

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Determinación del modelo cinético de la fermentación de glicerina para la
producción de polihidroxialcanoato a dos diferentes escalas

Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional para optar al grado académico
de Licenciada en Ingeniería Química Industrial presentado por

Katherine Yamileth Morales Interiano

Guatemala,

2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Determinación del modelo cinético de la fermentación de glicerina para la
producción de polihidroxialcanoato a dos diferentes escalas

Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional para optar al grado académico
de Licenciada en Ingeniería Química Industrial presentado por

Katherine Yamileth Morales Interiano

Guatemala,

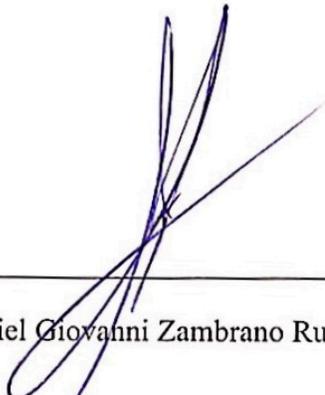
2021

Vo. Bo. :

(f) 

Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

Tribunal examinador:

(f) 

Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc.

(f) 

Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

(f) 

Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda, M.A.

Fecha de aprobación del examen de graduación: Guatemala, 16 de diciembre de 2021

Prefacio

Me encuentro sumamente agradecida de haber tenido el privilegio de culminar exitosamente seis años de estudio de la carrera de Ingeniería Química Industrial en la Universidad del Valle. Formar parte del reducido porcentaje de mujeres en Guatemala con acceso a una educación superior me inspira continuamente a generar conocimiento valioso y de alto impacto para mi país. Decidí orientar el desarrollo de mi trabajo de graduación hacia una investigación que propiciara la valorización de un residuo agroindustrial a través de su integración en un proceso productivo, con el fin de fomentar una economía circular. Esto, debido a que en mi vida profesional aspiro en todo momento a priorizar la integración de nuevas tecnologías para la generación de procesos más limpios, eficientes y sostenibles.

Agradezco a mi casa de estudios, especialmente al departamento de Ingeniería Química Industrial y al Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc, por brindarme las herramientas, el espacio y el tiempo necesario para completar esta meta y por motivarme constantemente a buscar la excelencia. Agradezco a mi asesor, Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc, por brindarme su valioso tiempo, apoyo y guía durante todo este proceso y por contribuir a mi aprendizaje académico a través de sus enseñanzas.

Agradezco a mi familia, a mis padres, Mayra y Gerardo, y a mi hermano, Fernando, por su apoyo incondicional y por enseñarme que mi potencial no tiene límites y que la dedicación y la disciplina me permitirán expandirme y alcanzar todos mis sueños. Agradezco a Dios por brindarme sabiduría, serenidad y por alinear mi camino con personas tan maravillosas. Finalmente, agradezco a mis amigos y futuros colegas, fue para mi un privilegio compartir con ustedes esta experiencia.

Índice

I.	Introducción	1
II.	Justificación	3
III.	Objetivos	5
	A. Objetivo general	5
	B. Objetivos específicos	5
IV.	Marco teórico	6
	A. <i>Bacillus</i>	6
	B. Polihidroxicanoatos	12
	C. Glicerina.....	21
	D. Fermentación microbiana.....	27
	E. Cinética de crecimiento celular.....	34
	F. Análisis químico.....	41
V.	Antecedentes	44
VI.	Metodología	46
	A. Propagación de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581.....	47
	B. Procedimientos generales.....	50
	C. Reducción de la fase de adaptación del crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 en un medio que contiene glicerina.	59
	D. Evaluación de distintas concentraciones iniciales de glicerina como fuente de carbono para la producción de polihidroxicanoato a escala de 0.1 L.	66
	E. Fermentaciones por lotes a escala de 10 L empleando un bioreactor Bioflo 415.....	69

F.	Generación de modelo matemático del proceso fermentativo	73
VII.	Resultados	76
VIII.	Análisis de resultados	101
IX.	Conclusiones	117
X.	Recomendaciones	119
XI.	Referencias bibliográficas.....	121
XII.	Anexos	125
A.	Datos originales.....	125
B.	Datos calculados.....	141
C.	Datos de reactivos y equipos.....	152
D.	Cálculos de muestra	161
E.	Análisis de error	166
F.	Cromatogramas	169
G.	Espectros IR	172
H.	Fotografías.....	178

Listado de cuadros

Cuadro 1.	Sustituciones mas comunes del grupo radical en la estructura general de los polihidroxicanoatos	13
Cuadro 2.	Propiedades físicas entre los tipos más comunes de polihidroxicanoatos y el polipropileno (PP).....	14
Cuadro 3.	Rendimiento de PHA empleando distintos microorganismos y fuentes de carbono en un proceso fermentativo	20
Cuadro 4.	Principales propiedades físicas del glicerol	22
Cuadro 5.	Especificaciones de calidad para las clasificaciones de la glicerina.....	24
Cuadro 6.	Composición de solución de sales y solución de elementos trazas	55
Cuadro 7.	Velocidad de crecimiento celular global de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 de las adaptaciones realizadas en un medio de 20 g/L de glicerina.....	77
Cuadro 8.	Comparación de la conversión de glicerina por parte de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 de las adaptaciones realizadas empleando distintas concentraciones iniciales de glicerina	78
Cuadro 9.	Comparación de producción fermentativa con <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 empleando distintas concentraciones iniciales de glicerina a escala de 0.1 L	79
Cuadro 10.	Comparación de producción fermentativa de PHA con <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 empleando 20 g/L de glicerina a escala de 0.1 L y 10 L.....	81
Cuadro 11.	Definición cuantitativa de las constantes cinéticas de la ecuación de la velocidad de crecimiento específica del <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 basada en el modelo cinético de Monod empleada en las ecuaciones cinéticas de formación de PHA, biomasa y consumo de glicerina	91

Cuadro 12.	Definición cuantitativa de las constantes cinéticas de formación de PHA para la producción fermentativa de PHA a partir de glicerina empleando <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	92
Cuadro 13.	Definición cuantitativa de las constantes cinéticas de crecimiento microbiano para la producción fermentativa de PHA a partir de glicerina, empleando <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	93
Cuadro 14.	Definición cuantitativa de las constantes cinéticas de consumo de glicerina para la producción fermentativa de PHA, empleando <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	94
Cuadro 15.	Comparación de la conversión de glicerina cruda del proceso de biodiésel por parte de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 de las adaptaciones realizadas empleando distintas concentraciones iniciales de sustrato	96
Cuadro 16.	Comparación de producción fermentativa con <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 empleando distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel a escala de 0.1 L	97
Cuadro 17.	Balance de masa del sistema 0	98
Cuadro 18.	Balance de masa del sistema 1	98
Cuadro 19.	Balance de masa del sistema 2	99
Cuadro 20.	Balance de masa del sistema 3	99
Cuadro 21.	Conteo celular empleado en la determinación de la curva de crecimiento celular de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la primera adaptación realizada	125
Cuadro 22.	Conteo celular empleado en la determinación de la curva de crecimiento celular de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la segunda adaptación realizada	126

Cuadro 23. Conteo celular empleado en la determinación de la curva de crecimiento celular de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la tercera adaptación	126
Cuadro 24. Pesos empleados para la determinación de la concentración de sales y elementos trazas sedimentables	127
Cuadro 25. Pesos empleados para la determinación de la concentración final celular de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina para la primera corrida	127
Cuadro 26. Pesos empleados para la determinación de la concentración final celular de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina para la segunda corrida	128
Cuadro 27. Concentraciones finales de glicerina en el medio empleado para las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina.....	129
Cuadro 28. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA y concentración final de glicerina de las fermentaciones realizadas a escala de 0.1L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina	130
Cuadro 29. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA y la concentración final de glicerina en distintos tiempos de fermentación a escala de 0.1 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina de la primera corrida.....	131
Cuadro 30. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA y la concentración final de glicerina y nitrógeno en distintos tiempos de fermentación a escala de 0.1L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina de la segunda corrida	131
Cuadro 31. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA, el pH y la concentración final de glicerina y nitrógeno en distintos tiempos de	

fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 1	133
Cuadro 32. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA, el pH y la concentración final de glicerina y nitrógeno en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 2	135
Cuadro 33. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA, el pH y la concentración final de glicerina y nitrógeno en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 3	137
Cuadro 34. Pesos empleados para la determinación de la concentración final celular de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel	138
Cuadro 35. Concentraciones finales de glicerina en el medio empleado para las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel	139
Cuadro 36. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA y concentración final de glicerina de las fermentaciones realizadas a escala de 0.1 L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel	140
Cuadro 37. Concentración final celular empleada para la elaboración de la curva de crecimiento celular de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la primera adaptación	141
Cuadro 38. Concentración final celular empleada para la elaboración de la curva de crecimiento celular de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la segunda adaptación	141

Cuadro 39. Concentración final celular empleada para la elaboración de la curva de crecimiento celular de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la tercera adaptación.....	142
Cuadro 40. Concentración final de sales y elementos trazas sedimentables	142
Cuadro 41. Concentración final de microorganismos de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina para la primera corrida	143
Cuadro 42. Concentración final de microorganismos de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina para la segunda corrida.....	144
Cuadro 43. Concentración final promedio de microorganismos de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones de glicerina.....	145
Cuadro 44. Concentración final de biomasa y PHA en distintos tiempos de fermentación a escala de 0.1 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina para ambas corridas	146
Cuadro 45. Concentración promedio final de biomasa, PHA y glicerina en distintos tiempos de fermentación a escala de 0.1 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 0	147
Cuadro 46. Concentración final de biomasa y de PHA en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 1	148
Cuadro 47. Concentración final de biomasa y de PHA en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 2	150
Cuadro 48. Concentración final de biomasa y de PHA en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 3	151

Cuadro 49.	Concentración final celular de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel.....	152
Cuadro 50.	Datos de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581.....	152
Cuadro 51.	Datos de agar nutritivo.....	153
Cuadro 52.	Datos de caldo nutritivo.....	153
Cuadro 53.	Datos de glicerina USP.....	153
Cuadro 54.	Datos glicerina cruda obtenida del proceso de biodiésel.....	153
Cuadro 55.	Datos de sulfato de amonio.....	154
Cuadro 56.	Datos de fosfato diácido de potasio.....	154
Cuadro 57.	Datos de fosfato ácido de sodio.....	154
Cuadro 58.	Datos de sulfato de magnesio heptahidratado.....	154
Cuadro 59.	Datos de sulfato de hierro heptahidratado.....	154
Cuadro 60.	Datos de sulfato de zinc heptahidratado.....	155
Cuadro 61.	Datos de sulfato de cobre pentahidratado.....	155
Cuadro 62.	Datos de sulfato de manganeso monohidratado.....	155
Cuadro 63.	Datos de cloruro de calcio dihidratado.....	155
Cuadro 64.	Datos de ácido bórico.....	155
Cuadro 65.	Datos de molibdato de amonio tetrahidratado.....	156
Cuadro 66.	Datos de ácido clorhídrico.....	156
Cuadro 67.	Datos de cloroformo.....	156
Cuadro 68.	Datos de balanza analítica.....	156
Cuadro 69.	Datos de estufa con sistema de agitación.....	157

Cuadro 70.	Datos de autoclave	157
Cuadro 71.	Datos de incubadora.....	157
Cuadro 72.	Datos de balanza	158
Cuadro 73.	Datos de incubadora con agitación orbital.....	158
Cuadro 74.	Datos de centrífuga	158
Cuadro 75.	Datos de agitador vortex	159
Cuadro 76.	Datos de horno de convección por gravedad	159
Cuadro 77.	Datos de microscopio.....	159
Cuadro 78.	Datos de espectrofotómetro	159
Cuadro 79.	Datos de detector de índice de refracción para HPLC	160
Cuadro 80.	Datos de columna de intercambio iónico para HPLC.....	160
Cuadro 81.	Datos de automuestreador para HPLC.....	160
Cuadro 82.	Datos de bioreactor Bioflo 415	160

Listado de figuras

Figura 1.	Ruta metabólica para el metabolismo del glicerol intracelular para la producción de PHA.....	10
Figura 2.	Entrada de glicerol en la ruta metabólica de la glucólisis para la producción de piruvato.	11
Figura 3.	Estructura general de los polihidroxicanoatos	12
Figura 4.	Ciclo de vida general de los polihidroxicanoatos.	15
Figura 5.	Gránulos de PHA intracelular	17
Figura 6.	Estructura del glicerol.	22
Figura 7.	Producción, comercio y precios mundiales de biodiésel hasta el año 2017	25
Figura 8.	Reacción general de transesterificación de un aceite para la obtención de biodiésel	25
Figura 9.	Composición general del mercado de glicerina	27
Figura 10.	Reactor STR.....	28
Figura 11.	Reactor CSTR	29
Figura 12.	Reactor PFR	30
Figura 13.	Fases de crecimiento típicas de un microorganismo en un reactor por lotes: (A) fase de adaptación; (B) fase de aceleración; (C) fase exponencial; (D) fase de desaceleración; (E) fase estacionaria; (F) fase de muerte	37
Figura 14.	Dependencia de la velocidad específica de crecimiento celular con la concentración de sustrato	39
Figura 15.	Placa cuadrículada visible en una cámara de Neubauer	42

