

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**"EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y
ETANOL POR *ESCHERICHIA COLI* A PARTIR DE
ALMIDÓN"**

Tesis que presenta

Rafael Enrique Gutiérrez Sánchez

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

San Luis Potosí, S.L.P., Mayo de 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y ETANOL POR *E. COLI* A PARTIR DE ALMIDÓN” presentada para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Rafael Enrique Gutiérrez Sánchez** y aprobada el **22 de febrero de 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
Director de la tesis

Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández
Asesor

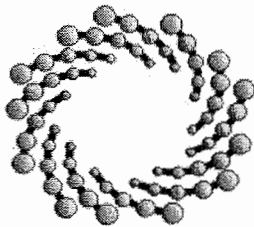
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Asesora



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo, el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. CVU 880461) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Se contó con el apoyo del proyecto CONACyT Ciencias Básicas 281700



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 217 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 21 días del mes de mayo del año 2021, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández	Secretario	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Rafael Enrique Gutiérrez Sánchez

sobre la Tesis intitulada:

Evaluación de la producción de hidrógeno y etanol por Escherichia coli a partir de almidón

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Antonio De León Rodríguez

El Jurado, después de deliberar, determinó

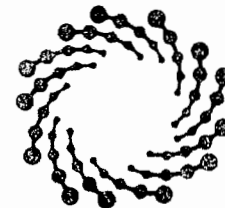
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 21 días del mes de mayo de 2021.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



IPICYT
SECRETARÍA ACADÉMICA
INSTITUTO POTOSINO DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.

Dedicatorias

A toda la comunidad IPICYT.

Agradecimientos

Al Dr. Antonio De León Rodríguez, su apoyo técnico y moral, su paciencia y entendimiento para conmigo, fueron piezas fundamentales para seguir adelante ante cada dificultad y dar término a esta experiencia completa, mi mayor gratitud y respeto, muchas gracias por todo y ofrecerme su amistad. El apoyo que me brindó cambió toda mi perspectiva de vida y prioridades.

Al Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández, tiene la mayor paciencia que he conocido, nunca se desesperó ante ninguna de las dudas por básicas que fueran, estuvo presente durante todo el tiempo que realicé experimentos, y me dio todo el apoyo técnico y emocional, me enseñó con aplomo todo lo que no sabía, muchas gracias por la empatía y soporte.

A la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz, por siempre estar atenta a los avances de mi tesis, gracias a sus revisiones poco a poco aprendo a ser más minucioso y a revisar detalles en cada actividad y proyecto que emprendo.

A Cecilia Álvarez Guzmán y Ana Karen Gutiérrez García, mis mentoras y sensei de fermentaciones, gracias por facilitarme tantos artículos, consejos, técnicas, protocolos y conocimiento, pero sobre todo su amistad. Son geniales, ¡nunca cambien! Marco, Dani, Arlette, Francisco y todos los integrantes del laboratorio 4, son de lo mejor, no lo hubiera logrado sin todos ustedes.

A mis padres, siempre presentes, siempre apoyándome, siempre impulsándome a seguir en todas las facetas de mi vida, sobra decir que es por ellos por quienes soy quien soy, y toda meta lograda y por lograr es completamente suya.

A Giovana, me saqué la lotería contigo, gracias por ser siempre comprensiva y estar conmigo desde que nos conocemos. Esta tesis es para ti.

A todos mis compañeros de generación, Alfredo, Víctor, Paco, Argenis, Gus, Max, Selene, Nohemí, Jenny, Monse, Nataly, Fer, Odalys ¡gracias por la amistad y las buenas vibras!, gracias por ser parte de esta experiencia de maestría conmigo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	II
Créditos institucionales	III
Acta del examen	IV
Dedicatorias	V
Agradecimientos	VI
Contenido	VIII
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	X
Resumen	XI
Abstract	XII
Introducción	1
Efectos negativos de la producción de hidrógeno a partir de combustibles fósiles.	1
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Materiales y métodos	13
Diseño experimental box-behnken	13
Fermentación oscura con el biocatalizador	13
Métodos analíticos	13
Resultados y discusión	15
Conclusiones	31
Referencias	32

Índice de Figuras

Figura 1. Vía general de fermentación.	3
Figura 2. Ruta metabólica para producción de hidrógeno a partir de piruvato.	5
Figura 3. Autotransportador aida	8
Figura 4. Redirección del flujo de carbono en la cepa wdhfp.	9
Figura 5. Estructura del plásmido paida_ amya.	11
Figura 6. Superficies de respuesta de la producción de biohidrógeno por la cepa de e. Coli wdhfp/aida_ amya a partir de almidón y usando un diseño box-behnken.	19
Figura 7. Superficies de respuesta del rendimiento de biohidrógeno por la cepa de e. Coli wdhfp/aida_ amya a partir de almidón y usando un diseño box-behnken.	21
Figura 8. Superficies de respuesta de la producción de bioetanol por la cepa de e. Coli wdhfp/aida_ amya a partir de almidón y usando un diseño box- behnken.	24
Figura 9. Superficies de respuesta del rendimiento de bioetanol por la cepa de e. Coli wdhfp/aida_ amya a partir de almidón y usando un diseño box- behnken.	27

Índice de Tablas

Tabla 1. Mutantes de <i>e. Coli</i> generadas y sus rendimientos en la producción de etanol e hidrógeno.*	10
Tabla 2. Diseño experimental box-behnken para evaluar la producción y el rendimiento de biohidrógeno y debioetanol de la cepa <i>e. Coli wdhfp/aida_ayma</i> en fermentaciones a partir de almidón.	16
Tabla 3. Anova obtenido para la variable producción de biohidrógeno (hp) a diferentes valores de concentración de almidón, temperatura y ph.	18
Tabla 4. Anova obtenido para la variable rendimiento de biohidrógeno (hy) a diferentes valores de concentración de almidón, temperatura y ph.	20
Tabla 5. Anova obtenido para la variable producción de etanol (ep) a diferentes valores de concentración de almidón, temperatura y ph.	23
Tabla 6. Anova obtenido para la variable rendimiento de etanol (ey) a diferentes valores de concentración de almidón, temperatura y ph.	25
Tabla 7. Resumen de las condiciones óptimas para maximizar la producción y el rendimiento de biohidrógeno y bioetanol.	28
Tabla 8. Otros metabolitos producidos en la fermentación con la cepa <i>wdhfp/aida_ayma</i> .	29
Tabla 9. Condiciones utilizadas, valores de producción y rendimiento respecto a la literatura.	30

Resumen

Evaluación de la producción de hidrógeno y etanol por *Escherichia coli* a partir de almidón

Más del 90% del hidrógeno (H_2) producido para fines industriales y comerciales proviene del gas natural y del petróleo cuyos procesos de refinamiento son altamente contaminantes. Por el contrario, la mayor cantidad de etanol se obtiene por procesos fermentativos usando principalmente levaduras. Sin embargo, a través de la ingeniería de vías metabólicas y la sacarificación-fermentación simultánea (SFS) y con el uso de microorganismos como *Escherichia coli* es posible producir simultáneamente biohidrógeno ($bioH_2$) y bioetanol a partir de distintos tipos de biomasa y residuos agroindustriales. *E. coli* WDHFP/pAIDA_AmyA es una cepa modificada genéticamente capaz de producir $bioH_2$ y bioetanol a partir de almidón. La finalidad de este trabajo fue encontrar las condiciones óptimas de fermentación como son la concentración de sustrato, el pH y la temperatura para la coproducción de $bioH_2$ y bioetanol por la cepa *E. coli* WDHFP/pAIDA_AmyA como biocatalizador de célula completa a través de un diseño experimental de superficie de respuesta tipo Box-Behnken. El modelo matemático propone como condiciones óptimas para producción y rendimiento de biohidrógeno: 18 g/L_{almidón}, pH de 8.1 y temperatura de 36.8°C en donde se predice una producción de 2,331.4 mL/L y un rendimiento de 132.4 mL H_2 /g_{almidón}. Estas condiciones son muy cercanas a los puntos centrales del diseño experimental. El modelo propone como condiciones óptimas para producción y rendimiento de bioetanol: 25g/L_{almidón}, pH de 7.9 y temperatura de 34.5°C. En estas condiciones se obtienen 7.1g/L de producción de bioetanol y un rendimiento de 0.28g/g_{almidón}. Estos valores de producción y rendimiento también son correspondientes a los resultados del modelo experimental.

Palabras clave: biohidrógeno; almidón; sacarificación y fermentación simultáneas; Box-Behnken.

Abstract

Evaluation of ethanol and hydrogen production by *Escherichia coli* from starch

Over 90% of the current hydrogen (H₂) production for industrial and commercial purposes becomes from natural gas and oil, whose refining processes are highly polluting. Whereas the ethanol is mainly produced by fermentation processes using yeasts. However, through metabolic engineering and simultaneous saccharification-fermentation (SFS), and using microorganisms such as *Escherichia coli*, it has become possible to produce biohydrogen (bioH₂) and bioethanol from different types of biomass and agroindustrial wastes. *E. coli* WDHFP/pAIDA_AmyA is a genetically engineered strain that produces bioH₂ and bioethanol from starch. The goal of this work was to optimize the operational conditions of fermentation such as substrate concentration, pH and temperature for the co-production of bioH₂ and bioethanol by *E. coli* WDHFP/pAIDA_AmyA as a whole-cell biocatalyst using a Box-Behnken response surface experimental design. The mathematical model proposes as optimal conditions for biohydrogen production and yield: 18 g/L_{starch}, pH of 8.1 and temperature of 36.8° C where a production of 2,331.4 mL/L and a yield of 132.4 mLH₂/g_{starch} are predicted. These conditions are remarkably close to the central points of the experimental design. The model proposes as optimal conditions for bioethanol production and yield: 25g/L_{starch}, pH of 7.9 and temperature of 34.5° C. Under these conditions 7.1g/L of bioethanol production are obtained, and a yield of 0.28g/g_{starch}. These predictions are consistent with the experimental results.

Key words: biohydrogen; *E. coli*; starch; simultaneous saccharification and fermentation; Box-Behnken

Introducción

Efectos negativos de la producción de hidrógeno a partir de combustibles fósiles.

De acuerdo con los datos de la Agencia Internacional de Energía, el carbón, el gas natural y el petróleo representaban en 2017, el 81.3% del suministro primario en el consumo global de fuentes de energía. En México, los datos proporcionados por la SEMARNAT indican que, en el 2008, el 79% de los contaminantes en el aire (CO, PM_{2.5}, PM₁₀, COV) provenían de fuentes antropogénicas y de estas fuentes, los vehículos generaban el 58% de los gases contaminantes. Esta contaminación, por supuesto, ha ido aumentando a través de los años (Kleidon 2018). El uso de combustibles fósiles (como las gasolinas y todos los derivados del petróleo) es uno de los principales problemas relativos a la contaminación y al deterioro del ambiente debido principalmente a la reducción de las reservas de fuentes fósiles de carbono, un problema que se produce por la extracción indiscriminada y el consumo desmedido del petróleo (Agarwal, 2007).

