentration on Chain Elongation and Competing Processes. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6, 7499–7506. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00200>
- Seedorf, H., Fricke, W.F., Veith, B., Brüggemann, H., Liesegang, H. Strittmatter, A. 2008. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711093105>

- Shahid, F. 2005. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Edible Oils and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 1, 629.
- De Smit, S.M., K.D. De Leeuw, C.J.N. Buisman, D.P.B.T.B. Strik. 2019. Continuous n-valerate formation from propionate and methanol in an anaerobic chain elongation open-culture bioreactor. *Biotechnol. Biofuels*. 12: 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1468-x>.
- Smith, D.P., McCarty, P.L. 1989. Reduced product formation following perturbation of ethanol- and propionate-fed methanogenic CSTRs. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 885–895. <https://doi.org/10.1002/bit.260340702>
- Spirito, C.M., Marzilli, A.M., Angenent, L.T. 2018. Higher Substrate Ratios of Ethanol to Acetate Steered Chain Elongation toward n-Caprylate in a Bioreactor with Product Extraction. *Environ. Sci. Technol.* 52, 13438–13447. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03856>
- Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J.M., Angenent, L.T. 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.003>
- Steinbusch, K., Hamelers, H.V.M., Plugge, C.M., Buisman, C. 2011. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. *Energy Environ. Sci.* 4, 216–224. <https://doi.org/10.1039/C0EE00282H>
- Thauer, R., Jungermann, K., Henninger, H., Wenning, J., Decker, K. 1967. The energy metabolism of *Clostridium Kluyveri*. *Eur. J. Biochem.* 4, 173–180. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb00189.x>
- Vasudevan, D., Richter, H., Angenent, L.T. 2014. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes. *Bioresour. Technol.* 151, 378–382. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.105>
- Verser, D.W., Park, M., 2012. Method for the indirect production of butanol and hexanol. US Patent US8252567. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.105>
- Wallace, R. J., Chaudhary, L. C., Miyagawa, E., McKain, N., Walker, N. D. 2004. Metabolic properties of *Eubacterium pyruvatorans*, a ruminal, "hyper-ammonia-producing" anaerobe with metabolic properties analogous to those of *Clostridium kluyveri*. *Microbiology*. 150 (9), 2921–2930. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27190-0>

- Wallace, R. J., McKain, N., McEwan, N. R., Miyagawa, E., Chaudhary, L. C., King, T. P., Walker, N. D., Apajalahti, J. H. A., Newbold, C. J. 2003. *Eubacterium pyruvativorans* sp. nov., a novel non saccharolytic anaerobe from the rumen that ferments pyruvate and amino acids, forms caproate and utilizes acetate and propionate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (4), 965-970. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02110-0>
- Wang, J., Liu, H., Fu, B., Xu, K., Chen, J. 2013. Trophic link between syntrophic acetogens and homoacetogens during the anaerobic acidogenic fermentation of sewage sludge. *Biochem. Eng. J.* 70, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.09.012>
- Wang, K., Yin, J., Shen, D., Li, N. 2014. Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: effect of pH. *Bioresour. Technol.* 161 (2014) 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.088>
- Weimer, P.J., Nerdaahl, M., Brandl, D.J. 2015. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium kluyveri*. *Bioresour. Technol.* 175, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.054>
- Weimer, P.J., Stevenson, D.M. 2012. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 461-466. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3751-z>
- Wu, Q., Bao, X., Guo, W., Wang, B., Li, Y., Luo, H., Wang, H., Ren, N. 2019. Medium chain carboxylic acids production from waste biomass: Current advances and perspectives. *Biotechnol. Adv.* 37, 599–615. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.003>
- Wu, Q., Guo, W., Bao, X., Meng, X., Yin, R., Du, J., Zheng, H., Feng, X., Luo, H., Ren, N., 2018. Upgrading liquor-making wastewater into medium chain fatty acid: Insights into co-electron donors, key microflora, and energy harvest. *Water Res.* 145, 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.046>
- Xiong, B., Richard, T. L., Kumar, M. 2015. Integrated acidogenic digestion and carboxylic acid separation by nanofiltration membranes for the lignocellulosic carboxylate platform. *J. Membr. Sci.* 489, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.04.022>
- Xu, J., Guzman, J. J., Andersen, S. J., Rabaey, K., Angenent, L. T. 2015. In-line selective phase separation of medium-chain carboxylic acids using membrane electrolyst. *Chem. Commun.* 51, 6847-6850. <https://doi.org/10.1039/C5CC01897H>
- Yin, Y., Zhang, Y., Karakashev, D. B., Wang, J., Angelidaki, I. 2017. Biological caproate production by *Clostridium kluyveri* from ethanol and acetate as carbon sources. *Bioresour. Technology.* 241, 638-644. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.184>



- Zhang, C., Yang, L., Tsapekos, P., Zhang, Y., Angelidaki, I. 2019. Immobilization of *Clostridium kluyveri* on wheat straw to alleviate ammonia inhibition during chain elongation for n-caproate production. *Environ. Int.* 127, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.032>
- Zhang, W., Yin, F., Dong, H., Cao, Q., Wang, S., Xu, J., Zhu, Z. 2020. Bioconversion of swine manure into high-value products of medium chain fatty acids. *Waste Manag.* 113, 478–487. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.06.021>
- Zhang, Z. P., Show, K. Y., Tay, J. H., Liang, D. T., Lee, D. J., Jiang, W. J. 2006. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem.* 41, 2118-2123. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.021>
- Zhu, X., Tao, Y., Liang, C., Li, X., Wei, N., Zhang, W., Zhou, Y., Yang, Y., Bo, T. 2015. The synthesis of n-caproate from lactate: A new efficient process for medium-chain carboxylates production. *Sci. Rep.* 5. Article number: 14360. <https://doi.org/10.1038/srep14360>