Figura 16. Comparación de biomasa y PHB obtenido a partir de la fermentación de 20 g/L de glicerina inicial empleando <i>Bacillus megaterium</i> a distintas temperaturas de operación	45
Figura 17. Comparación de la curva de crecimiento celular de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina de las adaptaciones realizadas	76
Figura 18. Comparación de las adaptaciones realizadas para el crecimiento microbiano de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina	77
Figura 19. Ajuste del modelo a los datos experimentales de crecimiento microbiano, consumo de glicerina y formación de PHA para el sistema 0	83
Figura 20. Ajuste del modelo a los datos experimentales de crecimiento microbiano, consumo de glicerina y formación de PHA para el sistema 1	85
Figura 21. Ajuste del modelo a los datos experimentales de crecimiento microbiano, consumo de glicerina y formación de PHA para el sistema 2	87
Figura 22. Ajuste del modelo a los datos experimentales de crecimiento microbiano, consumo de glicerina y formación de PHA para el sistema 3	89
Figura 23. Comparación de las adaptaciones realizadas para el crecimiento microbiano de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel	95
Figura 24. Ejemplo de resultado de cromatograma de HPLC para la cuantificación de glicerina correspondiente a la medición tomada a la hora 24 de la fermentación a escala de 0.1 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina de la primera corrida.....	169
Figura 25. Ejemplo de resultado de cromatograma de HPLC para la cuantificación de glicerina correspondiente a la muestra tomada a la hora 26 de la fermentación a escala de 10 L del sistema 1	170

Figura 26.	Curva de calibración de glicerina en HPLC utilizada en la cuantificación de glicerina	171
Figura 27.	Espectro IR del producto de la fermentación del sistema 0.....	172
Figura 28.	Espectro IR del producto de la fermentación del sistema 1	173
Figura 29.	Espectro IR del producto de la fermentación del sistema 2.....	174
Figura 30.	Espectro IR del producto de la fermentación del sistema 3.....	175
Figura 31.	Espectro IR del producto de la fermentación de glicerina del proceso de biodiésel	176
Figura 32.	Espectro IR del estándar de PHA empleado en la comparación con el producto obtenido	177
Figura 33.	Propagación primaria y secundaria de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	178
Figura 34.	Verificación del crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 a partir de una concentración inicial de 20 g/L de glicerina de la tercera adaptación realizada por medio de su observación a través de un microscopio	178
Figura 35.	Adaptaciones realizadas de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina	179
Figura 36.	Conteo celular de una de las cuatro secciones correspondientes a las esquinas de la cuadrícula de la cámara de NeuBauer	179
Figura 37.	Sistema utilizado para la cuantificación de biomasa empleando la técnica de peso seco en un horno a 60 °C	180
Figura 38.	Fermentaciones realizadas a escala de 0.1L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina.....	181

Figura 39.	Verificación cualitativa de la fermentación a partir de glicerina a escala de 0.1 L	181
Figura 40.	Preparación de inóculo realizando tres adaptaciones a glicerina como fuente de carbono a partir de una concentración inicial de 20 g/L para una fermentación a escala de 10 L	182
Figura 41.	Reactor <i>Bioflo</i> 415 utilizado en las fermentaciones a escala de 10 L.....	182
Figura 42.	Limpieza interior del reactor <i>Bioflo</i> 415 previo a la realización de una fermentación a escala de 10 L.....	183
Figura 43.	Interior de una fermentación efectuada a escala de 10 L empleando el reactor <i>Bioflo</i> 415	183
Figura 44.	Sistema utilizado para la toma de muestras a lo largo del tiempo para las fermentaciones a escala de 10 L	184
Figura 45.	Volumen total de una fermentación a escala de 10 L extraído del reactor <i>Bioflo</i> 415 para su posterior análisis químico	184
Figura 46.	Visualización de la separación de las fases de cloro y cloroformo para la extracción de PHA.	185
Figura 47.	PHA extraído luego de ser secado en un horno a 60°C	186
Figura 48.	Cuantificación de nitrógeno para el sistema 1 utilizando el método 10071 extraído del manual del equipo HACH DR 890	187
Figura 49.	Adaptaciones realizadas de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel.....	187
Figura 50.	Fermentaciones realizadas a escala de 0.1L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel	188

Figura 51.	Verificación cualitativa de la fermentación a partir de glicerina cruda del proceso de biodiésel a escala de 0.1 L	188
Figura 52.	Glicerina cruda del proceso de biodiésel utilizada en las experimentaciones	189

Listado de ecuaciones

Ecuación 1.	Velocidad de crecimiento celular.....	35
Ecuación 2.	Velocidad específica de crecimiento celular.....	36
Ecuación 3.	Expresión matemática del modelo de Monod.....	37
Ecuación 4.	Relación entre el crecimiento celular y el consumo de sustrato establecida por el modelo de Monod.....	38
Ecuación 5.	Expresión matemática del modelo de Monod reducida a orden cero	38
Ecuación 6.	Expresión matemática del modelo de Monod reducida a primer orden	38
Ecuación 7.	Rendimiento específico de producto con respecto al sustrato	40
Ecuación 8.	Rendimiento específico de biomasa con respecto a sustrato	40
Ecuación 9.	Rendimiento específico de producto con respecto a biomasa.....	40
Ecuación 10.	Ley de Arrhenius.....	40
Ecuación 11.	Ecuación velocidad de crecimiento específica del <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 basada en el modelo cinético de Monod empleada en las ecuaciones cinéticas de formación de PHA, biomasa y consumo de glicerina	91
Ecuación 12.	Ecuación de cinética de formación de PHA en función del tiempo para la producción fermentativa de PHA a partir de glicerina empleando <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	92
Ecuación 13.	Ecuación cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo para la producción fermentativa de PHA a partir de glicerina, empleando <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	93

Ecuación 14.	Ecuación cinética de consumo de glicerina en función del tiempo para la producción fermentativa de PHA empleando <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	94
Ecuación 15.	Promedio	161
Ecuación 16.	Concentración celular final	161
Ecuación 17.	Concentración de sales y elementos trazas sedimentables.....	162
Ecuación 18.	Concentración final de microorganismos	162
Ecuación 19.	Conversión de glicerina	163
Ecuación 20.	Conversión de nitrógeno	163
Ecuación 21.	Concentración final de biomasa	164
Ecuación 22.	Concentración final de PHA	164
Ecuación 23.	Desviación estándar	166
Ecuación 24.	Propagación de error de una multiplicación por una constante	166
Ecuación 25.	Propagación de error de sumas y restas	167
Ecuación 26.	Propagación de error de una división por una constante	167
Ecuación 27.	Propagación de error de multiplicaciones y divisiones.....	168

Resumen

En el presente trabajo de graduación se evaluó la fermentación de distintas concentraciones iniciales de glicerina como fuente de carbono para la producción de polihidroxicanoato empleando el microorganismo *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a escala de 0.1 L dónde se obtuvo la mayor formación de producto de 0.7844 ± 0.0031 g/L para 20 g/L de glicerina inicial. Para el cumplimiento de lo anterior, se realizó una serie de tres adaptaciones consecutivas de la cepa fermentadora a este sustrato para reducir la fase de adaptación del crecimiento del microorganismo donde se obtuvo una velocidad de crecimiento celular global para la tercera adaptación de $1.3E+08 \pm 1.1E+07$ g * L⁻¹ * h⁻¹ en 48 h de reacción. Además, se evaluó el efecto en los rendimientos específicos de la fermentación debido a la introducción de tres distintos flujos de aire a escala de 10 L donde se obtuvo el mayor rendimiento específico de producto con respecto a sustrato de 0.1688 ± 0.0002 (m/m) bajo un flujo de aire de 12 L/min. Se cuantificó y se analizó la concentración de biomasa, glicerina y polihidroxicanoato obtenida a lo largo del tiempo durante todas las fermentaciones realizadas, a partir de las cuales se determinó un modelo cinético representativo a ambas escalas, basado en el modelo de Monod, el cual permite predecir las concentraciones de las especies involucradas a lo largo del tiempo. Finalmente, se compararon los parámetros cinéticos característicos de cada sistema y la influencia que la escala puede llegar a tener en los mismos, estableciendo que el incremento en la disponibilidad y control de oxígeno, en la resistencia a la transferencia de masa de la fase líquida dado un aumento en la viscosidad y el régimen de flujo observado y en el control interno de temperatura presentado en los sistemas a escala de 10 L resultó en un aumento general de los rendimientos específicos de las fermentaciones a esta escala.

I. Introducción

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son materiales macromoleculares sintetizados utilizando seres vivos selectivos como forma de almacenamiento de energía. Al ser considerados plásticos biocompatibles y biodegradables, pueden llegar a presentar una alta competitividad frente a plásticos convencionales derivados del petróleo que exhiban las mismas propiedades físicas y químicas (Lemos Delgado & Mina Cordoba, 2015). Estos pueden ser producidos por distintos microorganismos los cuales pueden consumir diversos residuos agroindustriales como fuentes de carbono para su crecimiento, desarrollo y producción de PHAs bajo ciertas condiciones de operación. Entre estos residuos agroindustriales empleados para la producción de PHAs destaca la glicerina, subproducto generado de la industria de producción de biodiésel, un biocombustible líquido producido a partir de aceites vegetales y grasas animales. Desde el 2003, la producción de biodiésel comenzó a aumentar considerablemente por lo que, actualmente la disponibilidad de glicerina proveniente del proceso de biodiésel se ha duplicado, mientras que su demanda se ha mantenido relativamente constante (Polich, 2019). Esto ha generado una disminución en el precio del mercado por lo que su aprovechamiento como materia prima brinda una solución.

El proceso descrito previamente para la producción de PHAs se lleva a cabo por medio de una reacción de fermentación, la cual permite a través de un proceso bioquímico, la transformación de una sustancia orgánica en otra de utilidad. Esta transformación es catalizada por enzimas específicas segregadas por el microorganismo empleado en la fermentación. Si este individuo es sometido a condiciones de estrés, como la limitación de nutrientes, se ve obligado a almacenar energía de alguna manera para poder sobrevivir. Esta reserva de energía se realiza en forma de PHAs (Naranjo, 2010).

Por lo tanto, es sumamente importante estudiar las condiciones de operación que maximicen la producción de polihidroxicanoato (PHA) por medio de una fermentación microbológica controlada que emplee glicerina como fuente de carbono. El estudio se

realiza a través de la determinación de las concentraciones en función del tiempo de microorganismos, glicerina y PHA para la obtención un modelo cinético. Este modelo contempla la representación de estos datos experimentales por un modelo matemático que permita la predicción de estas variables en función del tiempo. La representación matemática de los datos habilita la posibilidad de escalar el proceso fermentativo, además de permitir una evaluación técnica y económica del mismo.

II. Justificación

En 2019, la producción de plásticos totalizó alrededor de 368 millones de toneladas métricas en todo el mundo. La versatilidad y las múltiples aplicaciones de este grupo de materiales explica el continuo crecimiento en su producción año tras año. Además, el incremento en su producción ha generado un crecimiento paralelo en su valor de mercado (Statista, 2021a). La dependencia directa que presentan los plásticos con el petróleo como materia prima principal para su fabricación incentiva aún más la extracción de crudo de los subsuelos. Conjuntamente, su fácil dispersión y su lento proceso de degradación los convierte en una fuente significativa de contaminación para cuerpos de agua, afectando diversas especies y, a largo plazo, la cadena alimenticia en su totalidad. Resultado de este marco global, la búsqueda por alternativas sostenibles y compatibles con el medio ambiente de los plásticos convencionales derivados del petróleo ha cobrado importancia durante la última década. De modo que, los biopolímeros presentan una alternativa interesante frente a esta problemática. Entre estos, destacan los PHAs por su amplio rango de aplicación debido a sus características similares al polietileno y polipropileno. La demanda mundial de estos últimos ascendió a alrededor de 142 millones de toneladas métricas en 2017 por lo que la reducción en su consumo es vital para la protección del medio ambiente (Statista, 2021b). No obstante, es importante notar que la competitividad de los PHAs frente a los plásticos convencionales se ha visto reducida debido a los altos costos que presentan las fuentes de materia prima para su producción. Estas pueden llegar a representar hasta un 45% del costo total (Naranjo *et al.*, 2013).