El hidrógeno, es uno de los gases más estudiados, actualmente el 96% es producido a partir de combustibles fósiles y los procesos de su producción irremediablemente impactan en el aumento del calentamiento global. Al usar el hidrógeno como fuente de energía se asegura una reducción de la emisión de gases contaminantes debido a que su único subproducto de combustión es el H₂O. El biohidrógeno (bioH₂) es llamado así porque el hidrógeno producido proviene de mecanismos biológicos; es decir, de las vías metabólicas de microorganismos especializados en su producción. Esta producción de bioH₂ se puede acoplar en algunos casos a la producción de bioetanol (que es una industria ya establecida) y ambas pueden ser fácil de implementar en países con una economía agronómica. Tal es el caso de Estados Unidos, Brasil, México y muchos países en desarrollo, que potencialmente pueden implementar biorefinerías de producción de bioetanol con la tecnología actual con la que cuentan estos países (Mielenz 2001) y tener

como subproducto al hidrógeno, puesto que tanto el bioetanol como el biohidrógeno se producen mediante la misma vía metabólica de fermentación de algunos microorganismos como *Escherichia coli*. La producción de biohidrógeno tiene características favorables para la sustentabilidad como su fácil implementación al acoplarla con los mercados agroindustriales existentes. Otras características favorables incluyen el hecho de que su único subproducto de reacción es H₂O, su producción es carbono-neutra, se puede producir utilizando una gran cantidad de biomasa vegetal de residuos agroindustriales como materia prima a partir de residuos como el suero de leche (Davila-Vazquez *et al.*, 2009), la paja de trigo (López-Hidalgo *et al.*, 2017), la paja de caña de azúcar (Arifin *et al.*, 2014) y el aceite de soya (Fabbri *et al.*, 2007), entre otros.

Las materias primas que se utilizan para la producción de biocombustibles por fermentación requieren una pre-preparación (o pretratamiento) para facilitar el acceso a los componentes lignocelulósicos (CLs) y/o enlaces de los polisacáridos que las conforman, ya que son la fuente de carbono real a ser procesada para la producción de biocombustibles. En general, los polisacáridos deben degradarse en sus componentes monoméricos (que con mayor frecuencia son glucosa y fructosa) para que la fermentación alcohólica pueda ocurrir. La despolimerización de celulosa a glucosa se logra mediante una degradación termoquímica (pretratamiento) y posteriormente una biológica (hidrólisis enzimática) para obtener la mayor cantidad de azúcares reductores. La necesidad de acoplar métodos termoquímicos y biológicos para hacer disponibles estos azúcares se debe a que la hidrólisis de CLs, por medio de métodos termoquímicos, es sólo parcial y al agregar un paso posterior de degradación enzimática se aseguran rendimientos más altos de obtención de azúcares reductores (Amezcuza-Allieri *et al.*, 2017).

El almidón es un polisacárido que se encuentra en abundancia en muchos alimentos básicos como en tubérculos, el arroz y el trigo. En la industria alimentaria que procesa papa y maíz, frecuentemente se encuentran residuos de almidón en sus aguas de desecho. Por lo que utilizar dichas aguas en fermentaciones con una

cepa de *E. coli* capaz de degradar el almidón en sus monómeros de glucosa y producir biocombustibles, tiene el potencial de reutilizar desechos, generar un producto con valor comercial y potencialmente, contribuir en la reducción de gases de efecto invernadero (GEI) debido a que la fermentación oscura es un proceso carbono-neutro. Para degradar el almidón, en sus componentes monoméricos de glucosa, es necesaria la acción de enzimas amilasas. De éstas, la α -amilasa es capaz de degradar los enlaces α -1-4 glucosídicos que conforman la cadena, liberando monómeros de glucosa.

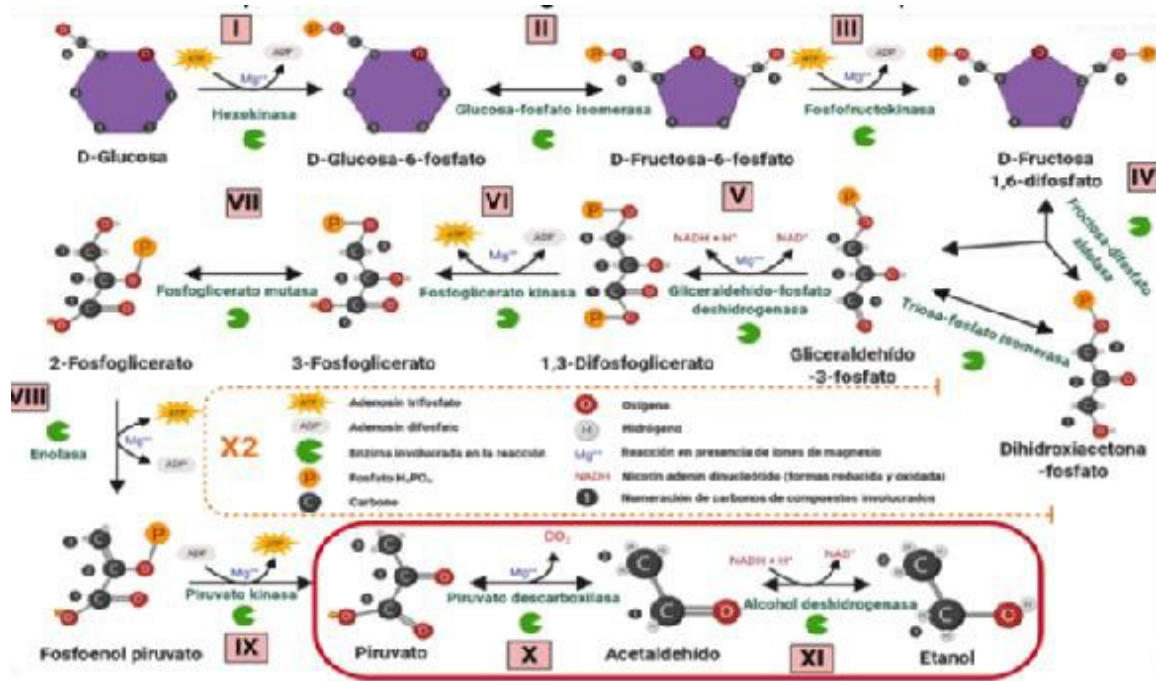


Figura 1. Vía general de fermentación.

Los últimos dos pasos de la vía (X y XI, recuadro rojo) comprenden la fermentación alcohólica. Para cada paso, la clasificación KEGG de las enzimas implicadas son: I. (EC 2.7.1.1), II. (EC 5.3.1.9), III. (EC 2.7.1.11), IV. (EC 4.1.2.13), V. (EC 5.3.1.1), VI. (EC 1.2.1.12), VII. (EC 2.7.2.3), VIII. (EC 5.4.2.1), IX. (EC 4.2.1.11), X. (EC 2.7.1.40), XI. (EC 4.1.1.1) (EC 1.1.1.1).

La fermentación oscura para producir biohidrógeno a partir de polisacáridos consiste en convertir la glucosa presente en los polímeros pretratados en sus subproductos, con CO₂ como subproducto, siguiendo la reacción:



Bioquímicamente, la fermentación oscura es un proceso bien conocido (Romano y Conway, 1996), para el cual el mecanismo general está conservado en la mayoría de las bacterias y en los eucariotas inferiores (**Figura 1**). Los últimos dos pasos de la vía de glucólisis (X y XI) comprenden la fermentación alcohólica para producir bioetanol y los anteriores son parte de las vías glucolíticas Entner-Doudoroff (VED) y vía Embden-Meyerhof (VEM). Para la producción de bioH₂ por fermentación, a partir del fosfoenol piruvato se produce piruvato (pasos IX-X) con la ayuda de la enzima piruvato cinasa, que desfosforila el oxígeno del C₂ del fosfoenol piruvato.

El piruvato río abajo de la vía metabólica (**Figura 1**) puede convertirse en lactato, acetaldehído o formato y acetil-CoA. El bioH₂ proviene del formato a través del complejo formato hidrogenilasa (fhl) (**Figura 2**). En bacterias y en levaduras, la glucosa se metaboliza principalmente por la VEM, la ruta de las pentosas fosfato (RPF) y la VED como vía secundaria. La RPF consiste en ocho reacciones para obtener energía en forma de NADPH, pero no está directamente relacionada con la producción de biohidrógeno. Las rutas VED y VEM difieren en los sustratos de 6 carbonos utilizados para el rompimiento del aldol: VED utiliza 6-fosgluconato dehidratasa (4.2.1.12), una enzima única para esta vía que deshidrata el 6-fosfogluconato a 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato (CDFG) y también utiliza una segunda enzima: la CDFG aldolasa (4.1.2.14), que como afirma su nombre, cataliza un rompimiento del aldol de CDFG para formar piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, que luego es metabolizado río abajo de la vía de fermentación alcohólica (Peekhaus y Conway, 1998; Romano y Conway, 1996).

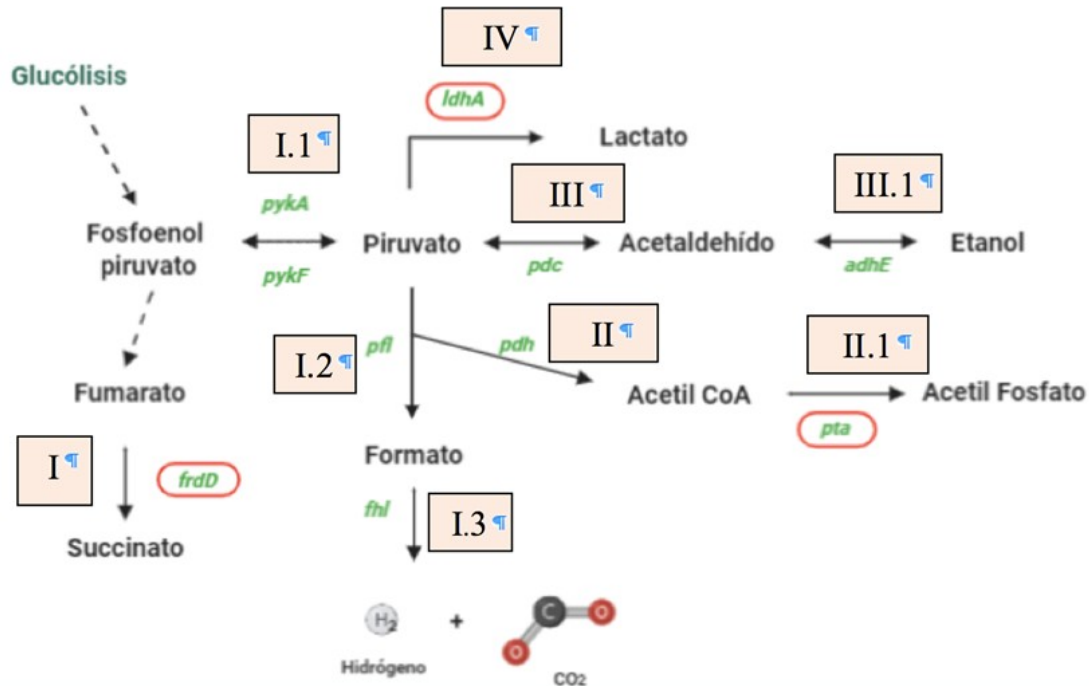


Figura 2. Ruta metabólica para producción de hidrógeno a partir de piruvato.

El formato se oxida (deshidrogenación) para formar H₂ y CO₂ con la ayuda del complejo formato hidrogeniasa (*fhf*). Para cada paso, la clasificación KEGG de las enzimas implicadas son: I: EC1.3.5.4, I.1: EC2.7.1.40, I.2: EC2.3.1.54, I.3: EC1.17.1.9 II: EC1.2.4.1, II.1: EC2.3.1.8, III: EC4.1.1.1, III.1: EC1.1.1.1, IV: EC1.1.1.27. Figura adaptada de (Gutiérrez-García et al., 2020).

La Sacarificación y la Fermentación Simultáneas (SFS) es un enfoque generalizado para la reducción de costos y la disminución de la inhibición por producto (glucosa), ya que su acumulación reduce la eficiencia de la sacarificación enzimática (Jeng *et al.*, 2011). Hay que recordar que la mayoría de los procesos de fermentación se pueden combinar con cocteles enzimáticos para convertir las fermentaciones simples en SFS, mismas que ofrecen alta productividad y rendimiento de etanol en un corto tiempo de procesamiento, bajo riesgo de contaminación, además de que la inhibición de las enzimas hidrolíticas se reduce ya que los productos finales de la hidrólisis se consumen continuamente por la fermentación (Liu and Chen, 2016). Para la SFS se han estudiado diversos microorganismos (ya sea de tipo silvestre o genéticamente diseñados), y el objetivo de las investigaciones ha sido lograr altos rendimientos y eficiencia en la producción de etanol. Debido a esto, los microorganismos productores de etanol deben poseer

las siguientes características principales: capacidad de fermentación rápida, osmotolerancia (fermentar establemente en altas concentraciones de carbohidratos), estabilidad genética, viabilidad celular alta y en algunos casos, tolerancia a la temperatura (Stewart *et al.*, 1983).

***E. coli* como biocatalizador de célula completa capaz de consumir almidón.**

La mayoría de los microorganismos utilizados para producción de bioH₂ son bacterias y hay pocos microorganismos como *E. coli* que pueden metabolizar casi todas las hexosas y las pentosas disponibles al mismo tiempo. Sin embargo, *E. coli* es incapaz de degradar polisacáridos complejos como el almidón (polímero de glucosas unidas covalentemente mediante enlaces α -(1→4) y α -(1→6)) (Alvarado-Cuevas *et al.*, 2015; Salas-Montantes, 2017; Chen y Wang 2017. A pesar de esto, *E. coli* es el microorganismo mejor estudiado en lo que se refiere a la regulación y expresión génica, tiene la mayor cantidad de herramientas de ingeniería genética disponibles y a través de la ingeniería metabólica se ha logrado redirigir el flujo de carbono en el metabolismo central de carbono para incrementar la producción de metabolitos deseados. Esta bacteria puede metabolizar casi todos los carbohidratos simples que constituyen la biomasa vegetal, puede crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y por lo tanto se ha utilizado para producir una amplia gama de productos industriales como proteínas, hormonas, biocombustibles (Theisen y Liao, 2016).

Un biocatalizador de célula completa (BCC) es un microorganismo vivo utilizado para acelerar las reacciones bioquímicas para producir metabolitos deseados. A dicho microorganismo se le integran una o varias enzimas para construir rutas metabólicas sintéticas para la conversión de las materias primas escogidas y generar los productos deseados. Los BCC tienen varias ventajas sobre el uso de enzimas purificadas para usos como la SFS. Por ejemplo, previenen cambios conformacionales de las enzimas, tienen condiciones de operación más sencillas, las enzimas son más resistentes a cambios de condiciones del

microambiente (temperatura, pH), en general tienen una eficiencia de catálisis más alta y las enzimas se pueden regenerar para reabastecer su actividad (Lin y Tao, 2017).

El sistema de autotransporte (*autodisplay*) es un mecanismo conocido que involucra proteínas capaces de trasladar una proteína pasajera o de interés a través de la membrana externa de una bacteria Gram negativa por la acción combinada de un cilindro β -barril C-terminal y una región previa de enlace llamada conector (*linker*). El β -barril, el *linker* y la proteína pasajera se denominan unidad de translocación. En *E. coli*, el sistema AIDA (*adhesin involved in diffuse adherence* por sus siglas en inglés) posee modularidad y simplicidad, y está basado en la ruta metabólica de autotransporte de secreción. El sistema AIDA consta de un péptido señal, una proteína pasajera, un conector o *linker* y un β -barril (Maurer *et al.*, 1999). El mecanismo de este sistema implica que la proteína se traduce cerca de la membrana interna de la bacteria. El péptido señal se encuentra en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica, este péptido se ancla a la membrana interna de la bacteria y la traducción continúa hacia el espacio intermembranal. Al desprenderse el péptido del ribosoma, en el extremo C-terminal se encuentra el β -barril, que se ancla en la cara interna de la membrana externa, donde obtiene su estructura terciaria de barril, de tal manera que, al terminar la conformación estructural, la proteína pasajero queda en la cara exterior de la membrana externa, unida al conector o *linker*, que a su vez está unido covalentemente al β -barril, que queda embebido en la membrana externa de la bacteria (**Figura 3**).

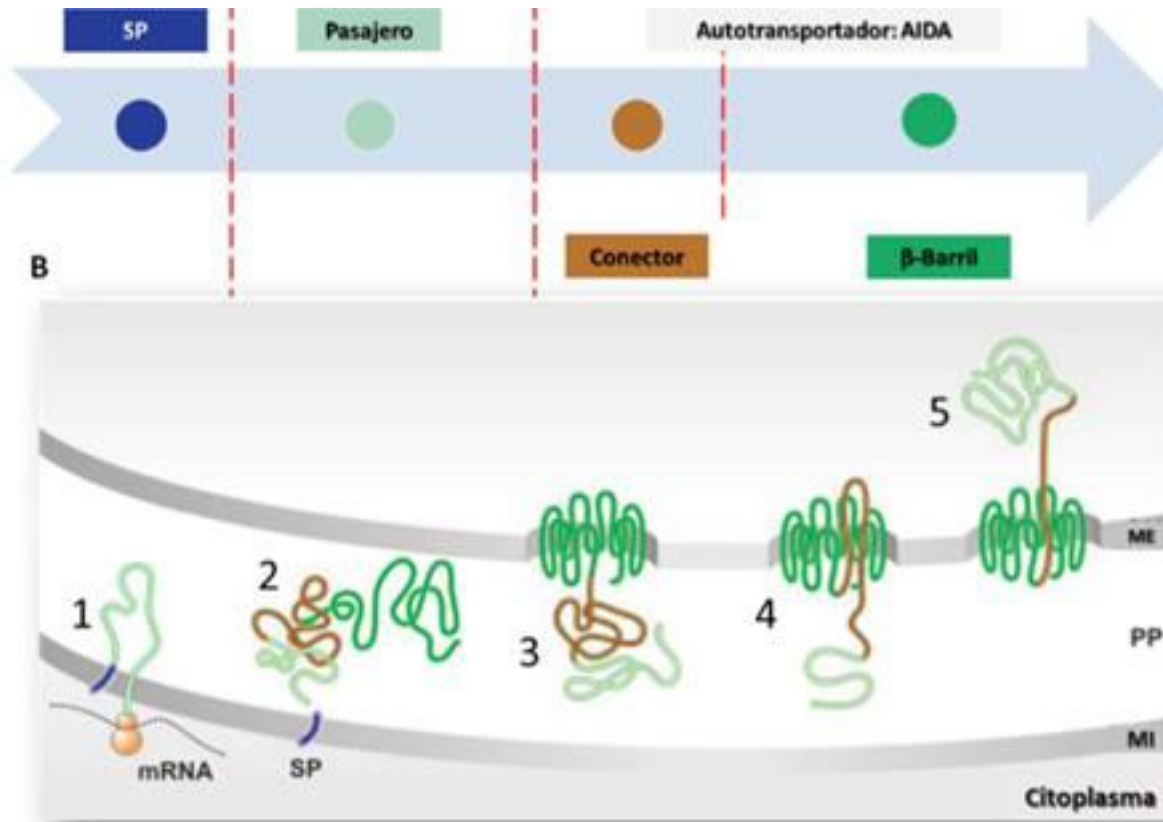


Figura 3. Autotransportador AIDA

A. El sistema AIDA consta de un péptido señal, una proteína pasajera, un *linker* y un β -barril. B. Mecanismo de autotransporte del sistema AIDA. (Tomada de Salas-Montantes, 2005).

Balderas-Hernández *et al.*, (2019) modificaron el metabolismo central de carbono de la cepa parental W3110 de *E. coli* por transducción con el bacteriófago P1, eliminando genes clave para la redirección de las rutas metabólicas hacia la producción de bioetanol y bioH₂, obteniendo varias cepas etanológicas e hidrogenogénicas. La eliminación del gen *hycA* (regulador negativo de la formato hidrogenoliasa) hace que la producción del complejo *fhl* incremente. Eliminar el gen *frdD* (que codifica para la subunidad D del complejo fumarato reductasa), reduce la conversión de fumarato a succinato. Cuando el gen *pta* (que codifica para la piruvato transacetilasa) es eliminado, se elimina la posibilidad de convertir Acetil-CoA en Acetil-fosfato (**Figura 4**). De las cepas generadas por Balderas-Hernández *et al.*, (2019), la cepa WDHFP obtuvo los mejores rendimientos para bioetanol y bioH₂ (**Tabla 1**).

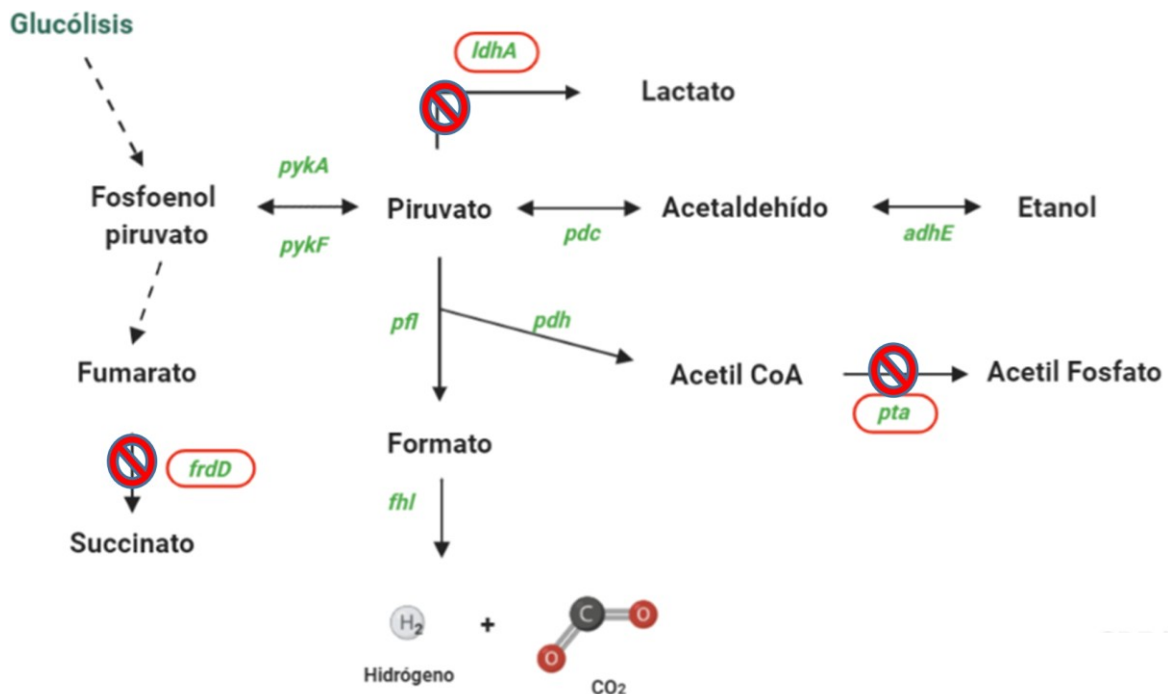


Figura 4. Redirección del flujo de carbono en la cepa WDHFP.