Por lo tanto, se justifica cada vez más la búsqueda de fuentes de carbono económicamente viables para la producción de PHA que logren frenar el alto consumo de plásticos derivados del petróleo y que presenten un sustituto competitivo. Los residuos agroindustriales son candidatos atractivos debido a su alta disponibilidad y su bajo costo. Desde el punto de vista ecológico, la utilización de residuos agroindustriales minimiza el

impacto ambiental de la disposición final de estos desechos y propicia el uso de tecnologías y sustratos alternativos. Desde el punto de vista económico, son sustratos de bajo costo para las grandes industrias. La glicerina es el residuo principal de la producción industrial de biodiésel. Aunque esta es una materia prima utilizada en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, de pulpa y papel, cuero, textil, tabaco, entre otras, el crecimiento de la industria del biodiésel ha llevado a un excedente de glicerina provocando una importante disminución en su precio de mercado y en su aprovechamiento (Naranjo *et al.*, 2013). Dada la naturaleza reducida de las cadenas de carbono de la glicerina, esta puede ser utilizada como fuente de carbono para procesos microbiológicos y, por lo tanto, para la producción de PHAs. Por estas razones, este trabajo de graduación provee un estudio inicial en donde se empleen condiciones y distintas escalas de fermentación para que un microorganismo previamente reportado, cómo el *Bacillus megaterium* ATCC 14581, consuma glicerina como fuente de carbono para la producción de PHA.

Además, esta investigación propone un modelo cinético compuesto principalmente por un modelo matemático que permite, en función del tiempo, la predicción del comportamiento del consumo de glicerina por parte del microorganismo, al igual que su crecimiento celular y la producción de PHA a diferentes escalas. La importancia de la determinación de este modelo matemático radica en la información técnica que este otorga ya que, con este, el escalamiento del proceso fermentativo es posible. En este sentido, el estudio del modelo matemático es fundamental a distintas escalas. Asimismo, la cantidad de estos estudios técnicos reportados en la literatura es sumamente limitada, especialmente si la búsqueda se centra únicamente en conocimiento generado en Guatemala; en este marco, se justifica aún más el esfuerzo experimental y técnico de esta investigación.

III. Objetivos

A. Objetivo general

1. Determinar el modelo cinético de la fermentación de glicerina para la producción de polihidroxialcanoato a dos diferentes escalas.

B. Objetivos específicos

1. Reducir la fase de adaptación del crecimiento de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio que contiene glicerina para la preparación de inóculo de las fermentaciones a evaluar.
2. Evaluar distintas concentraciones iniciales de glicerina como fuente de carbono para la producción de polihidroxialcanoato a escala de 0.1 L.
3. Determinar un modelo matemático que permita predecir concentración de biomasa, glicerina y polihidroxialcanoato en función del tiempo a escala de 0.1 L y 10 L para comparar la influencia de la escala.

IV. Marco teórico

A. *Bacillus*

1. Características generales

Bacillus es un género de bacterias formadoras de esporas en forma de bastón. Abarca más de 60 especies con una gran diversidad genética, la mayoría de las cuales se consideran no patógenas. Los miembros del género *Bacillus* se conocen como bacterias bajas en G+C. El porcentaje G+C es una técnica ampliamente utilizada para caracterizar genomas bacterianos. Esta técnica toma en consideración que el ADN de todos los seres vivos están formados por cuatro bases de nucleótidos: Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) y Timidina (T). Por lo tanto, que sean bacterias bajas en G+C indica típicamente que poseen menos bases de ADN G y C que bases A y T en comparación con otras bacterias. Igualmente, estas bacterias se consideran Gram-positivas, es decir, se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, reflejando un tipo natural de organización bacteriana en relación a la estructura de su envoltura celular (Wiedmann & Zhang, 2011).

El género *Bacillus* incluye una variedad de especies de interés humano para el desarrollo tecnológico. Esto se debe a su potencial aprovechamiento en aplicaciones industriales para la fabricación de productos biotecnológicos como antibióticos peptídicos, enzimas para detergentes, entre otros. Además, es de gran interés modelar la formación de esporas como un sistema para el estudio de su resistencia ante agentes descontaminantes. De igual forma, a través de los años se ha ampliado la investigación en relación a su capacidad de causar enfermedades en los seres humanos (Wiedmann & Zhang, 2011).

2. *Bacillus megaterium*

Dentro del género de bacterias *Bacillus* se destaca la *Bacillus megaterium*. Esta es, por consiguiente, una bacteria formadora de esporas, Gram-positiva, que puede ser encontrada en diversos hábitats de la naturaleza. Se consideraba una bacteria del suelo principalmente, aunque puede ser encontrada en agua de mar, arrozales, sedimentos e incluso en la miel de abeja. Puede presentar crecimiento a temperaturas entre 3 °C y 45 °C, siendo alrededor de 30 °C donde presenta su mayor reproducción. Además, presenta una longitud de hasta 4µm y un diámetro de 1.5µm por lo que es considerada de las bacterias más grandes conocidas en la actualidad. Su gran tamaño ha provocado que sea objeto de investigación morfológica relacionada a la formación de esporas, la organización celular, la localización de proteínas, entre otros (Bunk *et al.*, 2010).

Dado que carecen de la membrana celular externa que sí poseen las bacterias Gram-negativas, estas bacterias son capaces de secretar grandes cantidades de proteínas en el medio de cultivo. La secreción de distintas proteínas permite que el microorganismo consuma nutrientes altamente poliméricos como polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos, entre otros, a través de su descomposición en sus monómeros más simples. En este sentido, la bacteria es capaz de reproducirse en una amplia gama de sustratos, incluyendo sustancias de bajo costo (Bunk *et al.*, 2010).

Es importante notar que el *Bacillus megaterium* es considerada una bacteria aeróbica. Esto se debe principalmente a que no puede realizar una respiración anaeróbica, la cual permite la formación de energía en forma de ATP sin oxígeno. La respiración anaeróbica requiere de una cadena de transporte de electrones respiratorios, pero sin emplear oxígeno como aceptor terminal de electrones. Existen diversos aceptores de electrones; en la desnitrificación se emplea nitrato, NO_3^- , ya que como el oxígeno, presenta un alto potencial de reducción. No obstante, el *Bacillus megaterium* no puede generar energía por medio del proceso de desnitrificación debido a que carece de nitrato reductasa, la enzima encargada de catalizar la reducción de nitrato a nitrito en la respiración anaerobia. En este sentido, el oxígeno es vital para su crecimiento y funcionalidad (Bunk *et al.*, 2010).

Dentro de sus aplicaciones principales, se distingue la producción penicilina acilasa, enzima encargada de catalizar la hidrólisis de penicilina semisintética, la producción de

biofertilizantes debido a su alta capacidad del control biológico contra patógenos y la producción de biosurfactantes y vitamina B12 (Bunk *et al.*, 2010).

Además, se recalca su amplia aplicación en la producción de polihidroxicanoatos. Esto ya que presenta una mayor tasa de crecimiento frente a otras bacterias y la ausencia de la capa externa de lipopolisacáridos facilita la extracción de PHA que se produce de manera intracelular. Además, su capacidad de emplear diferentes fuentes de sustrato facilita la exploración de materias primas asequibles para la producción de PHA, por ejemplo, materiales agroindustriales de desecho. No obstante, un comportamiento principal del *Bacillus megaterium* es la esporulación, es decir, el microorganismo frente condiciones adversas que generen estrés en el mismo, esporula como mecanismo de defensa. La esporulación es un proceso que no favorece la producción de PHA en la célula, por lo que se deben de minimizar condiciones en el medio que favorezcan la esporulación (Mohapatra *et al.*, 2017).

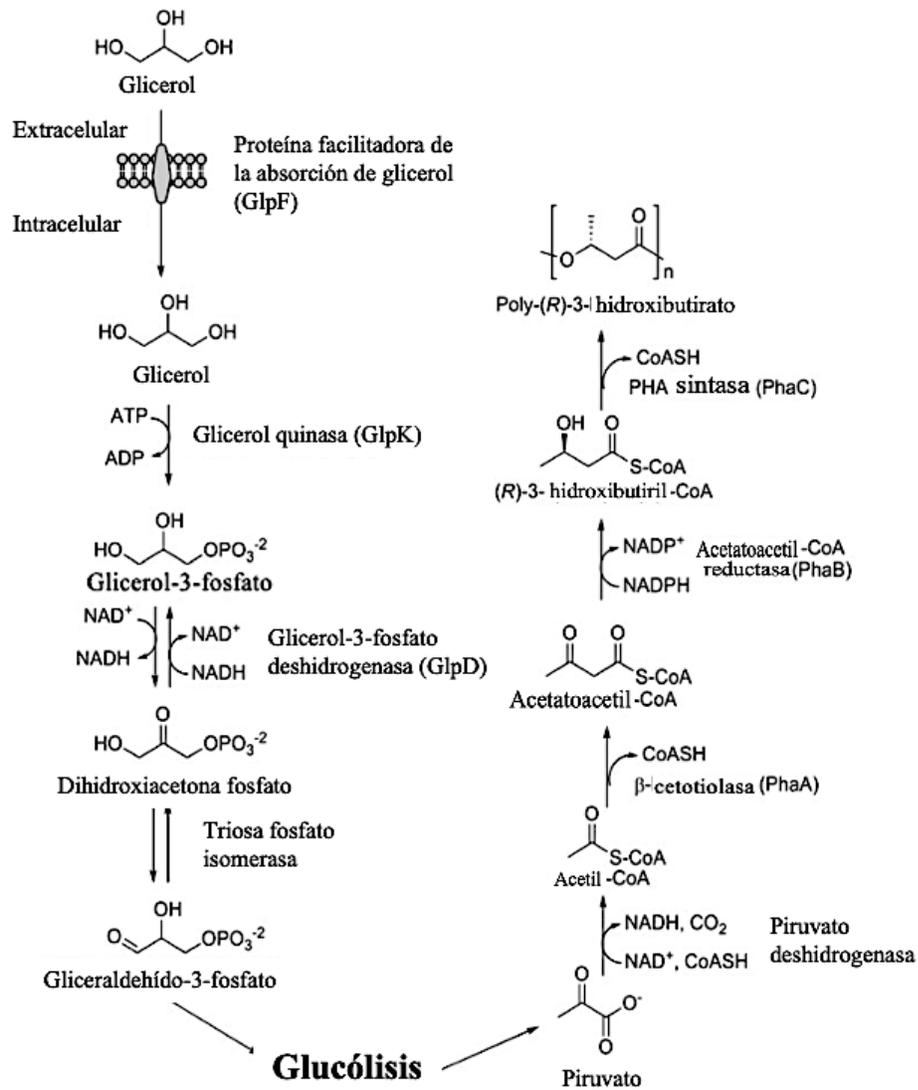
3. Ruta metabólica para la producción de polihidroxicanoatos a partir de glicerina

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* tienen la habilidad de sintetizar distintos tipos de polihidroxicanoatos en su interior en distintos momentos de su crecimiento microbiano. Principalmente, la síntesis se puede generar en la fase de crecimiento exponencial, donde la reproducción microbiana se encuentra en su máximo, y en la fase de crecimiento estacionaria, donde el crecimiento global de la población microbiana ha alcanzado un valor relativamente constante. Por lo tanto, la acumulación de PHA no asociada al crecimiento celular ocurre en la fase estacionaria donde se presenta una limitación de los nutrientes esenciales del medio, como nitrógeno, fósforo, magnesio y oxígeno para algunas especies, y exceso de la fuente de carbono. Al contrario, la producción de PHA asociada a el crecimiento se realiza a condiciones equilibradas (Mohapatra *et al.*, 2017).

El polihidroxi-butilato, PHB, es el tipo de PHA más comúnmente sintetizado por una variedad de bacterias, específicamente se suele sintetizar poli-3-hidroxi-butilato (P3HB) si se parte de glicerol como fuente de carbono para un microorganismo del género *Bacillus*. Es importante recalcar que la glicerina es el nombre comercial que reciben las mezclas que poseen un alto contenido de glicerol (Zhu *et al.*, 2013).

De las diversas bacterias que pueden absorber glicerol y consumir el mismo para metabolizarlo en componentes básicos para su crecimiento y desarrollo microbiano, se destaca la *Bacillus megaterium*. La ruta metabólica, es decir el conjunto de reacciones químicas consecutivas catalizadas por enzimas programadas por la célula, para la producción de PHB a partir de glicerol comienza en transporte del glicerol desde el medio a través de la membrana citoplasmática empleando la proteína facilitadora de la absorción de glicerol (GlpF). El glicerol intracelular se convierte en gliceraldehído-3-fosfato (GAP) por medio de la acción de tres enzimas: glicerol quinasa (GlpK), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GlpD) y triosafosfato isomerasa (TPI). Este proceso se muestra en la Figura 1.