Los genes eliminados en la cepa WDHFP son la subunidad D de la fumarato reductasa (*frdD*), la lactato deshidrogenasa A (*ldhA*), y la piruvato transacetilasa (*pta*). Figura adaptada de (Gutiérrez-García et al., 2020).

Gutiérrez-García (et al., 2020) construyeron el plásmido pAIDA_AmyA (Figura 5), que contiene el gen de la α -amilasa de *Bacillus megaterium* y es capaz de degradar los enlaces α (1-4) que unen a los monómeros de glucosa del almidón. El plásmido pAIDA_AmyA incluye también la secuencia que codifica para la adhesina involucrada en adherencia difusa (AIDA) de *E. coli*. El plásmido pAIDA_AmyA habilita a *E. coli* como un biocatalizador de célula completa que puede degradar el almidón, consumir la glucosa libre y producir diversos metabolitos. La cepa de *E. coli* empleada para evaluar la funcionalidad del plásmido pAIDA_AmyA fue WDHFP, cuyas modificaciones genéticas favorecen el flujo de carbono hacia la

producción de hidrógeno y etanol, y al mismo tiempo limitan la producción de ácido succínico y ácido acético. En este mismo estudio, concluyeron que las condiciones óptimas de la enzima α -amilasa en el sistema AIDA para degradar almidón fueron 55°C y pH de 4.5.

Tabla 1. Mutantes de *E. coli* generadas y sus rendimientos en la producción de etanol e hidrógeno.*

Cepa	Fondo genético	Rendimiento EtOH (gEtOH/gglc)	Rendimiento bioH ₂ (mLH ₂ /gglc)
W3110	(lac ⁺ , gal ⁺ , F ⁻ , λ ⁻ , IN (rrnD-rrnE)1, rph-1)	0.082	57.75
WDH	W3110 $\Delta hycA$	0.28	150.89
WDHGFA	WDH $\Delta crr \Delta pstG$ $\Delta frdD \Delta ldhA$	0.31	142.84
WDHFP	WDH $\Delta frdD \Delta pta$	0.44	108.41
WDHFK	WDH $\Delta frdD \Delta aceK$	0.42	104.78
WDHFAP	WDHFP $\Delta ldhA$	0.36	94.94

EtOH: etanol. bioH₂: biohidrógeno. gglc: gramos de glucosa.

*Tomada de Balderas-Hernández *et al.* (2019).

El propósito de este trabajo fue encontrar las condiciones óptimas de fermentación como son la concentración de sustrato, pH y temperatura para la biotransformación del almidón a biohidrógeno y bioetanol por el biocatalizador de célula completa de *E. coli* WDHFP/pAIDA_AmyA durante el proceso de sacarificación y fermentación simultánea. Para esto, se utilizó un diseño experimental tipo Box-Benken donde las variables de respuesta fueron la producción de biohidrógeno, el rendimiento de biohidrógeno, el rendimiento de bioetanol y la producción de bioetanol.

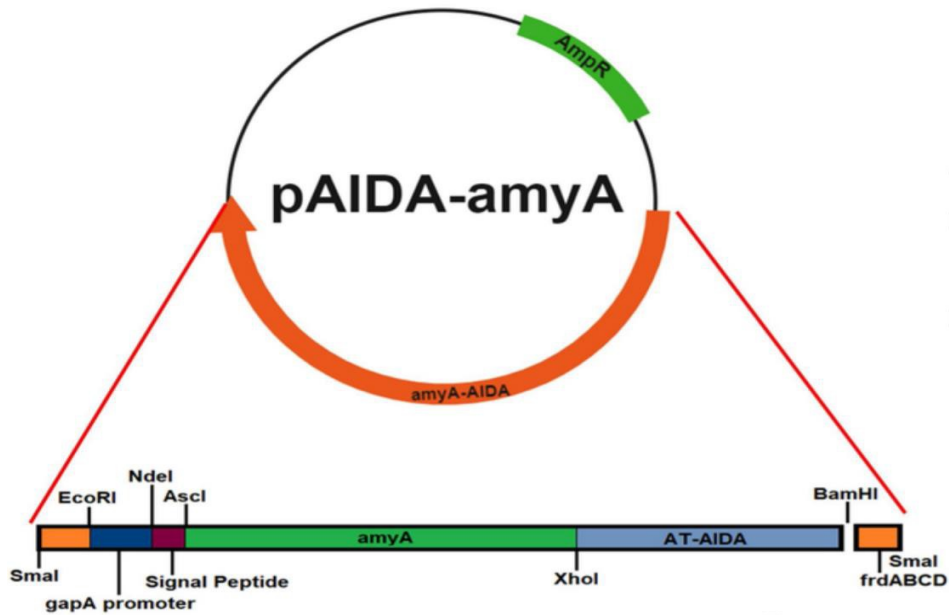


Figura 5. Estructura del plásmido pAIDA_AmyA.

Estructura del plásmido pAIDA-amyA empleado para la expresión de la α -amilasa utilizando el sistema AIDA de *E. coli*. La secuencia del plásmido consiste en dos secuencias frdABCD para integración al genoma, un promotor constitutivo que se produce en condiciones aerobias y anaerobias (gapA), un péptido señal (CtxB) derivado de *Vibrio cholerae*, seguido de la proteína pasajero amyA, un gen que codifica la α -amilasa de *B. megaterium* y el β -barril (AT-AIDA). Figura tomada de Gutiérrez García *et al.* (2019).

Objetivo General

Evaluar la producción y el rendimiento de biohidrógeno y bioetanol por una cepa de *E. coli* genéticamente modificada, utilizando almidón como sustrato.

Objetivos específicos

1.- Determinar las condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de almidón para maximizar la producción y rendimiento de biohidrógeno y bioetanol.

2.- Determinar qué otros metabolitos se generan en esas condiciones óptimas.

Materiales y métodos

Diseño experimental Box-Behnken

El análisis estadístico y el diseño experimental fueron llevados a cabo utilizando el software comercial "Design Expert V. 7.0.0". Dentro del mismo programa se hizo el análisis de varianza (ANOVA).

Fermentación oscura con el biocatalizador

Las fermentaciones con *E. coli* WDHFP/pAIDA_AmyA se iniciaron con un pre-inóculo en medio LB (10 g/L peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de cloruro de sodio) suplementado con 200 µg/mL de ampicilina, en condiciones aerobias a 31°C por 16 h. Las células se centrifugaron a 6,000 rpm por 10 min, se lavaron con medio B (12.5 mg/mL Na₂MoO₄·2H₂O, 15 mg/mL MnSO₄·7H₂O, 3 mg/mL CoCl₂·8H₂O, 75 mg/mL ZnCl₂, 4500 mg/mL NH₄H₂PO₄, 11,867 mg/mL Na₂HPO₄, 125 mg/mL K₂HPO₄, 100 mg/mL MgCl₂·6H₂O, 25 mg/mL FeSO₄·6H₂O y 5 mg/mL CuSO₄·5H₂O) y fueron inoculadas en botellas serológicas de 120 mL que contenían: 110 mL de medio B, 0.5 g/L de CaCl₂, 1 mL/L de elementos traza, 1 g/L de extracto de levadura como fuente de nitrógeno, 1 g/L de glucosa. Las condiciones iniciales de concentración, temperatura y pH corresponden a las del diseño experimental tipo Box-Behnken con los valores de pH: 7, 8 y 9; temperatura: 31, 36.5 y 42°C; concentración inicial de almidón soluble: 10, 17.5 y 25 g/L (Gutiérrez-García *et al.*, 2020).

Métodos analíticos

La cantidad de gas producido se midió por el método de desplazamiento de agua ácida (pH <2 con H₂SO₄) en una bureta invertida conectada a las botellas serológicas con una manguera de goma y una aguja. El porcentaje de hidrógeno en el biogás se determinó por cromatografía de gases utilizando un detector de conductividad térmica (Agilent Technologies Wilmington, DE, EE. UU.) como lo describieron Lopez-Hidalgo *et al.*, (2017). Se tomaron muestras de 1 mL en diferentes momentos durante la fermentación. Luego, las células se separaron por

centrifugación (5 minutos) a 10,000 rpm. Los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de 0.22 μm (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE. UU). Las concentraciones de ácido succínico, ácido láctico, ácido acético y etanol se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, Infinity LC 1220, Agilent Technologies, Santa Clara CA, EE. UU.), utilizando un detector de índice de refracción, una columna Phenomenex Rezex ROA (Phenomenex Torrance, CA, EE. UU.) a 60°C, y 0.0025 M H_2SO_4 como fase móvil a 0.5 mL/min. Una OD de 1 a 600 nm fue equivalente a 0.37 g en peso de células secas/mL. La concentración de azúcares totales se midió usando el método del ácido fenol-sulfúrico, descrito por Masuko *et al.* (2005).

Resultados y Discusión

El diseño experimental tipo Box-Behnken es un diseño central compuesto con menos puntos de diseño que los diseños centrales compuestos. El diseño Box-Behnken en los parámetros de temperatura 31 a 42°C, pH 7 a 9 y concentración de almidón 10 a 25 g/L, toma en cuenta las aristas del espacio experimental determinado (**Tabla 2**), eliminando los valores extremos del espacio experimental evitamos los puntos axiales del mismo, asegurándonos de que todos los puntos del diseño están dentro de la zona segura de operación y por lo tanto, se logran resultados fiables utilizando menos recursos que con un diseño central compuesto. Los parámetros escogidos fueron con base en valores de temperatura previos del grupo de trabajo usados para el crecimiento de *E. coli*, al igual que el intervalo de pH en el que esta bacteria crece. La concentración de sustrato fue determinada por experimentos de optimización realizados previamente en el laboratorio para fermentaciones de *E. coli* con glucosa. En este trabajo se consiguió determinar las condiciones óptimas de producción de biohidrógeno y bioetanol, así como las condiciones óptimas de rendimiento de biohidrógeno para la cepa de *E. coli* WDHFP/AIDA_AmyA, utilizada por Gutiérrez-García *et al.*, (2020), quienes realizaron experimentos con valores únicos de concentraciones de almidón, pH y temperatura.