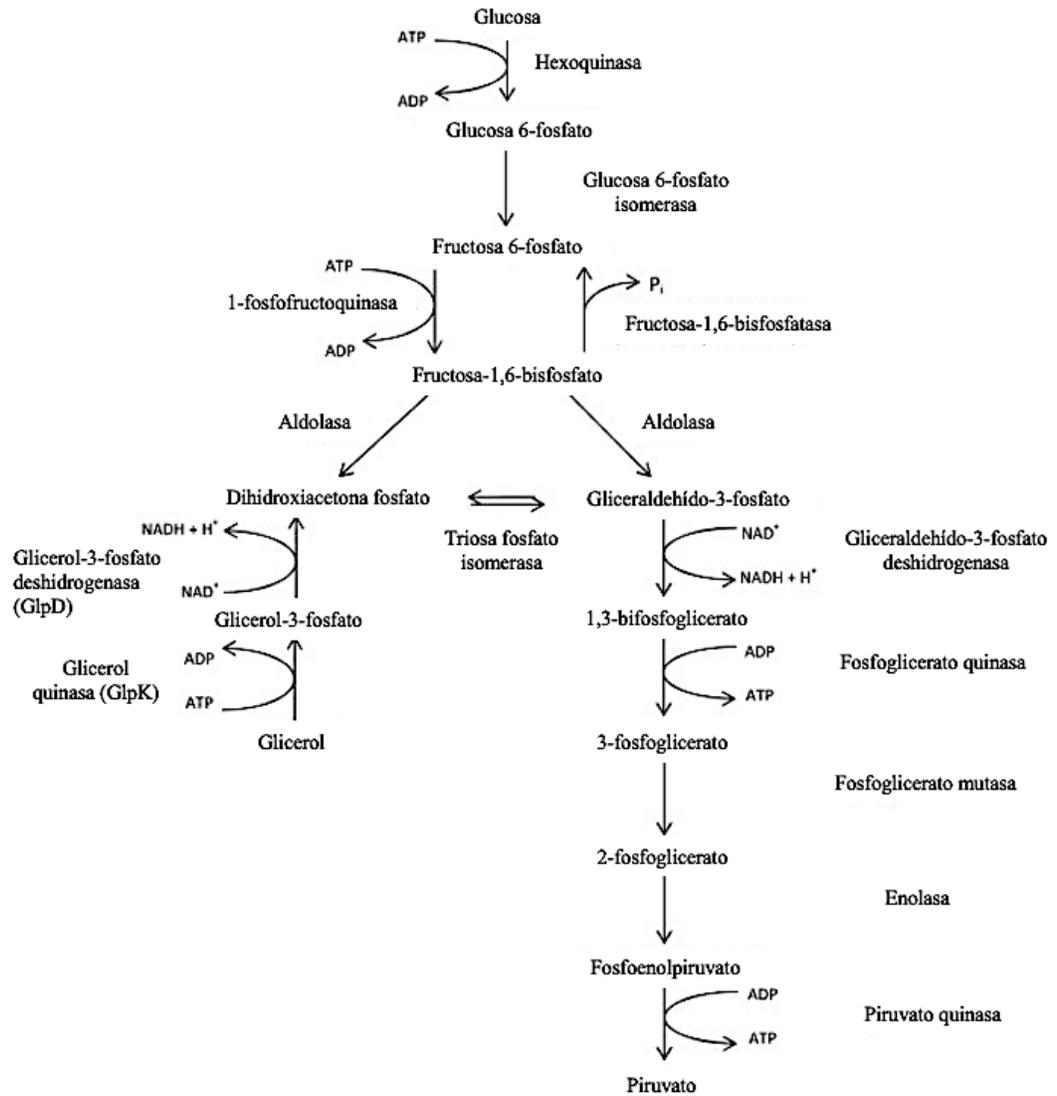
Figura 1. Ruta metabólica para el metabolismo del glicerol intracelular para la producción de PHA.



Adaptado de Zhu *et al.* (2013).

El compuesto GAP formado es un intermediario en la ruta metabólica de la glucólisis cómo se muestra en la Figura 2. Este es convertido a piruvato por medio de la intervención de cuatro enzimas: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfoglicerato quinasa (PGK), fosfoglicerato mutasa (PGAM), enolasa y piruvato quinasa (PK).

Figura 2. Entrada de glicerol en la ruta metabólica de la glucólisis para la producción de piruvato.



Adaptado de Hipkiss *et al.* (2013).

Una vez producido el piruvato, por medio de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), este se convierte en Acetil-CoA como muestra la Figura 1 mediante un proceso conocido como descarboxilación oxidativa de ácido pirúvico. En este, el piruvato es modificado al retirarle un grupo carboxilo, posteriormente es oxidado y se da la unión a la coenzima A (CoA). La síntesis microbiana del P3HB comienza por la condensación de dos moléculas de Acetil-CoA por medio de de la enzima β -cetotiolasa (PhaA) en Acetoacetyl-CoA. Este, seguidamente, se reduce a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA empleando la enzima

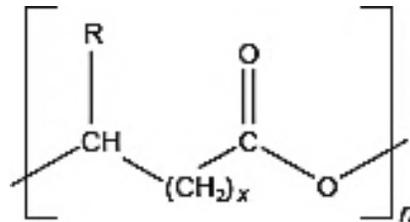
Acetoacetyl-CoA reductasa (PhaB). El último paso en la síntesis se realiza por medio de la enzima PHA sintasa (PhaC) la cual se encarga de polimerizar los monómeros (R)-3-hidroxitiril-CoA para finalmente formar el P3HB (Hipkiss *et al.*, 2013).

B. Polihidroxicanoatos

1. Estructura

Los polihidroxicanoatos son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente, por lo que estos polímeros también son conocidos como poliésteres (Naranjo, 2010).

Figura 3. Estructura general de los polihidroxicanoatos



(Naranjo, 2010)

El valor de n depende directamente del grupo radical (R) y del microorganismo empleado para su producción; generalmente, oscila entre 100 y 30,000. Esta variabilidad permite la biosíntesis de una amplia gama de polímeros que exhiben propiedades físicas diferentes (Lemos Delgado & Mina Cordoba, 2015). En el Cuadro 1 se muestran las sustituciones más comunes del grupo radical en la estructura general de los PHAs.

Cuadro 1. Sustituciones mas comunes del grupo radical en la estructura general de los polihidroxicanoatos

Grupo Radical	Nombre del polímero	Abreviación
CH ₃	Poli(3-hidroxiбутирато)	PHB
CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxiуаlerato)	PHV
CH ₂ CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxihexanoato)	PHHx

(Lemos Delgado & Mina Cordoba, 2015)

2. Propiedades

Entre sus propiedades más relevantes se destaca que sean considerados termoplásticos. Los termoplásticos son compuestos, generalmente de alto peso molecular, que se vuelven deformables a medida que aumenta su temperatura y se vuelven más rígidos a medida que se enfrían; a esta transición gradual dependiente de la temperatura se le conoce como el estado de transición vítrea. Si bien los PHAs suelen ser levemente más frágiles y más rígidos que el polipropileno y el polietileno, los cuales también son considerados termoplásticos, pueden ser procesados por los mismos equipos para su procesamiento; es decir, poseen la capacidad de someterse a técnicas de moldeo por extrusión e inyección. Por lo tanto, su área de aplicación radica en artículos tales como: cubiertos, empaques, objetos de aseo personal, artículos de oficina, cubiertas para usos en la agricultura, filtros de cigarrillos, entre otros. Además, poseen propiedades físicas similares al polietileno y el polipropileno (Cuadro 2) con la excepción que los PHAs son biodegradables, biocompatibles y se obtienen a partir de fuentes renovables de carbono (Naranjo, 2010).

Cuadro 2. Propiedades físicas entre los tipos más comunes de polihidroxialcanoatos y el polipropileno (PP)

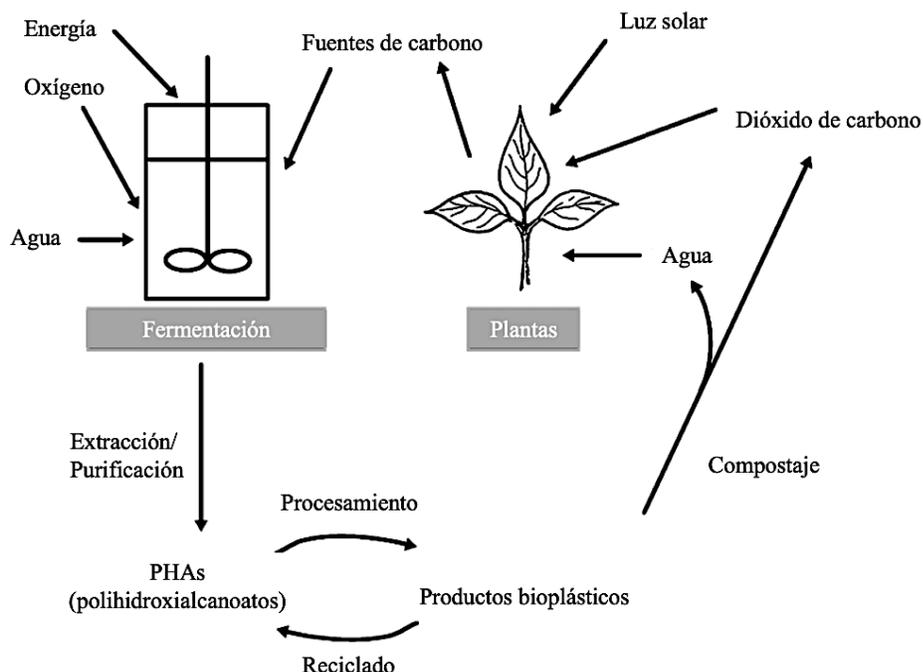
Propiedad física	PP	PHB	PHV	PHH_x
Temperatura de fusión (°C)	176	177	145	127
Temperatura de transición (°C)	-10	2	-1	-1
Cristalinidad (%)	50-70	60	56	34
Fuerza de tensión (Mpa)	38	43	20	40210
Extensión hasta quiebre (%)	400	5	50	400

(González, 2008)

La capacidad de biodegradación, facultad de un material orgánico de descomponerse en sustancias más sencillas debido a la actividad enzimática de microorganismos específicos, se da porque en la naturaleza se encuentran presentes microorganismos que son capaces de degradar enzimáticamente los PHAs de forma extracelular e intracelular empleando hidrolasas y PHA depolimerasas. La actividad de estas últimas dos enzimas depende directamente de la composición específica del biopolímero y de las condiciones ambientales lo cual impactará en el tiempo total de degradación. La tasa de degradación de una pieza de PHB suele ser del orden de unos pocos meses cuando esta se encuentra presente en aguas residuales anaeróbicas y puede llegar a tomar años si esta se encuentra en agua de mar (Verlinden *et al.*, 2007).

En la Figura 4 se muestra el ciclo de vida general de los polihidroxialcanoatos (Verlinden *et al.*, 2007).

Figura 4. Ciclo de vida general de los polihidroxicanoatos.



Adaptado de Verlinden *et al.* (2007).

Su biocompatibilidad, cualidad que posee un biomaterial de generar una respuesta biológica aceptable, también les permite ser utilizados en aplicaciones médicas como en elementos de suturas, recipientes de sangre artificial e incluso en la ingeniería de tejidos ya que este no generará efectos tóxicos en el organismo (Naranjo, 2010). Dentro de mamíferos, el biopolímero se hidroliza lentamente. Se ha estudiado que en ratones, la pérdida total luego de 6 meses de implantación del biopolímero fue de 1.6% (p/p) (Verlinden *et al.*, 2007).

3. Síntesis intracelular

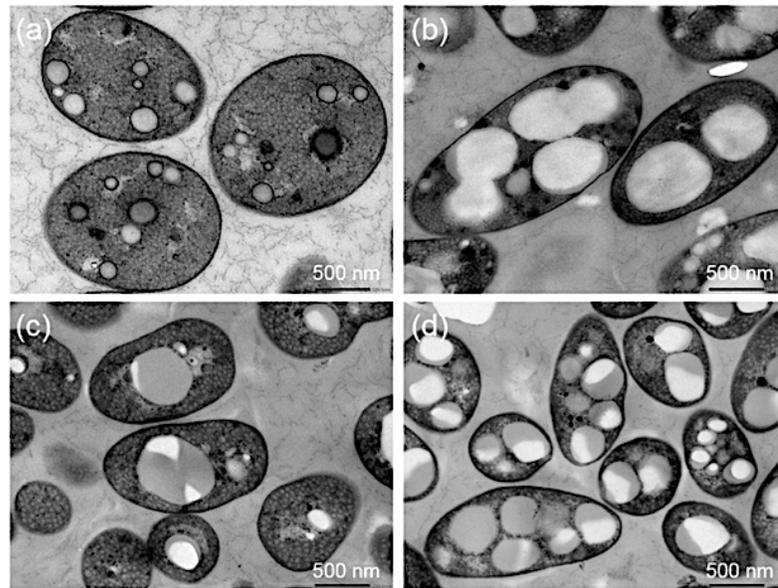
Los PHAs pueden llegar a ser sintetizados bajo condiciones específicas por muchos organismos vivos. Dentro de esta variedad destacan las células vegetales y las células bacterianas como los principales candidatos para la producción a gran escala de PHA. Las células vegetales presentan rendimientos menores al 10% (m/m) de peso seco de producción de PHAs. Los altos niveles de rendimiento de 10–40% (m/m) de peso seco de polímero dentro de la célula vegetal genera un efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo general de la planta. En contraste, las células bacterianas logran acumular bajo

condiciones específicas de reacción niveles tan altos como el 90% (m/m) de peso seco de PHAs (Verlinden *et al.*, 2007).

La síntesis y acumulación del polímero dentro de estos organismos vivos ocurre de manera natural cuando los suministros de nutrientes están desequilibrados. Esto se da, generalmente, cuando el crecimiento bacteriano está limitado por el agotamiento de nitrógeno, fósforo u oxígeno mientras prevalece una cantidad excesiva de la fuente de carbono. Este desbalance provoca la síntesis de PHA como fuente de carbono y energía para el funcionamiento y sobrevivencia de la célula. Las condiciones específicas de desequilibrio dependen necesariamente de la naturaleza de la célula que se esté empleando para llevar a cabo la síntesis del biopolímero.

Ya que los PHA son insolubles en agua, en la mayoría de microorganismos, estos se presentan como cuerpos de inclusión y se acumulan en gránulos en el citoplasma, generalmente en vesículas secretoras como se observa en la Figura 5. Los gránulos pueden tener un tamaño de hasta 0.5µm. Estos se encuentran rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene enzimas polimerasas y despolimerasas (Lemos Delgado & Mina Cordoba, 2015). Al polimerizar intermedios solubles en moléculas insolubles, la célula no sufre alteraciones de su estado osmótico. Por lo tanto, se evita la fuga de estos valiosos compuestos fuera de la célula y los depósitos de nutrientes permanecen disponibles de forma segura a un bajo costo de mantenimiento celular. Almacenar el exceso de nutrientes dentro de las células presenta una gran ventaja para las bacterias, especialmente porque su aptitud fisiológica general no se ve afectada (Verlinden *et al.*, 2007).

Figura 5. Gránulos de PHA intracelular



(Higuchi-Takeuchi *et al.*, 2016)

4. Costos de producción

Los costos de producción de los polihidroxicanoatos que se producen a partir de una vía fermentativa empleando microorganismos dependen directamente de la fuente de carbono a utilizar. Además, dependen del microorganismo seleccionado el cual impacta directamente en el rendimiento de la conversión sustrato-producto. Asimismo, las condiciones de fermentación, la recuperación del biopolímero y su purificación final impactan el costo final de producción (Naranjo, 2010).

Actualmente el costo de la fuente de carbono virgen como materia prima principal oscila entre 20% y 50% de los costos totales de producción. Esta alta proporción provoca una disminución significativa de su competitividad en el mercado global frente a los plásticos convencionales derivados del petróleo cuya producción resulta más económica. No obstante, el aprovechamiento de residuos agroindustriales como fuentes de carbono alternativas genera una drástica reducción en los costos totales debido a su alta disponibilidad y bajo precio en el mercado (Naranjo, 2010).

5. Fuentes de carbono para su producción

La producción a gran escala de PHA actualmente se realiza empleando sustratos vírgenes como la glucosa, fructosa, sacarosa ácido propanoico, entre otros. Debido al alto costo que estos pueden llegar a representar como se mencionó anteriormente, se ha explorado la producción de PHA a partir de distintos residuos agroindustriales. A continuación, se exponen algunos sustratos provenientes de la agroindustria que han generado resultados satisfactorios en la literatura (Nikodinovic-Runic *et al.*, 2013).

a. Suero de leche

El suero es el principal subproducto de las industrias productoras de lácteos, quesos y derivados. Representa alrededor del 80-90% del volumen de leche procesada durante la fabricación de queso y caseína. En este sentido, se considera un material de desecho y presenta un excedente en términos de oferta en muchas regiones del mundo. Globalmente se producen 120 millones de toneladas por año, de las cuales el 66% se genera en la Unión Europea y el 25% en América del Norte. Aproximadamente la mitad del suero producido se convierte en productos de utilidad, como alimentos para humanos y animales, no obstante, el resto se elimina como material de desecho. Esta eliminación constituye un peligro para el medio ambiente debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de 40,000 a 60,000 ppm además de su alta demanda química de oxígeno (DQO) de 50,000 a 80.000 ppm.

Un método para emplear el suero de leche como fuente de carbono para un proceso fermentativo consiste en hidrolizar la lactosa en sus dos monómeros, glucosa y galactosa. Esto puede realizarse por medio de una hidrólisis enzimática empleando la enzima β -galactosidasa o mediante una hidrólisis ácida. Un segundo método consiste en emplear el suero de leche sin hidrolizar, de forma que el microorganismo consuma directamente la lactosa.

b. Lípidos de desecho

Las corrientes de desechos ricos en lípidos se producen en cantidades considerables cada año en la industria de alimentos, especialmente alimentos provenientes de distintos animales, la industria de aceite comestible y la industria de productos lácteos. Además, existen enormes cantidades de aceites de cocina de desecho y grasas animales disponibles

en todo el mundo, especialmente en los países desarrollados. En los países de la Unión Europea, únicamente la producción total de aceite de cocina de desecho llegó a alcanzar un millardo de litros por año.

El manejo de estas corrientes de aceites y grasas representa una problemática importante debido a la posible contaminación de los recursos hídricos y terrestres en su disposición final.

c. Melaza

Este es el subproducto principal de la industria azucarera. Consiste en una sustancia líquida, altamente espesa que se deriva de materiales ricos en azúcares como la caña de azúcar y le remolacha azucarera. Su composición varía según la fuente y el tipo de refinado. No obstante, generalmente su contenido de azúcar ronda el 50% compuesto predominantemente por sacarosa con menos cantidad de glucosa y fructosa. Asimismo, contiene aproximadamente 4% de proteínas, trazas de calcio, magnesio, potasio y hierro y vitaminas como la B7.

Se estima que de 100 toneladas de caña procesada, se extraen 10 toneladas de sacarosa y 4 toneladas de melaza, por lo que existe un excedente en el mercado en términos de oferta. Si bien la melaza es empleada como complemento alimenticio para el ganado, como fertilizante y como fuente de carbono para la fermentación alcohólica, su potencial para la producción de PHAs también ha sido ampliamente estudiado.

d. Glicerina

La demanda de combustibles derivados de biomasa está aumentando alrededor del mundo debido a las predicciones generadas sobre el agotamiento en las próximas décadas de los recursos fósiles. El biodiésel es uno de varios biocombustibles que están siendo seleccionados como reemplazo del diésel de origen fósil. Este es producido a partir de un aceite vegetal o grasa animal obteniendo glicerina como subproducto principal. Se estima que se obtienen 100 kg de glicerina por cada tonelada de biodiésel fabricado. Por lo que el aumento en la demanda del biodiésel ha generado un excedente de glicerina en un mercado de tamaño limitado. Incluso, este incremento en la oferta ha provocado que varias empresas enfocadas a la producción química de glicerina cesen sus operaciones. En este sentido, su aplicación para la producción de PHAs ha sido considerablemente estudiada,

principalmente por la naturaleza reducida de sus cadenas de carbono. Esto permite que sea empleada en procesos microbiológicos, brindando un posible sustituto ante el azúcar que es normalmente utilizada.

En el Cuadro 3, se muestran los rendimientos obtenidos de distintos tipos de PHAs empleando diversos microorganismos y las fuentes de carbono previamente mencionadas.

Cuadro 3. Rendimiento de PHA empleando distintos microorganismos y fuentes de carbono en un proceso fermentativo

Fuente de carbono	Microorganismo	Tipo de PHA	Rendimiento (g/L)
Suero de leche	<i>Haloferax mediterranei</i>	PHV	14.7
Suero de leche hidrolizado	<i>Bacillus megaterium</i> CCM2307	PHB	0.8
Suero de leche hidrolizado	<i>Pseudomonas hydrogenovora</i>	PHB	1.3
Aceite de cocina usado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2 NCIB40045	PHA (cadena media)	1.5
Aceite para freír usado	<i>Cupriavidus necator</i> H16 NCIMB10442	PHB	1.2
Melaza	<i>Bacillus sp.</i> COLI/A6	PHB	3.3
Melaza	<i>Bacillus megaterium</i>	PHB	3
Glicerina	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	PHB	1.51
Glicerina	<i>Ralstonia eutropha</i> DMS 11348	PHB	0.39

(Nikodinovic-Runic *et al.*, 2013)

6. Impactos ambientales

Los impactos ambientales de la producción de los polihidroxialcanoatos se centran principalmente en los requerimientos energéticos de los equipos y por lo tanto en la emisión de gases de efecto invernadero. Los requerimientos energéticos pueden llegar hasta tres veces mayor que los requerimientos para la producción de plásticos convencionales. No obstante, el beneficio ambiental de los PHAs frente a los plásticos derivados del petróleo radica en la reducción del impacto ambiental relacionado a su disposición final. Si bien los PHAs no presentan la ventaja de ser reciclables como otros plásticos existentes en el mercado, estos sí son biodegradables y por lo tanto su degradación puede alcanzarse por medio de la utilización de compostajes activos. La biodegradabilidad de los PHAs en conjunto con el uso de compostajes activos evita la contaminación a largo plazo de suelos y cuerpos de agua (Naranjo, 2010).

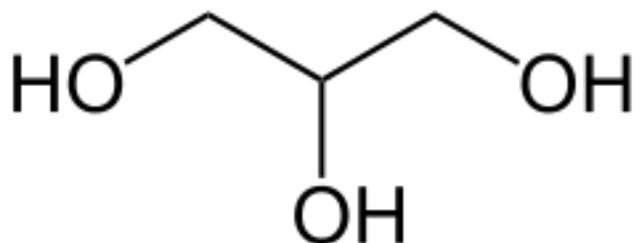
Además, el impacto ambiental generado en el proceso de producción se puede llegar a disminuir integrando el proceso a una biorefinería de manera que el subproducto de una industria se emplee como materia prima para llevar a cabo la fermentación. Además, si se integran técnicas de eficiencia energética y fuentes de energía renovable el impacto se reduce cada vez más (Naranjo, 2010).

C. Glicerina

1. Características generales

El glicerol es un compuesto químico obtenido principalmente como subproducto en la industria oleoquímica, es decir, deriva de grasas vegetales y animales. Por otro lado, la glicerina es el nombre comercial que reciben las mezclas que poseen un alto contenido de glicerol. El glicerol es un alcohol que contiene tres grupos hidroxilos lo cual le confiere diferentes posibilidades de reacción (Polich, 2019).

Figura 6. Estructura del glicerol



(Polich, 2019)

Es un componente estable bajo condiciones típicas de almacenamiento. Posee un grado bajo de toxicidad sobre el medio ambiente y es compatible con diversos productos químicos por lo que es ampliamente utilizado como materia prima. En el Cuadro 4, se presentan las principales propiedades físicas del glicerol.

Cuadro 4. Principales propiedades físicas del glicerol

Propiedad física	Valor
Apariencia	Incoloro
Solubilidad en agua	Soluble
Olor	Ligero
Fórmula molecular	$C_3H_8O_3$
Densidad	1261 kg/m ³
Presión de vapor	0.0025 mmHg a 50°C
Punto de ebullición	290°C
Punto de fusión	17.9°C
Masa molecular	92.1 g/mol

(Polich, 2019)

2. Clasificación

La glicerina puede clasificarse de acuerdo a su calidad en tres grupos principales según la concentración de glicerol que contengan (Polich, 2019):

a. Glicerina cruda

Es el producto que se obtiene de una corriente de salida de un proceso de transesterificación. Este se describe cómo el proceso de intercambio de un grupo radical orgánico de un éster con un grupo radical orgánico de un alcohol. La reacción puede ser catalizada por la adición de un catalizador ácido o básico o bien por medio de enzimas. La glicerina cruda contiene una gran cantidad de metanol, agua, jabones y distintas sales. Normalmente, posee un contenido de glicerol entre 80% (m/m) y 88% (m/m). Esta es obtenida de cuatro industrias principales: la industria del jabón, la industria de los ácidos grasos, la industria del biodiésel y la industria de los ésteres grasos.

b. Glicerina grado técnico

Es el producto de alta pureza ya que la mayoría de sus contaminantes han sido completamente removidos. Por consiguiente, está libre de metanol, agua, jabones, sales y demás componentes extraños. La literatura reporta que su contenido de glicerol no debe ser inferior al 98 % (m/m).

c. Glicerina USP

Este es el producto con mayor concentración de glicerol lo cual le otorga la calidad farmacéutica adecuada para usarla en alimentos, cuidado personal, cosméticos, productos farmacéuticos, entre otras aplicaciones. Esta clasificación exige una concentración de glicerol no menor de 99.7% (m/m) por lo que cumple con las especificaciones de Farmacopea de Estados Unidos (USP) y del Código de Sustancias Químicas para Alimentos (FCC). Además, para ser denominada grado USP, las empresas deben estar estrictamente reguladas en lo que respecta a sus instalaciones de fabricación, métodos de pruebas, inspección, distribución y almacenamiento. Importante recalcar que también las empresas deben seguir las normas y directrices establecidas por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA).

En el Cuadro 5, se presentan las principales especificaciones de calidad y umbrales para los contaminantes que pueden llegar a estar presentes en los distintos tipos de glicerina (Polich, 2019).