Tabla 2. Diseño experimental Box-Behnken para evaluar la producción y el rendimiento de biohidrógeno y de bioetanol de la cepa *E. coli* WDHFP/AIDA_ amyA en fermentaciones a partir de almidón.

Exp.	Almidón (g/L)	T (°C)	pH	Azúcares Totales iniciales (g/L)	Azúcares Totales remanentes (g/L)	Succinato (g/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Producción Etanol (g/L)	Rendimiento Etanol (g/g)	Producción H ₂ (mL/L)	Rendimiento H ₂ (mL/g)	Balance metabolitos (g/L)
1	17.5	31	9	18.3	1.2	3.6	2.2	2.6	4	0.22	1300.8	76.1	13.6
2	17.5	31	7	17.9	1.1	3.4	2.4	3	4.5	0.25	1731.3	103.1	14.4
3	25	36.5	9	26.4	2.2	5.6	2.7	4.6	6.5	0.25	1836.7	75.9	21.6
4	17.5	42	7	18.2	1.6	3.2	2.2	3.4	3.9	0.21	924.8	55.7	14.3
5*	17.5	36.5	8	18	0.9	3.8	2.2	3.2	4.7	0.26	2305.6	134.8	14.8
6*	17.5	36.5	8	18.4	1	3.8	2.1	3.1	4.6	0.25	2290.5	131.6	14.6
7	10	36.5	9	11	0.2	2.2	1.6	1.9	2.6	0.24	1163.5	107.7	8.5
8	17.5	42	9	18.7	1.4	3.6	2.3	3.5	4	0.21	1746.4	100.9	14.8
9	25	36.5	7	25.5	1.9	5.6	2.7	4.4	6.6	0.26	1818.7	77.1	21.2
10	10	42	8	10.6	0.5	1.9	1.6	2.2	2.5	0.24	1178.6	116.7	8.7
11	25	42	8	24.9	1.7	6.3	2.3	4.7	6.9	0.28	2037.2	87.8	21.9
12	10	36.5	7	11.3	0.2	2.3	1.2	1.9	2.9	0.26	1279.7	115.3	8.5
13*	17.5	36.5	8	18.5	1	3.9	2.2	3.1	4.7	0.25	2331.4	133.2	14.9
14	25	31	8	25.9	1.9	6.1	2.7	4.4	7.1	0.27	1702.5	70.9	22.2
15	10	31	8	10.9	0.03	2.2	1.6	1.9	2.7	0.25	954.9	87.8	8.43
C. Exp	17.5	36.5	8	17.9	14	0.8	0.4	0.7	0.9	0.05	344.5	88.3	16.8
C. Cond	17.5	36.5	7	18.3	0.97	3.7	2	2.9	4.5	0.25	1874.3	108.2	14.07

Nota: los puntos centrales del experimento Box-Behnken son los experimentos 5*, 6* y 13*.

Como se puede observar en la tabla 2, el experimento 13 alcanzó la mayor producción de bioH₂, con 2,331.4 mL/L realizado con almidón 17.5 g/L, 36.5°C y pH 8. Mientras que la menor cantidad de bioH₂ mL/L corresponde al experimento 4, con una producción de 924.8 mL/L realizado a 17.5 g/L, 42°C y pH 7. La mayor producción de ácido acético la alcanzó el experimento 11, con 4.7 g/L. Mientras que, la mayor producción de ácido láctico la obtuvieron los experimentos 3, 9 y 14, con 2.7 g/L cada uno. Este último experimento alcanzó también la mayor producción de ácido succínico, con 6.1 g/L. En cuanto a los azúcares totales, el experimento 5 fue el único que presentó la mayor cantidad de sustrato sin metabolizar, con 2.2 g/L. Los controles utilizados fueron un control negativo con condiciones de punto central sin inóculo, un control experimental utilizando como inóculo una cepa de *E. coli* sin el plásmido pAIDA_AmyA (C. Exp) y un control de condiciones típicas para *E. coli*, usando 17.5 g/L almidón, pH de 7 y 36.5°C (**Tabla 2**). En estos últimos dos controles los valores de producción de bioH₂ fueron 344.5 mL/L y 1,874.3 mL/L, respectivamente. Estos valores confirman que sí se obtuvo una mayor producción de bioH₂ utilizando las condiciones de punto central del diseño experimental respecto a las condiciones del control de condiciones.

Para la variable experimental producción de bioH₂ con la cepa WDHFP/pAIDA_AmyA, la ecuación que la predice, en función de las condiciones operacionales es la siguiente:

$$HP = 2309.17 + 352.29A + 24.68B + 36.62C + 27.74AB + 33.55AC + 313.04BC - 371.02A^2 - 469.85B^2 - 413.50C^2$$

Donde HP, es la producción de H₂; A, es la concentración inicial de almidón; B, es la temperatura y C, es el pH. Para la respuesta “producción de hidrógeno” el modelo es significativo, donde el *p*-value (probabilidad>F) es de 0.0082. Los términos significativos para el modelo son el término lineal de la concentración, los tres términos cuadráticos y la interacción T-pH (Tabla 3).

Tabla 3. ANOVA obtenido para la variable producción de biohidrógeno (HP) a diferentes valores de concentración de almidón, temperatura y pH.

Fuente	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F-value	p-value
Modelo	3.11E+06	3.45E+05	11.08	0.0082
A- [Almidón]	9.93E+05	9.93E+05	31.87	0.0024
B- Temperatura	4.87E+03	4.87E+03	0.16	0.7088
C- pH	1.07E+04	1.07E+04	0.34	0.5829
AB	3.08E+03	3.08E+03	0.1	0.7659
AC	4.50E+03	4.50E+03	0.14	0.7194
BC	3.92E+05	3.92E+05	12.58	0.0164
A ²	5.08E+05	5.08E+05	16.31	0.0099
B ²	8.15E+05	8.15E+05	26.16	0.0037
C ²	6.31E+05	6.31E+05	20.26	0.0064
Residual	1.56E+05	3.12E+04		
Falta de ajuste	1.55E+05	5.12E+04	120.91	0.0082
Error puro	8.54E+02	427.1		
Total	3.26E+06			

Los valores significativos que impactan directamente son $p < 0.05$

La Figura 6 muestra las superficies de respuesta basadas en la ecuación obtenida. Según el modelo matemático, las condiciones óptimas en las que se obtiene la máxima producción de biohidrógeno son: 20.45 g/L de almidón, pH de 8 y temperatura de 36.1°C, con una máxima producción teórica de 2,384.33 mL/L de biohidrógeno.

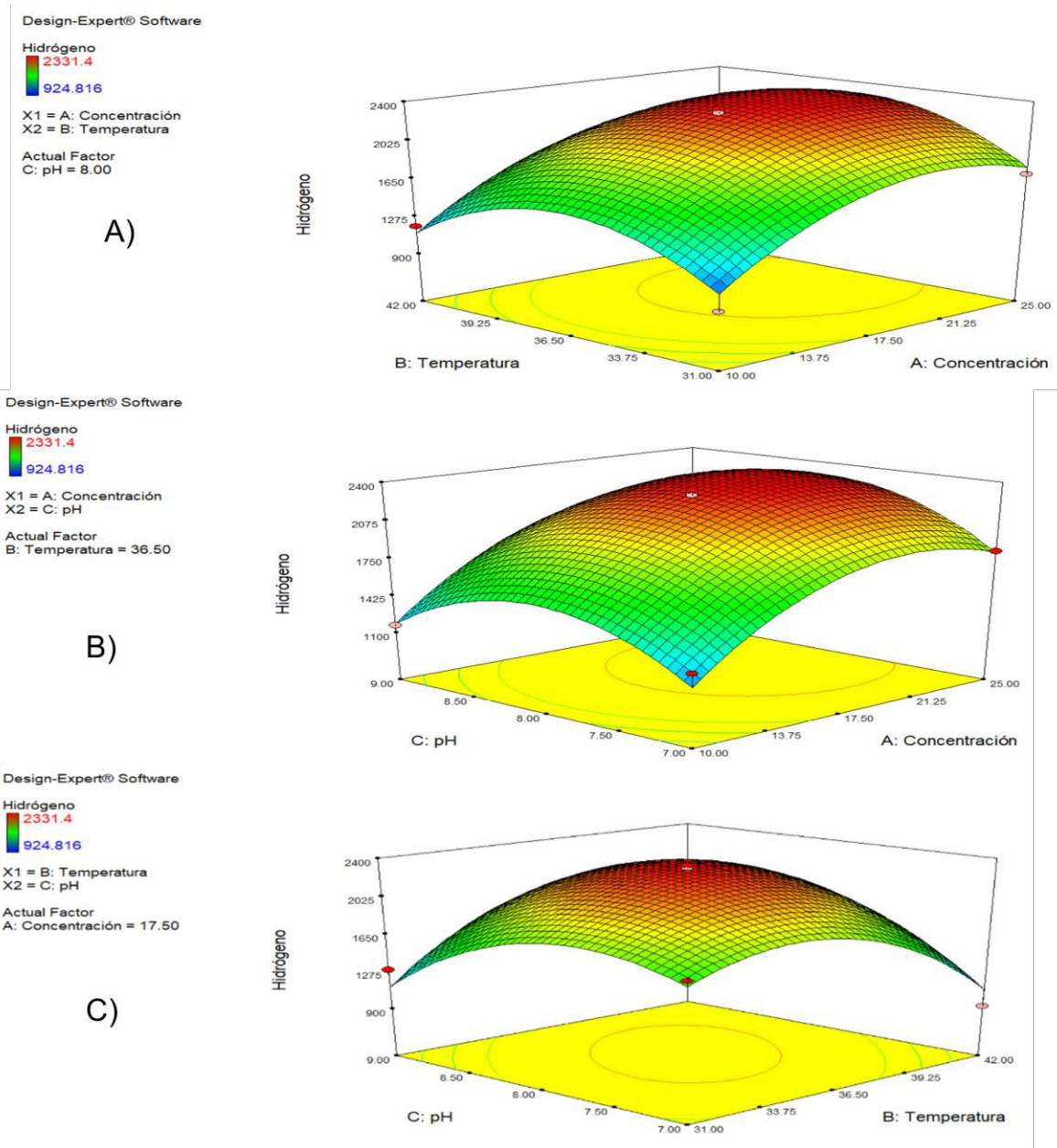


Figura 6. Superficies de respuesta de la producción de biohidrógeno por la cepa de E. coli WDHFP/AIDA_AmyA a partir de almidón y usando un diseño Box-Behnken.

A). Interacción Temperatura-Concentración. B). Interacción pH-Concentración C). Interacción pH-Temperatura.

Para la variable experimental rendimiento de biohidrógeno con la cepa WDHFP/pAIDA_AmyA, el experimento 5 alcanzó el mayor rendimiento, con 134.8 mL/g_{almidón} (Tabla 4).

Tabla 4. ANOVA obtenido para la variable Rendimiento de biohidrógeno (HY) a diferentes valores de concentración de almidón, temperatura y pH.