Cuadro 5. Especificaciones de calidad para las clasificaciones de la glicerina

Propiedad	Glicerina cruda	Glicerina grado técnico	Glicerina USP
Contenido de glicerol	80% (m/m)- 88% (m/m)	<98% (m/m)	<99.7% (m/m)
Ceniza	>2% (m/m)	N/A	N/A
Contenido de humedad	N/A	>2%(m/m)	>0.3% (m/m)
Cloruros	N/A	>10 ppm	>10ppm
Gravedad específica	N/A	1,262 kg/m ³ a 25°C	<1,262 kg/m ³ a 25 °C
Sulfato	N/A	N/A	>20 ppm
Metales pesados	N/A	>5 ppm	>5 ppm
Componentes clorados	N/A	>30 ppm	>30 ppm
Residuos de ignición	N/A	N/A	>100 ppm
Agua	>12% (m/m)	>5% (m/m)	>0.5% (m/m)
pH (solución 10%)	4-9	4-9.1	N/A
Residuos orgánicos	>2% (m/m)	>2% (m/m)	N/A

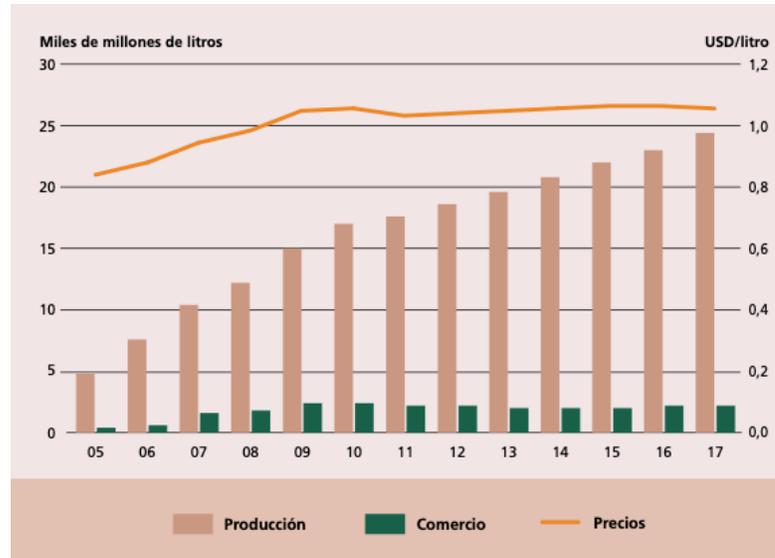
(Polich, 2019)

3. Glicerina cruda del proceso de biodiésel

El petróleo y sus derivados actualmente representan el 35% de la energía total utilizada en el mundo. Alrededor de un 60% de esta fracción es empleado directamente en la industria del transporte. Las limitadas reservas de petróleo, su incremento en precio y el deterioro del medio ambiente ha generado el desarrollo de combustibles más limpios provenientes de fuentes renovables, entre estos se destaca el biodiésel. Su combustión genera emisiones más limpias al medio ambiente por lo que se considera un combustible menos contaminante. Reduce en un 100% las emisiones de dióxido de azufre, en un 48% en monóxido de carbono y en un 47% en material particulado (Naranjo, 2010).

La producción mundial de biodiésel ha aumentado a lo largo de los años y mantiene una tendencia ascendente como se muestra en la Figura 7, por lo que demuestra ser una industria en crecimiento que promete seguir presente en el mercado global de biocombustibles (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008).

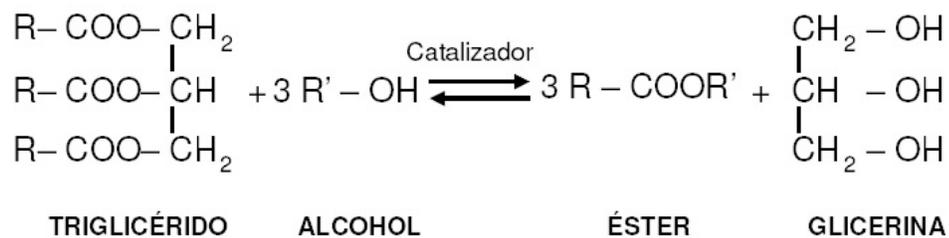
Figura 7. Producción, comercio y precios mundiales de biodiésel hasta el año 2017



(Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008)

El proceso de biodiésel se lleva a cabo a partir de una reacción de transesterificación de triglicéridos, que se encuentran presentes en aceites vegetales o en grasas animales, con un alcohol de bajo peso molecular. Esta es generalmente catalizada ya sea por un medio ácido, un medio básico o empleando una enzima específica como la lipasas. La reacción general de transesterificación se muestra en la Figura 8.

Figura 8. Reacción general de transesterificación de un aceite para la obtención de biodiésel



(Vélez, 2012)

A nivel industrial, la reacción generalmente se lleva a cabo empleando un catalizador básico. Esto, principalmente, porque se llega a tener un tiempo de reacción menor y a condiciones de operación moderadas, ya que el grupo carbonilo del triglicérido no necesita protonarse y no es necesario proporcionar energía al sistema por un tiempo prolongado para favorecer la reacción. Entre los catalizadores básicos más empleados se destacan las bases fuertes como el hidróxido de sodio y el hidróxido de potasio (Castellar Ortega *et al.*, 2014).

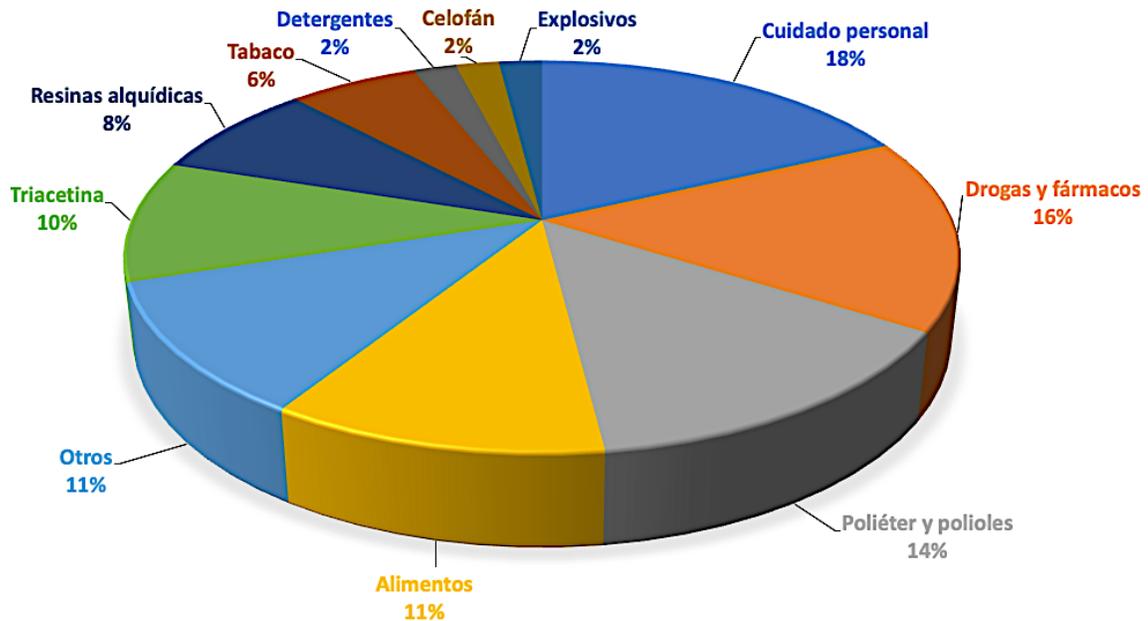
De la misma manera, es importante notar que la reacción de transesterificación catalizada por un medio básico puede resultar en una reacción secundaria de saponificación y en la formación de jabones y glicerina como subproducto. Para evitar esta reacción no deseada se deben emplear aceites y alcoholes esencialmente anhidros. En este sentido, se recomienda llevar a cabo una evaporación inicial de los aceites previo a comenzar la reacción (Castellar Ortega *et al.*, 2014).

Por otro lado, se destaca la adición del alcohol en exceso para favorecer la formación de productos en la reacción. Dentro de los alcoholes más empleados se encuentra el metanol y el etanol, aunque también se puede hacer uso de propanol, butanol, *iso*-propanol, entre otros (Castellar Ortega *et al.*, 2014).

4. Aplicación industrial

Las principales aplicaciones de glicerina se destacan en la industria del cuidado personal así como en la producción de drogas y fármacos. Otros usos relevantes de la glicerina se resumen en la Figura 9, que representa el mercado del glicerol en composiciones volumétricas.

Figura 9. Composición general del mercado de glicerina.



Adaptado de Posadas y Cardona (2010).

D. Fermentación microbiana

1. Generalidades

Se da lugar a una fermentación microbiana en un ambiente biológicamente activo, en donde por medio de una serie de reacciones se efectúa la conversión de materia prima orgánica en productos bioquímicos útiles y, generalmente, en subproductos indeseables por la acción de microorganismos. El producto deseado puede consistir en biomasa celular, metabolitos específicos o en productos de bioconversión (Blanch & Clark, 1997).

2. Tipos de reactores

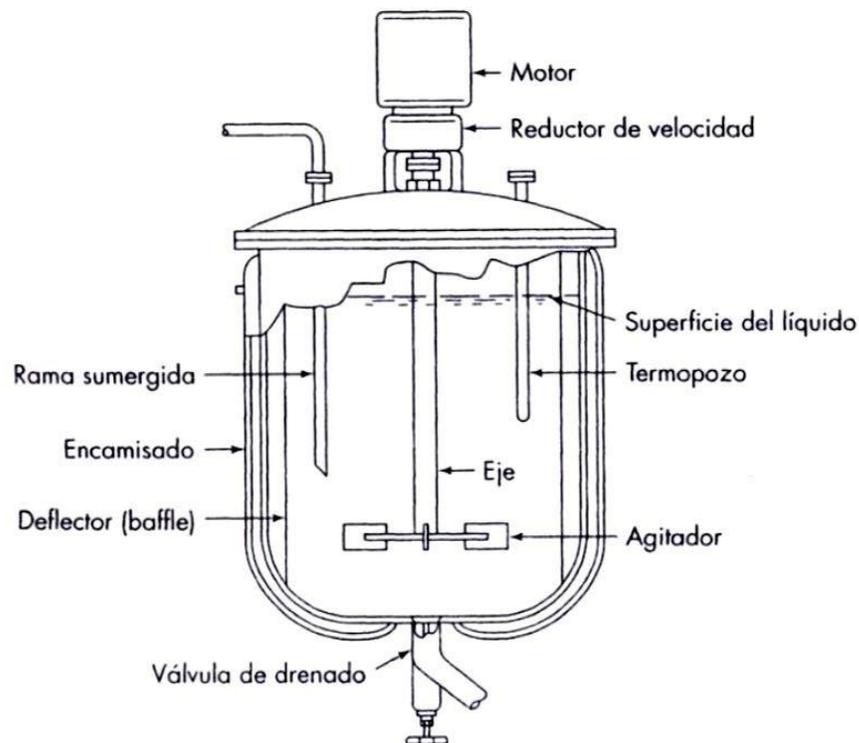
La función básica de un biorreactor, equipo diseñado y utilizado en las fermentaciones microbianas, consiste en proporcionar el entorno adecuado para el microorganismo de manera que produzca eficientemente el producto deseado. Los biorreactores varían en tamaño y complejidad; existen desde pequeños recipientes con control de agitación y temperatura hasta recipientes grandes más elaborados equipados con diversos controles de operación altamente precisos y automatizados. De manera general, los biorreactores pueden ser del tipo cerrado o del tipo abierto. Un sistema cerrado implica

que todos los compuestos requeridos por el sistema se añaden al principio del proceso fermentativo; un proceso por lotes se lleva a cabo empleando un biorreactor cerrado. De manera contraria, un proceso abierto es aquel que posee flujos de entrada y flujos de salida; un proceso continuo se lleva a cabo empleando un biorreactor abierto. Se destacan tres tipos principales de reactores (Blanch & Clark, 1997):

a. Reactor STR

Por sus siglas en inglés, *Stirred Tank Reactor*, es un reactor cerrado que se opera por lotes a las condiciones requeridas por el proceso fermentativo. La carencia de entradas y salidas en el sistema genera que las concentraciones del sistema fluctúen con respecto al tiempo. Se busca, generalmente, que su operación se efectúe de manera isotérmica por medio de la incorporación de agitación constante. De igual forma, se busca operar a volumen constante.

Figura 10. Reactor STR

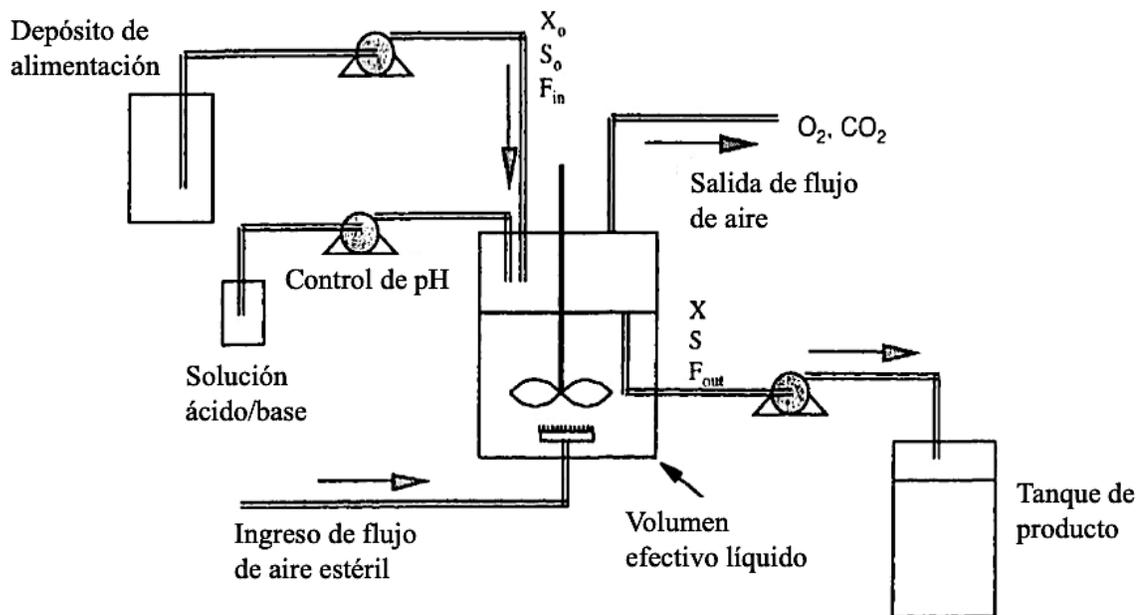


(Rolón-Ortiz *et al.*, 2019)

b. Reactor CSTR

Por sus siglas en inglés, *Continuous Stirred Tank Reactor*, es un reactor abierto de opera de manera continua. Debido a las corrientes de entrada y de salida presentes en el sistema, este equipo opera a su concentración de salida. En la siguiente Figura se muestra un esquema general de este tipo de reactor en dónde X representa la biomasa, S el sustrato y F el flujo de nutrientes.

Figura 11. Reactor CSTR.

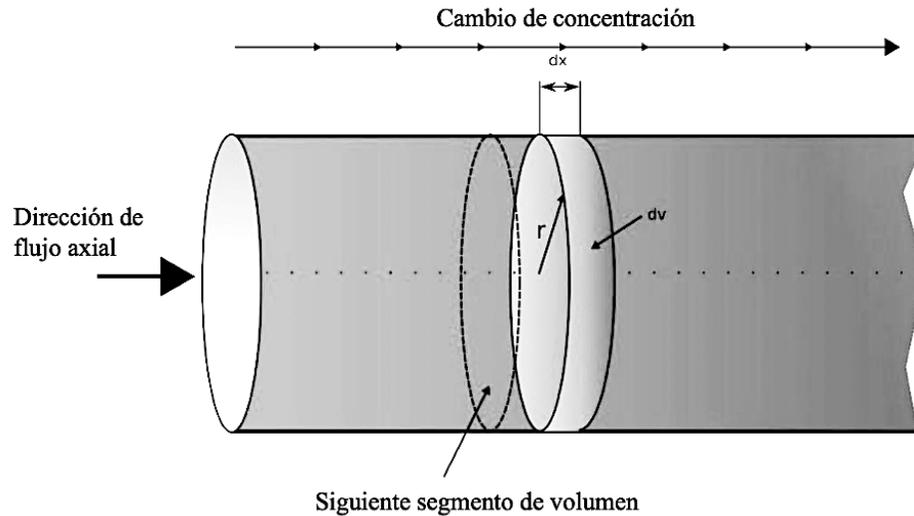


Adaptado de Blanch & Clark (1997)

c. Reactor PFR

Por sus siglas en inglés, *Plug Flow Reactor*, es un reactor abierto de opera de manera continua. El equipo consiste en una serie de tuberías continuas en donde la concentración cambia de manera diferencial, dx , a lo largo del trayecto como se muestra en la siguiente figura:

Figura 12. Reactor PFR.



Adaptado de Schmidt (1998)

3. Escalamiento

Los procesos de fermentación microbiana representan un pieza crucial en diversas aplicaciones a escala industrial. La mayoría de sus aplicaciones radican en la investigación y exploración para producir un producto final, convertir sustratos específicos, catalizar reacciones o simplemente fabricar materiales biológicos en masa. Estas, generalmente, se realizan a escala laboratorio con el fin de explorar condiciones de fermentación, rendimientos, viabilidades técnicas, entre otros aspectos, empleando flujos pequeños de material y demás servicios auxiliares que se requieran con el propósito de minimizar los costos de la investigación (Yang, 2014).

El escalamiento de un proceso fermentativo de una menor escala a una mayor es una actividad crítica ya que permite que una fermentación específica realizada a partir de una exploración técnica opere a una escala comercialmente viable, obteniendo rendimientos altamente similares (Yang, 2014).

La fermentación escalonada debe demostrarse con un cierto número de ciclos para mantener la coherencia y la importancia estadística. Para esto, se consideran los siguientes parámetros (Yang, 2014):

a. Temperatura

La temperatura debe mantenerse en todas las escalas. Al operar a escalas mayores, se debe considerar el tiempo de mezclado, las resistencias presentes a la transferencia de calor y la precisión de los sistemas de control para alcanzar y mantener la temperatura requerida.

b. pH

El pH debe de mantenerse constante en todas las escalas. Esto, generalmente, se realiza por medio de un suministro automatizado de una solución ácida y una solución básica.

c. Oxígeno disuelto

El nivel de oxígeno disuelto en el medio para fermentaciones aerobias debe ser el mismo en todas las escalas. Para esto, se requiere un mecanismo automatizado de medición de oxígeno disuelto a lo largo del tiempo del proceso. La automatización permite controlar este parámetro modificando otras variables como la agitación, la presión del sistema o incluso el flujo de aire.

d. Flujo de aire

Este parámetro al ser escalado debe aumentarse mediante una tasa de flujo de aire definida por volumen efectivo de caldo de fermentación. Es decir, si se emplea un flujo de aire de 0.2 L/min para una fermentación con un volumen efectivo de 1L, para una fermentación con un volumen de 100L, el flujo de aire a utilizar es de 20 L/min para mantener la proporción. Se debe de considerar incorporar un control de flujo másico en el sistema para cuantificar de manera más precisa el flujo de aire, ya que las lecturas de caudal pueden generar discrepancias entre escalas debido a la diferencia en la geometría de los equipos.

e. Concentración de nutrientes

Este parámetro se mantiene al operar a una escala mayor. Generalmente se trabaja la concentración de nutrientes en unidades de masa por unidad de volumen, en este sentido, si se opera a un volumen mayor, la cantidad de nutriente en el medio debe aumentarse para mantener la misma concentración.

f. Agitación

Este parámetro debe ser evaluado para su escalamiento. Se debe tomar en cuenta el valor de entrada de potencia de la agitación, la velocidad de agitación la densidad del medio y el diámetro del impulsor para determinar el valor de escalamiento de este parámetro.

La evaluación de un proceso de escalamiento se realiza por medio del análisis de los siguientes parámetros (Yang, 2014):

g. Tasa de formación de producto

El rendimiento a una mayor escala debe presentar valores similares al rendimiento obtenido a una menor escala. Además, la tendencia a lo largo del tiempo de la reacción debe presentar el mismo comportamiento en distintas escalas.

h. Perfil de crecimiento celular

Tanto el perfil de crecimiento celular cómo la tasa de consumo de nutrientes deben de ser comparables a lo largo del tiempo de fermentación en distintas escalas.

i. Calidad del producto

El producto debe presentar calidad similar en ambas escalas por lo que los procesos de purificación deben ser incorporados en este análisis.

4. Fenómenos de transporte

Los reactores bioquímicos se utilizan ampliamente en distintas industrias. Independientemente de su aplicación, prácticamente en todas las reacciones intervienen varias fases por lo que la transferencia del sustrato y de los nutrientes deben transferirse efectivamente de una fase a otra. En este sentido, la transferencia de masa y calor en las interfaces debe ocurrir en determinado grado para lograr la conversión deseada de reactivos en productos o para suministrar suficientes nutrientes para el mantenimiento y funcionalidad del microorganismo (Blanch & Clark, 1997).

Uno de los nutrientes clave para el crecimiento y funcionalidad de una amplia gama de bacterias aeróbicas es el oxígeno, el cual es escasamente soluble en agua. Por lo tanto, el suministro de oxígeno proveniente de la fase gaseosa hacia la fase líquida es fundamental en la mayoría de fermentaciones aeróbicas (Blanch & Clark, 1997).

a. Transferencia de masa gas-líquido

La resistencia a la transferencia de masa entre la fase gaseosa y la fase líquida puede encontrarse en ocho posibles ubicaciones:

- (1) Película de gas
- (2) Interfaz gas-líquido
- (3) Película líquida que rodea la interfaz del gas
- (4) Fase líquida
- (5) Película líquida que rodea al sólido (microorganismo)
- (6) Interfaz líquido-sólido
- (7) Fase sólida (microorganismo)
- (8) Sitio de reacción (interior del microorganismo)

No obstante, se pueden eliminar algunas de estas resistencias para modelar de manera más sencilla el sistema. Dado que las difusividades de masa en fase gaseosa son típicamente mucho más altas que las difusividades en fase líquida, la resistencia de la película de gas dentro de la burbuja (1) puede despreciarse. Se entiende como difusividad el resultado del desplazamiento de moléculas individuales a través de un fluido debido a sus movimientos naturales y desordenados provocados por un gradiente de concentración. De manera similar, la resistencia en la interfaz gas-líquido (2) y la resistencia en la interfaz líquido-sólido (6) pueden despreciarse por ser pequeñas. Si se asume que la solución en el reactor se encuentra relativamente homogéneo se puede despreciar la resistencia en la fase líquida (4). Es importante notar entonces, que para microorganismos de gran tamaño, cómo el *Bacillus megaterium*, la resistencia dominante será la película líquida que rodea al microorganismo (5) ya que el área superficial expuesta es menor en comparación a una bacteria de menor tamaño.

La reología, la ciencia que estudia la deformación y el flujo de los materiales, de un sistema gas-líquido tiene una fuerte influencia en la transferencia de masa. Para un líquido que presenta baja viscosidad, una agitación moderada genera un líquido relativamente homogéneo sin problema y la transferencia de masa ocurre de manera eficiente. No

obstante, en un líquido viscoso, la misma agitación produce un mezclado menos eficiente donde existen zonas de fluido estancado y, por consiguiente, un líquido heterogéneo donde la transferencia de masa se dificulta. Asimismo, una alta viscosidad incluye en la velocidad de la burbuja de gas y en la velocidad del microorganismo a través de la fase líquida, por lo que las resistencias de la película líquida se incrementan. De la misma manera, la reología afecta directamente la transferencia de calor del sistema ya que un fluido con una alta viscosidad presentará una mayor resistencia a la transferencia de calor que un fluido con baja viscosidad.

Igualmente, es conveniente considerar que la presencia de sales y solutos orgánicos disminuye la solubilidad de gases poco solubles en el medio, como el oxígeno. Este comportamiento se conoce cómo precipitación salina.

E. Cinética de crecimiento celular

1. Fases de crecimiento celular

En un reactor por lotes que contiene un medio de cultivo fresco y que es inoculado con células microbianas en dónde se lleva a cabo un control de la concentración de los microorganismos con el tiempo, se pueden observar las siguientes distintas fases de crecimiento microbiano (Blanch & Clark, 1997) :

a. Fase de adaptación

Conocida también cómo fase lag o latencia, se refiere a un crecimiento microbiano inicial estancado. Esta ocurre principalmente por el transporte de cofactores, aminoácidos e iones intracelulares a través de la membrana celular y hacia el medio fresco de cultivo. Esto provoca que su concentración interna disminuya apreciablemente. Debido a que estos elementos son los responsables de habilitar la actividad enzimática de las células, la pérdida de los mismos genera una disminución en la velocidad a la que operan las distintas rutas metabólicas del microorganismo. En este sentido, las células deben metabolizar las fuentes de carbono disponibles en el medio de cultivo para reponer las reservas intracelulares, antes de iniciar la división celular, provocando un retraso en su reproducción.

Esta fase presenta una duración variable dependiendo de la historia del cultivo y las condiciones de crecimiento. De manera similar, si el inóculo se cultiva en un medio que

contiene una fuente de carbono diferente, es posible que el microorganismo se vea en la necesidad de inducir nuevas enzimas para metabolizar el nuevo sustrato y esto también contribuirá a un retraso en su reproducción. Asimismo, un regazo puede ocurrir cuando el inóculo esta compuesto por células que han sido dañadas por tratamiento con calor, radiación o sustancias químicas tóxicas por lo que se da un tiempo determinado en dónde las células reparan el daño previo a su reproducción.