Fuente	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F-value	p-value
Modelo	7.88E+03	8.76E+02	5.80E+00	0.0336
A- [Almidón]	9.93E+05	1.68E+03	1.11E+01	0.0207
B- Temperatura	4.87E+03	6.73E+01	4.46E-01	0.5338
C- pH	1.07E+04	1.10E+01	7.32E-02	0.7975
AB	3.08E+03	3.60E+01	2.39E-01	0.6459
AC	4.50E+03	1.02E+01	6.79E-02	0.8048
BC	3.92E+05	1.30E+03	8.64E+00	0.0323
A ²	5.08E+05	9.66E+02	6.40E+00	0.0525
B ²	8.15E+05	2.54E+03	1.68E+01	0.0093
C ²	6.31E+05	1.96E+03	1.30E+01	0.0155
Residual	1.56E+05	1.51E+02		
Falta de ajuste	1.55E+05	2.50E+02	9.75E+01	0.0102
Error puro	8.54E+02	2.56		
Total	3.26E+06			

Los valores significativos que impactan directamente son $p < 0.05$

La ecuación que predice la variable rendimiento de biohidrógeno en función de las condiciones operacionales es la siguiente:

$$HY = 133.20 - 14.48A + 2.90B + 1.18C - 3AB + 1.60AC + 18.05BC - 16.7A^2 - 26.22B^2 - 23.03C^2$$

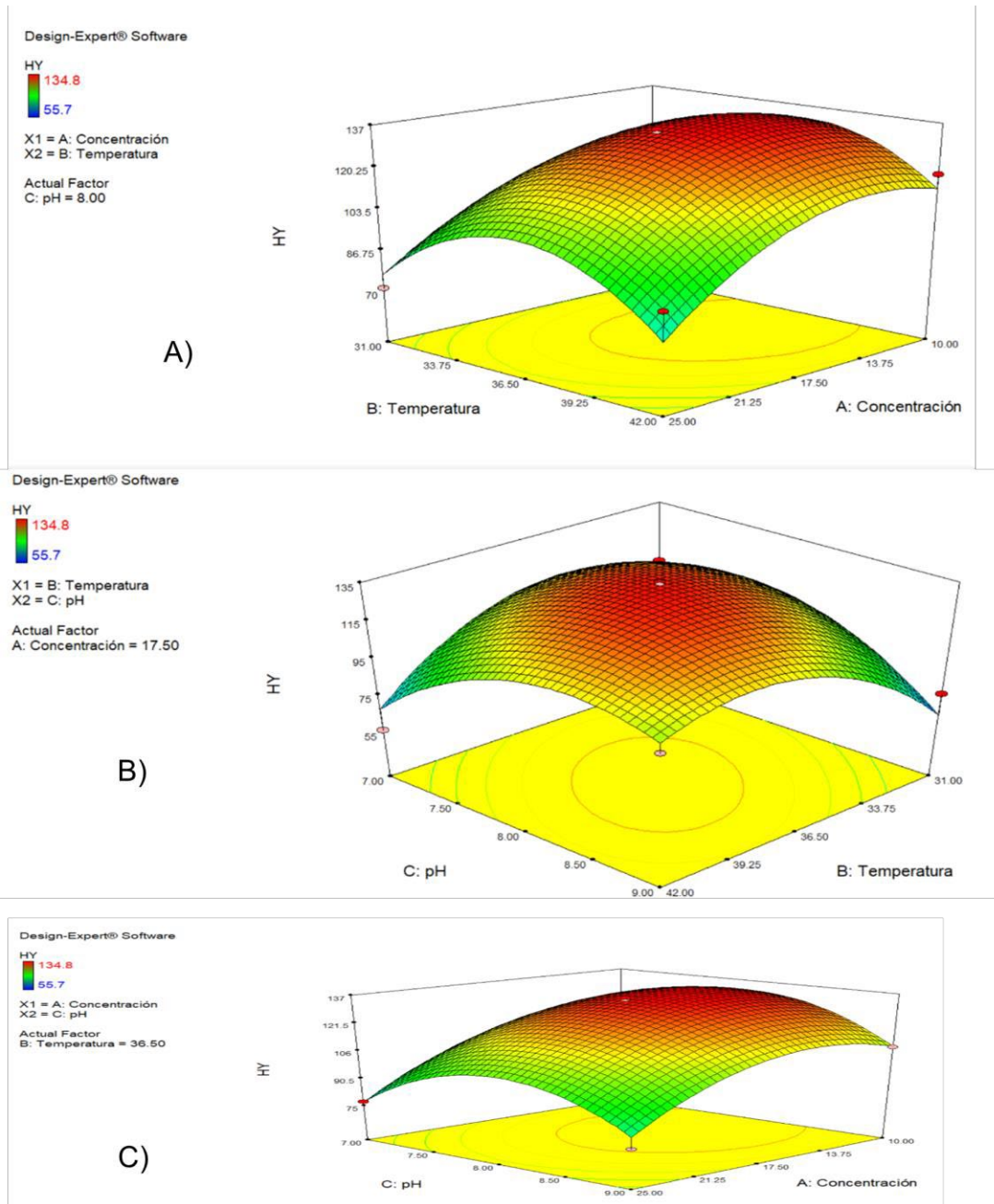


Figura 7. Superficies de respuesta del rendimiento de biohidrógeno por la cepa de *E. coli* WDHFP/AIDA_AmyA a partir de almidón y usando un diseño Box-Behnken.

A). Interacción Temperatura-Concentración. B). Interacción pH-Temperatura C). Interacción pH-Concentración.

Donde HY, es el rendimiento de bioH₂; A, es la concentración inicial de almidón; B, es la temperatura y C, es el pH. Para la respuesta “rendimiento de hidrógeno” el modelo es significativo, donde el *p*-value (probabilidad>F) es de 0.00336. Los términos significativos para el modelo son el término lineal de la concentración, los tres términos cuadráticos y la interacción T-pH (Tabla 4).

La Figura 7 muestra las superficies de respuesta basadas en la ecuación obtenida. Según el modelo matemático, las condiciones óptimas en las que se obtiene el máximo rendimiento de biohidrógeno son: 13.31 g/L de almidón, pH de 8.1 y temperatura de 37.2°C, con un máximo rendimiento teórico de 136.45 mL_{bioH₂}/g_{almidón}.

La mayor producción de etanol la obtuvo el experimento 14, con 7.11 g/L. Para la variable experimental producción de bioetanol (EP) con la cepa WDHFp/pAIDA_AmyA, la ecuación resultante en función de las condiciones operacionales es la siguiente:

$$EP = 4.67 + 2.05A - 0.12B - 0.1C + 0.05AC + 0.15BC + 0.34A^2 - 0.21B^2 - 0.36C^2$$

Donde EP, es la producción de bioetanol; A, es la concentración inicial de almidón; B, es la temperatura y C, es el pH. Para la respuesta “producción de bioetanol” el modelo es significativo, donde el *p*-value (probabilidad>F) es de <0.0001. Los términos significativos para el modelo son el término lineal de la concentración y los tres términos cuadráticos (Tabla 5).

La Figura 8 muestra las superficies de respuesta basadas en la ecuación obtenida. Según el modelo matemático, las condiciones óptimas en las que se obtiene la máxima producción de bioetanol son: 25 g/L de almidón, pH de 7.9 y temperatura de 34.5°C, con un máximo rendimiento teórico de 7.1 g/L.

Tabla 5. ANOVA obtenido para la variable Producción de Etanol (EP) adiferentes valores de concentración de almidón, temperatura y pH.

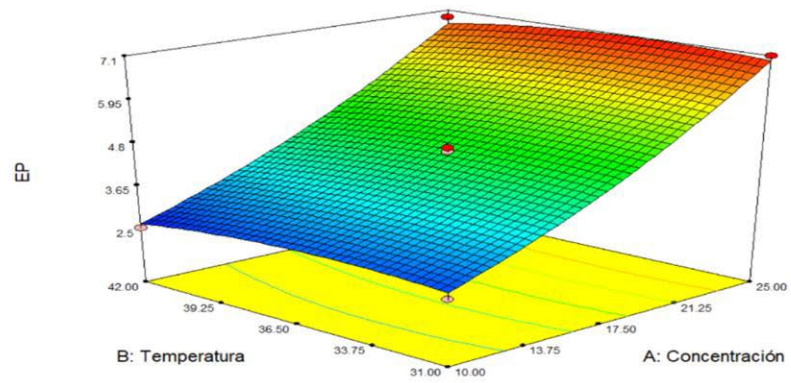
Fuente	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F-value	p-value
Modelo	3.51E+01	3.90E+00	101.64	< 0.0001
A- [Almidón]	3.36E+01	3.36E+01	877.04	< 0.0001
B- Temperatura	1.25E-01	1.25E-01	3.26	0.1308
C- pH	8.00E-02	8.00E-02	2.09	0.2082
AB	0.00E+00	0.00E+00	0.00	1.0000
AC	1.00E-02	1.00E-02	0.26	0.6313
BC	9.00E-02	9.00E-02	2.35	0.1860
A ²	4.31E-01	4.31E-01	11.24	0.0203
B ²	1.60E-01	1.60E-01	4.18	0.0963
C ²	4.74E-01	4.74E-01	12.37	0.0170
Residual	1.92E-01	3.83E-02		
Falta de ajuste	1.85E-01	6.17E-02	18.50	0.0517
Error puro	6.67E-03	3.33E-03		
Total	3.53E+01			

Design-Expert® Software



X1 = A: Concentración
X2 = B: Temperatura

Actual Factor
C: pH = 8.00



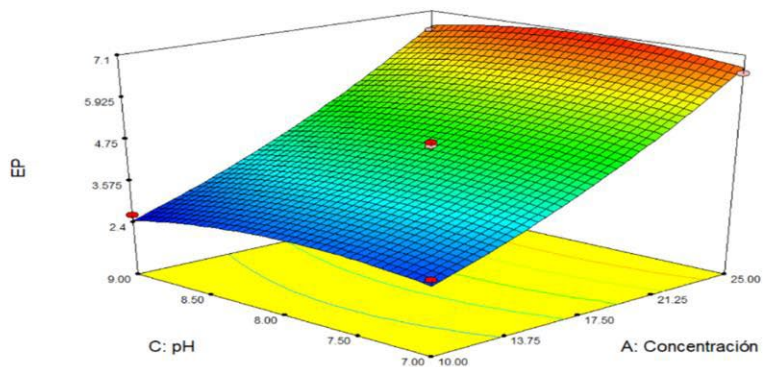
A)

Design-Expert® Software



X1 = A: Concentración
X2 = C: pH

Actual Factor
B: Temperatura = 36.50



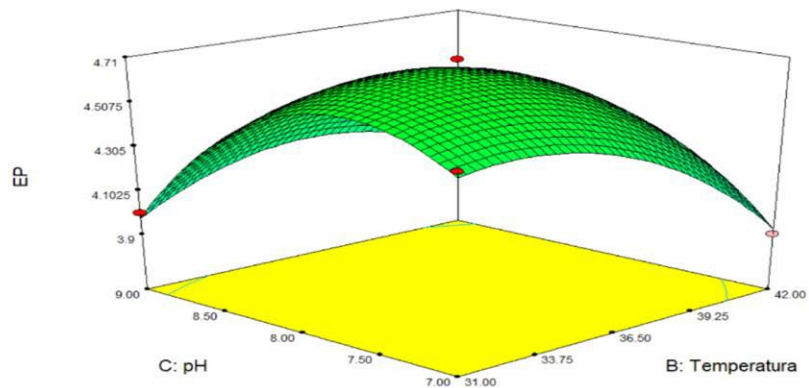
B)

Design-Expert® Software



X1 = B: Temperatura
X2 = C: pH

Actual Factor
A: Concentración = 17.50



C)

Figura 8. Superficies de respuesta de la producción de bioetanol por la cepa de E. coli WDHP/AIDA_AmyA a partir de almidón y usando un diseño Box- Behnken.

A). Interacción Temperatura-Concentración. B). Interacción pH-Concentración C). Interacción pH-Temperatura

Para la variable experimental rendimiento de bioetanol, el experimento 11 alcanzó el mayor rendimiento con 0.28 g_{bioEtOH}/g_{alm} (Tabla 2).

La ecuación que predice la variable rendimiento de bioetanol en función de las condiciones operacionales es la siguiente:

$$EY = 0.25 + 8.750E-003A - 6.25E-003B - 7.5E-003C + 5E-003AB + 2.5E-003AC + 7.5E-003BC + 0.018A^2 - 0.012B^2 - 0.019C^2$$

Donde EY, es el rendimiento de bioH₂; A, es la concentración inicial de almidón; B, es la temperatura y C, es el pH. Para la respuesta “rendimiento de bioetanol” el modelo no es significativo, donde el *p*-value (probabilidad>F) es de 0.0689. Los términos significativos para el modelo son los términos cuadráticos de concentración y pH (Tabla 6).

Tabla 6. ANOVA obtenido para la variable Rendimiento de Etanol (EY) adiferentes valores de concentración de almidón, temperatura y pH.

Fuente	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F-value	<i>p</i> -value
Modelo	5.04E-03	5.60E-04	4.05	0.0689
A- [Almidón]	6.12E-04	6.12E-04	4.43	0.0893
B- Temperatura	3.13E-04	3.13E-04	2.26	0.1932
C- pH	4.50E-04	4.50E-04	3.25	0.1311
AB	1.00E-04	1.00E-04	0.72	0.4340
AC	2.50E-05	2.50E-05	0.18	0.6884
BC	2.25E-04	2.25E-04	1.63	0.2582
A2	1.24E-03	1.24E-03	8.97	0.0303
B2	5.03E-04	5.03E-04	3.63	0.1150
C2	1.36E-03	1.36E-03	9.81	0.0259
Residual	6.92E-04	1.38E-04		
Falta de ajuste	6.25E-04	2.08E-04	6.25	0.1410
Error puro	6.67E-05	3.3333E-05		
Total	5.73E-03			

Los valores significativos que impactan directamente son *p*<0.05

La Figura 9 muestra las superficies de respuesta basadas en la ecuación obtenida. Según el modelo matemático, las condiciones óptimas en las que se obtiene el máximo rendimiento de bioetanol son: 25 g/L de almidón, pH de 7.9 y temperatura de 35.9°C, con un máximo rendimiento teórico de 0.28 g_{bioetOH}/g_{alm.}

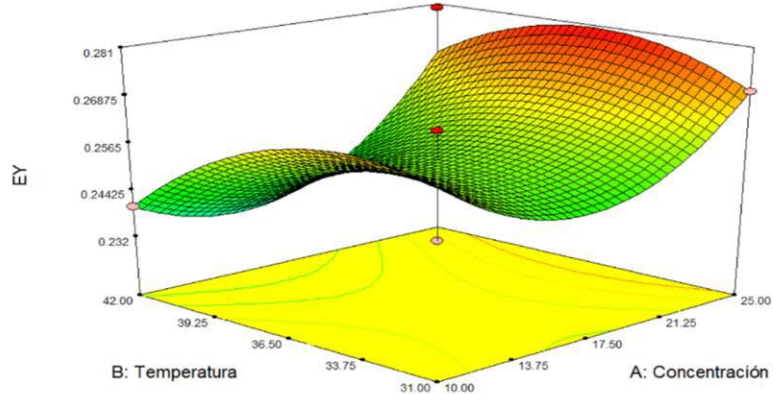
Los términos significativos para ambos modelos de producción son el término lineal de la concentración, los tres términos cuadráticos (temperatura, pH y concentración inicial de almidón) y la interacción T y pH. La metodología de la superficie de respuesta indica que las condiciones óptimas para maximizar tanto la producción de biohidrógeno como el rendimiento son 18 g/L de almidón, pH de 8.1 y temperatura de 36.8°C en donde se obtiene la máxima producción de hidrógeno de 2,331.4 mL/L y el rendimiento es de 132.4 mL/g_{almidón} (Tabla 7). Para el bioetanol las condiciones óptimas para producción (7.1 g/L) y rendimiento (0.28 g/g_{almidón}) fueron 25 g/L de almidón, pH 7.9 y temperatura de 34.5°C. De acuerdo con el ANOVA, el modelo propuesto es significativo para la producción de hidrógeno y etanol y el rendimiento de hidrógeno. La variable que más impacta es la concentración de sustrato, lo que es consistente con otros reportes de la literatura (Adnan *et al.*, 2014; Rosales-Colunga y De León Rodríguez, 2014).

Design-Expert® Software



X1 = A: Concentración
X2 = B: Temperatura

Actual Factor
C: pH = 8.00



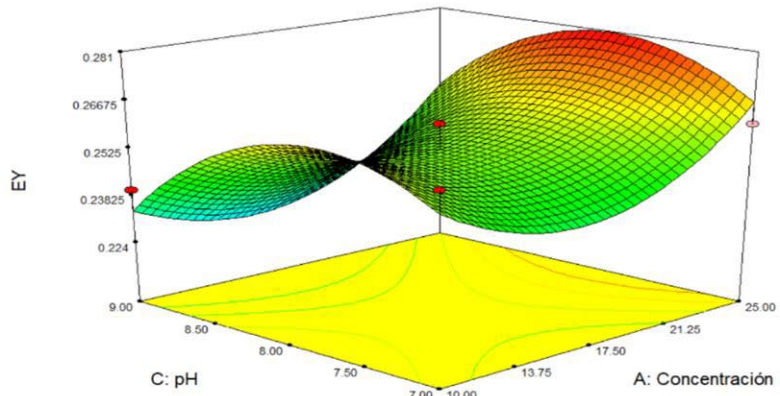
A)

Design-Expert® Software



X1 = A: Concentración
X2 = C: pH

Actual Factor
B: Temperatura = 36.50



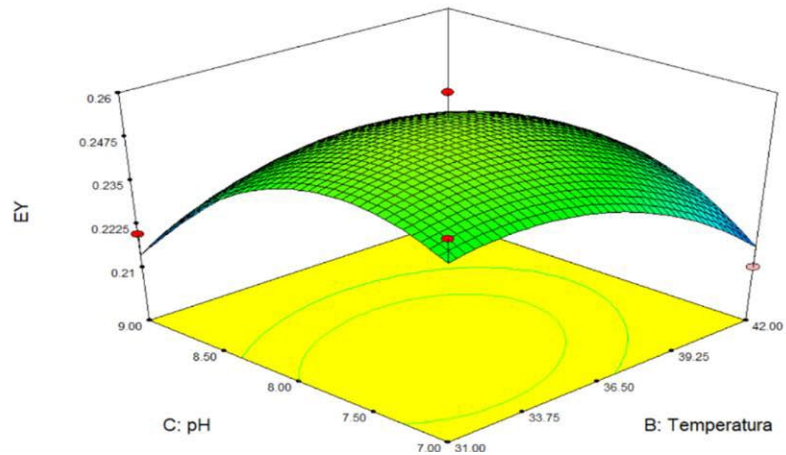
B)

Design-Expert® Software



X1 = B: Temperatura
X2 = C: pH

Actual Factor
A: Concentración = 17.50



C)

Figura 9. Superficies de respuesta del rendimiento de bioetanol por la cepa de E. coli WDHFP/AIDA_AmyA a partir de almidón y usando un diseño Box- Behnken.

A). Interacción Temperatura-Concentración. B). Interacción pH-Concentración C). Interacción pH-Temperatura

Tabla 7. Resumen de las condiciones óptimas para maximizar la producción y el rendimiento de biohidrógeno y bioetanol.

Condición óptima	Conc. de almidón (g/L)	Temperatura (°C)	pH	Valor teórico
Producción de hidrógeno (HP)	20.5	36.1	8	2,384.3 mL/L
Rendimiento de hidrógeno (HY)	13.3	37.2	8.1	136.5 mL/g _{almidón}
HP, HY simultáneo	18.0	36.8	8.1	2,331.4 mL/L, 132.4 mL/g _{almidón}
Producción de etanol (EP)	25.0	34.6	7.9	7.1 g/L
Rendimiento de etanol (EY)	25.0	35.9	7.9	0.28 g/g _{almidón}
EP, EY simultáneo	25.0	34.5	7.9	7.1 g/L, 0.28 g/g _{almidón}

La interacción pH-temperatura juega un papel importante en la obtención de cantidades significativas de producción de biohidrógeno y bioetanol. Gutiérrez García *et al.* (2020), utilizaron la cepa *E. coli* WDHFP/AIDA_AmyA en condiciones de 10 g/L de almidón, pH 7 y 31°C, obteniendo una producción máxima de 1,689.68 mL/L. En esas condiciones la producción de bioetanol fue de 2.8g/L y el rendimiento de 0.28g_{bioetOH}/g_{almidón}. La optimización realizada en ese estudio es consistente con estos resultados, pero además en este trabajo se logró maximizar tanto la producción, como el rendimiento de biohidrógeno.

En cuanto al rendimiento de biohidrógeno, Zhang *et al.* (2003), obtuvieron un rendimiento de 92 mLH₂/g_{almidón}, utilizando almidón de aguas residuales, con condiciones de 4.6 g/L, pH 7 a 55°C, con un consorcio de bacterias del género *Thermoanaerobacterium* y de la familia *Thermoanaerobacteriaceae*. Sin embargo, el uso de bacterias termófilas puede resultar contraproducente al escalar este tipo de biofábricas para producir biohidrógeno, debido a la necesidad de agregar más energía al sistema para que funcione en condiciones óptimas.

Para cada uno de los modelos significativos (producción de biohidrógeno, producción de bioetanol y rendimiento de biohidrógeno), es necesario realizar

experimentos de validación con las condiciones óptimas mencionadas, como continuación de este trabajo de investigación.

Durante la fase experimental, se obtuvieron como metabolitos secundarios el succinato, el lactato y el acetato (Tabla 8). De los anteriores, el acetato y el lactato son metabolitos no deseados, debido a que sus vías de síntesis principales forman parte de las rutas metabólicas del bioetanol y el biohidrógeno. De acuerdo con los datos de la Tabla 8, hubo una reducción significativa de las concentraciones de lactato y acetato utilizando la cepa WDHFP/AIDA_AmyA respecto a cepas de *E. coli* que no han sido diseñadas genéticamente en su ciclo de carbono (Balderas-Hernandez et al., 2019).

La Tabla 9 muestra un resumen comparativo de algunos procesos de producción de H₂ y/o etanol a partir de diversos sustratos residuales y con diversos microorganismos. Se observa que los valores de temperatura están en el rango de 31 a 60°C, mientras que el pH va del rango de 6 a 8.2.

Tabla 8. Otros metabolitos producidos en la fermentación con la cepa WDHFP/AIDA_AmyA.

Metabolito	Mín. Concentración	Condiciones (Conc., pH, T)	Máx. Concentración	Condiciones (Conc., pH, T)
Succinato	1.9g/L	10g/L, 8, 42°C	6.3g/L	25g/L, 8, 42°C
Lactato	1.2g/L	10g/L, 7, 36.5°C	2.7g/L	25g/L, 8, 31°C
Acetato	1.9g/L	10g/L, 7, 36.5°C	4.7g/L	25g/L, 8, 42°C

Tabla 9. Condiciones utilizadas, valores de producción y rendimiento respecto a la literatura.

Microorganismo	Sustrato	Producto	T (°C)	pH	Producción	Rendimiento	Referencia
<i>E. coli</i> WDHFP_AIDA/AmyA	Almidón 18g/L	H ₂	36.8	8.1	2,331.4 mL/L	132.4 mL/g	Este trabajo
	Almidón 25g/L	Etanol	34.5	7.9	7.1 g/L	0.28 g/g	Este trabajo
Microflora mixta de miga de madera podrida	Tallo de maíz 5 g/L	H ₂	60	7	-	115.3 mL/g	(Cao <i>et al.</i> 2012)
<i>E. coli</i> KO11, agregando α-amilasa	Aguas residuales de cervecería 9.52 g/l, maltotetraosa, 8.55 g/l maltosa	Etanol	30	6	13.66 g/L	-	(Rao <i>et al.</i> 2007)
<i>E. coli</i> SS1	Glucosa 10 g/L	Etanol	37	7.5	-	0.57 mol/mol	(Soo <i>et al.</i> 2017)
<i>Enterobacter aerogenes</i> KKU-S1	Glicerol residual de producción de biodiésel 37g/L	H ₂	37	8.14	14 mmol H ₂ /L	-	(Reungsang <i>et al.</i> , 2013)
<i>Klebsiella sp.</i> TR17	Glicerol 11.14 g/L	Etanol	40	8	-	0.58 mol/mol	(Chookaew <i>et al.</i> , 2014)
<i>E. coli</i> WDHL	Hidrolizado de paja de trigo, 23.4gTRS**/L	H ₂	31	8.2	509 ml/L	197.7mL/g	(Lopez-Hidalgo, Sánchez, and De León-Rodríguez 2017)
		Etanol	31	8.2	8.9 g/L	0.39 g/g	

*En cada celda se muestran los valores de condiciones para hidrógeno y etanol, respectivamente.

** Azúcares reductores totales (Total Reducing Sugars).

Conclusiones

La cepa de *E. coli* WDHFP/pAIDA_amyA es capaz de producir biohidrógeno y bioetanol a partir de almidón. Las condiciones óptimas predichas por el modelo Box-Benhken para maximizar la producción de biohidrógeno son 18 g/L de almidón, pH de 8.1 y temperatura de 36.8°C en donde se obtiene la máxima producción de biohidrógeno de 2,331.4 mL/L con un rendimiento de 132.4 mLH₂/g_{almidón}. Los modelos de producción y rendimiento de biohidrógeno fueron estadísticamente significativos. El bioetanol es el principal producto soluble de la fermentación a partir de almidón como resultado del redireccionamiento del flujo de carbono y se producen 7.1 g/L, con un rendimiento de 0.28 g/g utilizando 25 g/L de almidón, pH de 7.9 y temperatura de 34.5°C. Sin embargo, el modelo no estadísticamente significativo para el rendimiento de bioetanol. Otros metabolitos que se presentan en menor cantidad son el succinato y lactato.

Referencias

- Adnan, Nur Amelia Azreen et al. 2014. "Optimization of Bioethanol Production from Glycerol by Escherichia Coli SS1." *Renewable Energy* 66: 625–33.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.032>.
- Agarwal, Avinash Kumar. 2007. "Biofuels (Alcohols and Biodiesel) Applications as Fuels for Internal Combustion Engines." *Progress in Energy and Combustion Science*.
- Alvarado-Cuevas, Zazil D. et al. 2015. "Biohydrogen Production Using Psychrophilic Bacteria Isolated from Antarctica." *International Journal of Hydrogen Energy* 40(24): 7586–92.
- Amezcuca-Allieri, Myriam A., Teresa Sánchez Durán, and Jorge Aburto. 2017. "Study of Chemical and Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Material to Obtain Fermentable Sugars." *Journal of Chemistry* 2017.
- Arifin, Yalun et al. 2014. "Escherichia Coli W Shows Fast, Highly Oxidative Sucrose Metabolism and Low Acetate Formation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(21): 9033–44.
- Balderas-Hernandez, Victor E. et al. 2019. "Improvement of Hydrogen Production by Metabolic Engineering of Escherichia Coli: Modification on Both the PTS System and Central Carbon Metabolism." *International Journal of Hydrogen Energy* (xxxx): 1–10.
- Cao, Guang Li et al. 2012. "Enhanced Cellulosic Hydrogen Production from Lime-Treated Cornstalk Wastes Using Thermophilic Anaerobic Microflora." *International Journal of Hydrogen Energy* 37(17): 13161–66.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.137>.
- Carlos Joel Salas Montantes. 2017. "AUTODISPLAY DE UNA XILANASA EN CÉLULAS COMPLETAS PARA LA DEGRADACIÓN DE HEMICELULOSA Y OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES." INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.
- Chen, Hongzhang, and Lan Wang. 2017. "Sugar Strategies for Biomass Biochemical Conversion." In *Technologies for Biochemical Conversion of*

- Biomass*, Elsevier, 137–64.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128024171000065>.
- Chookaew, Teera, Sompong O-Thong, and Poonsuk Prasertsan. 2014. “Statistical Optimization of Medium Components Affecting Simultaneous Fermentative Hydrogen and Ethanol Production from Crude Glycerol by Thermotolerant *Klebsiella* Sp. TR17.” *International Journal of Hydrogen Energy* 39(2): 751–60.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.10.141>.
- Davila-Vazquez, Gustavo et al. 2009. “Continuous Biohydrogen Production Using Cheese Whey: Improving the Hydrogen Production Rate.” *International Journal of Hydrogen Energy* 34(10): 4296–4304.
- Fabbri, Daniele, Valerio Bevoni, Marcello Notari, and Franco Rivetti. 2007. “Properties of a Potential Biofuel Obtained from Soybean Oil by Transmethylation with Dimethyl Carbonate.” *Fuel* 86(5–6): 690–97.
- Gutiérrez-García, Ana K., Cecilia Lizeth Alvarez-Guzmán, and Antonio De Leon-Rodriguez. 2019. “Autodisplay of Alpha Amylase from *Bacillus Megaterium* in *E. Coli* for the Bioconversion of Starch into Hydrogen, Ethanol and Succinic Acid.” *Enzyme and Microbial Technology* 47: 109477.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109477>.
- . 2020. “Autodisplay of Alpha Amylase from *Bacillus Megaterium* in *E. Coli* for the Bioconversion of Starch into Hydrogen, Ethanol and Succinic Acid.” *Enzyme and Microbial Technology* 134(November 2019): 109477.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109477>.
- Jeng, Wen Yih et al. 2011. “Structural and Functional Analysis of Three β -Glucosidases from Bacterium *Clostridium Cellulovorans*, Fungus *Trichoderma Reesei* and Termite *Neotermes Koshunensis*.” *Journal of Structural Biology* 173(1): 46–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2010.07.008>.
- Kleidon, Axel. 2018. “Energy Balance.” *Encyclopedia of Ecology*: 50–63.
- Lin, Baixue, and Yong Tao. 2017. “Whole-Cell Biocatalysts by Design.” *Microbial Cell Factories* 16(1): 1–12.
- Liu, Zhi Hua, and Hong Zhang Chen. 2016. “Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation for Improving the Xylose Utilization of Steam Exploded Corn

- Stover at High Solid Loading.” *Bioresource Technology*.
- Lopez-Hidalgo, Angel M., Arturo Sánchez, and Antonio De León-Rodríguez. 2017. “Simultaneous Production of Bioethanol and Biohydrogen by *Escherichia Coli* WDHL Using Wheat Straw Hydrolysate as Substrate.” *Fuel* 188: 19–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.10.022>.
- Masuko, Tatsuya et al. 2005. “Carbohydrate Analysis by a Phenol-Sulfuric Acid Method in Microplate Format.” *Analytical Biochemistry* 339(1): 69–72.
- Maurer, Jochen, Joachim Jose, and Thomas F. Meyer. 1999. “Characterization of the Essential Transport Function of the AIDA-I Autotransporter and Evidence Supporting Structural Predictions.” *Journal of Bacteriology* 181(22): 7014–20.
- Mielenz, Jonathan R. 2001. “Ethanol Production from Biomass: Technology and Commercialization Status.” *Current Opinion in Microbiology*.
- Peekhaus, N, and T Conway. 1998. “What’s for Dinner?: Entner-Doudoroff Metabolism in *Escherichia Coli*.” *Journal of bacteriology* 180(14): 3495–3502. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657988>.
- Rao, Kripa, Vaibhav Chaudhari, Sasidhar Varanasi, and Dong Shik Kim. 2007. “Enhanced Ethanol Fermentation of Brewery Wastewater Using the Genetically Modified Strain *E. Coli* KO11.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(1): 50–60.
- Reungsang, Alissara, Sureewan Sittijunda, and Irida Angelidaki. 2013. “Simultaneous Production of Hydrogen and Ethanol from Waste Glycerol by *Enterobacter Aerogenes* KKU-S1.” *International Journal of Hydrogen Energy* 38(4): 1813–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.062>.
- Romano, A. H., and T. Conway. 1996. “Evolution of Carbohydrate Metabolic Pathways.” *Research in Microbiology* 147(6–7): 448–55.
- Rosales-Colunga, Luis Manuel, and Antonio De León Rodríguez. 2014. “*Escherichia Coli* and Its Application to Biohydrogen Production.” *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 14(1): 123–35.
- Soo, Chiu Shyan et al. 2017. “Co-Production of Hydrogen and Ethanol by *Escherichia Coli* SS1 and Its Recombinant.” *Electronic Journal of Biotechnology*.

- Stewart, G. G., Chandra J. Panchal, Inge Russell, and A. Michael Sills. 1983. "Biology of Ethanol-Producing Microorganisms." *Critical Reviews in Biotechnology* 1(3): 161–88.
- Theisen, Matthew, and James C. Liao. 2016. "Industrial Biotechnology: Escherichia Coli as a Host ." *Industrial Biotechnology*: 149–81.
- Zhang, Tong, Hong Liu, and Herbert H.P. Fang. 2003. "Biohydrogen Production from Starch in Wastewater under Thermophilic Condition." *Journal of Environmental Management* 69(2): 149–56.