El punto del ciclo de crecimiento del que se derivó el inóculo también es importante. Las células tomadas de la fase exponencial y utilizadas como inóculo generalmente muestran una fase de retardo más corta que las tomadas de fases posteriores. De la misma manera, si se coloca un inóculo en un medio rico en aminoácidos y otras fuentes complejas de carbono y nitrógeno, se producirá una fase de retardo más corta, ya que los mismos funcionan cómo intermediarios en el metabolismo del microorganismo.

b. Fase de aceleración

Se comienza a ver un incremento en el número total de células en el medio y la velocidad de división celular comienza a aumentar.

c. Fase exponencial

En esta fase, cada célula se divide para formar dos células, de las cuales cada una también se divide para formar dos células más y así sucesivamente. Se caracteriza principalmente por presentar de manera constante la velocidad de división celular máxima y por presentar de manera constante el tiempo de generación, es decir el tiempo necesario para que aparezca una nueva generación de células, más corto. Por lo general, las células exhiben su estado más saludable durante esta fase.

Ecuación 1. Velocidad de crecimiento celular

$$r_N = \frac{dC_N}{dt} = \mu * C_N$$

Donde μ corresponde a la velocidad de crecimiento específica de crecimiento celular expresada en unidades de $[T^{-1}]$ y C_N a la concentración celular en determinado instante de tiempo del crecimiento.

Ecuación 2. Velocidad específica de crecimiento celular

$$\mu = \frac{1}{C_N} * \frac{dC_N}{dt} = \frac{d \ln C_N}{dt}$$

La velocidad de crecimiento exponencial está influenciada por las condiciones ambientales como la temperatura, composición del medio de cultivo y las características genéticas del microorganismo.

d. Fase de desaceleración

Consiste en una fase corta de crecimiento decreciente, donde la velocidad de crecimiento celular se reduce y el tiempo de generación se aumenta.

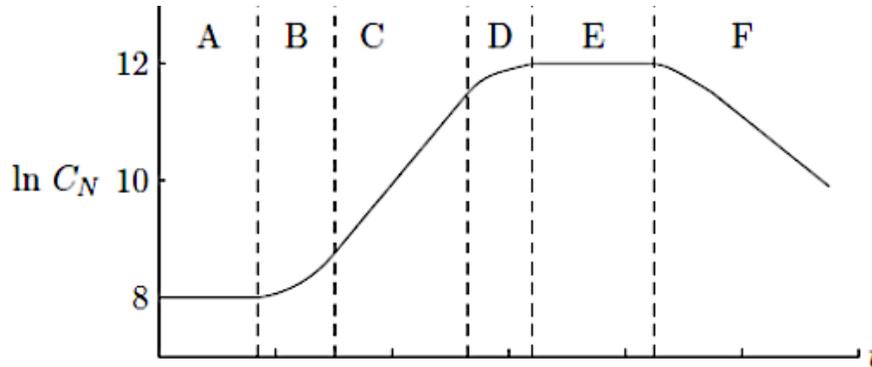
e. Fase estacionaria

No se presenta un aumento o una disminución neta del número total de células en el medio. Algunas células en la población continúan con su crecimiento pero algunas comienzan a morir, por lo que el efecto neto presentado es una concentración global de células relativamente constante. Es importante notar que en esta fase las funciones celulares pueden continuar, incluyendo metabolismos energéticos y algunos procesos biosintéticos. No obstante, el crecimiento celular se ve limitado por el consumo de un nutriente esencial en el medio o por la inhibición del crecimiento por parte de un producto de desecho del microorganismo.

f. Fase de muerte

El número total de células presentes en el medio comienza a descender ya que comienzan a morir. Se recalca que este comportamiento se da también de forma exponencial aunque de manera más lenta que la fase de crecimiento exponencial.

Figura 13. Fases de crecimiento típicas de un microorganismo en un reactor por lotes:
 (A) fase de adaptación; (B) fase de aceleración; (C) fase exponencial; (D) fase de
 desaceleración; (E) fase estacionaria; (F) fase de muerte



(Blanch & Clark, 1997)

2. Modelo de Monod

Es uno de los modelos cinéticos matemáticos más simples. Incorpora el efecto de la concentración de sustrato, C_s , en la velocidad específica de crecimiento celular. Fue desarrollado por Jacques Monod basado en observaciones del crecimiento de *E. coli* a diversas concentraciones de glucosa. Este modelo contempla que la determinación del comportamiento de un solo sustrato es suficiente para determinar la velocidad de crecimiento celular. Además, se basa en la suposición que todos aquellos inhibidores del crecimiento se encuentran a bajas concentraciones en el medio. El modelo se presenta de la siguiente manera (Blanch & Clark, 1997):

Ecuación 3. Expresión matemática del modelo de Monod

$$\mu = \frac{\mu_{\max} * C_s}{K_s + C_s}$$

(Blanch & Clark, 1997)

Donde, K_s es un parámetro cinético que representa la constante de Monod que también es conocida como la constante de afinidad al sustrato. Entre más pequeño sea el valor de K_s , mayor afinidad presenta el microorganismo por el sustrato empleado. Además, μ_{\max} corresponde un segundo parámetro cinético de la expresión y representa la velocidad

máxima específica de crecimiento. El vínculo generado por el modelo de Monod relaciona linealmente el coeficiente de rendimiento, Y_{xs} , una medida de la eficiencia de conversión de un sustrato a material celular, con la velocidad específica de crecimiento celular. Por lo tanto, a medida que aumenta la concentración del sustrato, aumenta la velocidad específica de crecimiento celular. La relación se presenta a continuación:

Ecuación 4. Relación entre el crecimiento celular y el consumo de sustrato establecida por el modelo de Monod

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} * \frac{C_s}{K_s + C_s} * C_n$$

Donde:

$$Y_{xs} = \frac{dX}{dS}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{\max}}{Y_{xs}} * \frac{C_s}{K_s + C_s} * C_n$$

(Blanch & Clark, 1997)

Asimismo, es importante notar que para altas concentraciones de sustrato, $C_s \gg K_s$, el modelo de Monod es reducido a la siguiente expresión de orden cero:

Ecuación 5. Expresión matemática del modelo de Monod reducida a orden cero

$$\mu = \mu_{\max}$$

(Blanch & Clark, 1997)

Por el contrario, a bajas concentraciones de sustrato, $C_s \ll K_s$, el modelo es reducido a la siguiente expresión de primer orden:

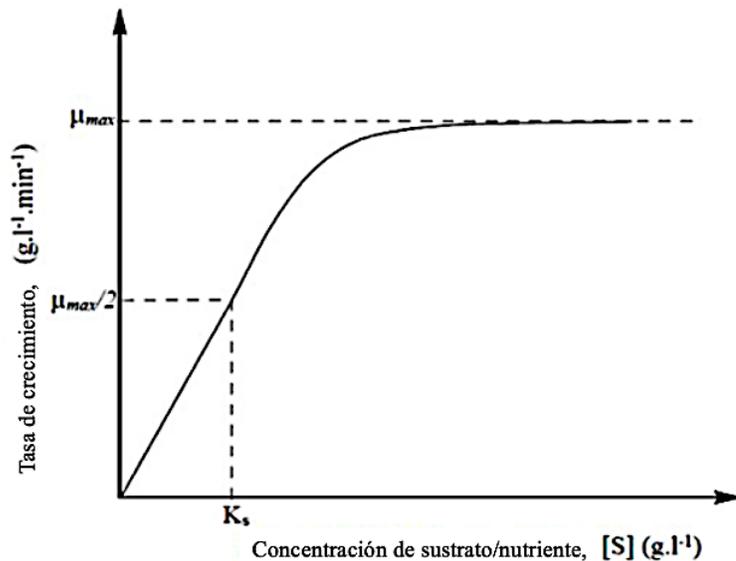
Ecuación 6. Expresión matemática del modelo de Monod reducida a primer orden

$$\mu = \frac{\mu_{\max} * C_s}{K_s}$$

(Blanch & Clark, 1997)

La dependencia de la velocidad específica de crecimiento celular con la concentración de sustrato se representa en la Figura 11 de la cual se observa que el valor de la constante de Monod, K_s , se encuentra cuando $\mu = \frac{1}{2} * \mu_{max}$.

Figura 14. Dependencia de la velocidad específica de crecimiento celular con la concentración de sustrato.



Adaptado de Blanch & Clark, (1997)

3. Rendimientos específicos

Se pueden emplear rendimientos específicos como indicadores generales de las fermentaciones microbianas. Estos relacionan la cantidad de células y productos formados por unidad de sustrato consumido por las células. El conocimiento de estos rendimientos permite modificar y formular el medio de crecimiento de manera que se analice el suministro de nutrientes como la limitante para la tasa de crecimiento y de formación de producto. Asimismo, se pueden emplear relaciones por unidad de células formadas. Se denota al rendimiento como Y y se definen los siguientes tipos más relevantes (Blanch & Clark, 1997):

Ecuación 7. Rendimiento específico de producto con respecto al sustrato

$$Y_{ps} = \frac{\text{masa de producto formado}}{\text{masa de sustrato consumido}}$$

(Blanch & Clark, 1997)

Ecuación 8. Rendimiento específico de biomasa con respecto a sustrato

$$Y_{ps} = \frac{\text{masa de biomasa formada}}{\text{masa de sustrato consumido}}$$

(Blanch & Clark, 1997)

Ecuación 9. Rendimiento específico de producto con respecto a biomasa

$$Y_{ps} = \frac{\text{masa de producto formado}}{\text{masa de biomasa formada}}$$

(Blanch & Clark, 1997)

4. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción

La ecuación de Arrhenius permite expresar la dependencia de la velocidad de reacción con respecto a la temperatura de la siguiente manera (Blanch & Clark, 1997):

Ecuación 10. Ley de Arrhenius

$$k = k_0 e^{-E/RT}$$

(Blanch & Clark, 1997)

Donde k es la constante cinética de reacción, k_0 es el factor de frecuencia, E la energía de activación de la reacción, R la constante de los gases ideales y T la temperatura. El fundamento de esta relación se basa en que la transformación de reactivos a productos se da a partir de la adición de una mínima cantidad de energía, también conocida como la energía de activación (Blanch & Clark, 1997).

5. Berkeley Madonna

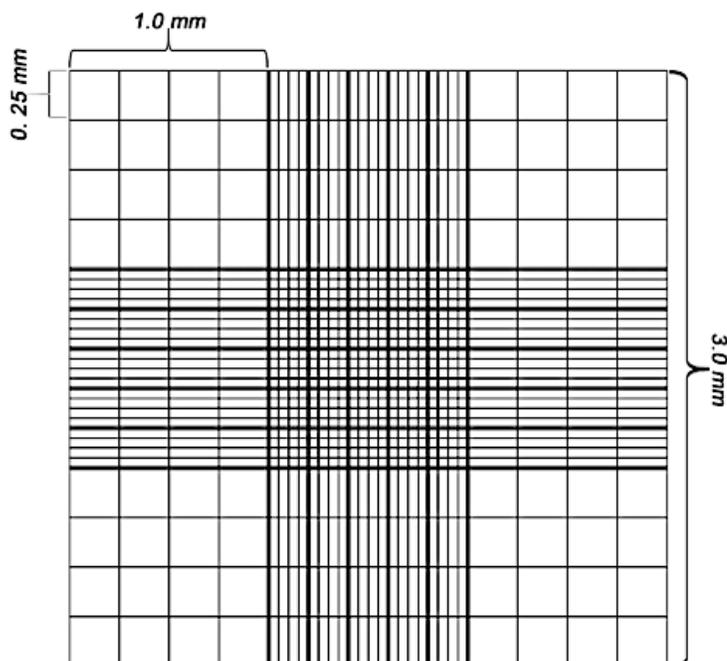
Berkeley Madonna es un software que proporciona la solución de ecuaciones diferenciales de manera instantánea. Además, posee un modelo gráfico que permite la construcción de modelos matemáticos completos con facilidad, empleando símbolos en lugar de ecuaciones escritas. Posee una interfaz intuitiva, una excelente visualización y una ejecución rápida donde el usuario puede crear controles deslizantes para explorar la influencia de parámetros cambiantes y extraer estimaciones certeras con la interfaz de ajuste de curvas (Berkeley Madonna, 2021).

F. Análisis químico

1. Cuantificación de población celular

La cuantificación de microorganismos en un sistema se puede realizar por medio de conteo celular empleando una cámara de recuento conocida como la cámara de Neubauer. Este es un dispositivo de precisión fabricado de vidrio óptico el cual se emplea para el conteo de células u otras partículas en suspensión con una altura de 0.1 mm bajo un microscopio. El recuento se puede realizar tanto en el cuadrado central como en los cuadrados de las esquinas de la cámara (FES Zaragoza, 2018).

Figura 15. Placa cuadriculada visible en una cámara de Neubauer



(FES Zaragoza, 2018)

2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia de absorción mide la cantidad de luz que absorbe un compuesto como una función de la longitud de onda de la luz. Para el efecto de lo anterior, se utiliza un espectrómetro, el cual irradia la muestra con luz y mide la cantidad de luz transferida en función de la longitud de onda y genera una gráfica con los resultados. Dentro de las principales técnicas espectroscópicas, se destaca la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, la cual se define como la medida de la interacción de la radiación infrarroja con la materia con el fin de estudiar e identificar grupos funcionales presentes. Esta última permite una mejor resolución de los espectros y, asimismo, presenta mayor sensibilidad en comparación con otras técnicas (Wade *et al.*, 2017).

3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

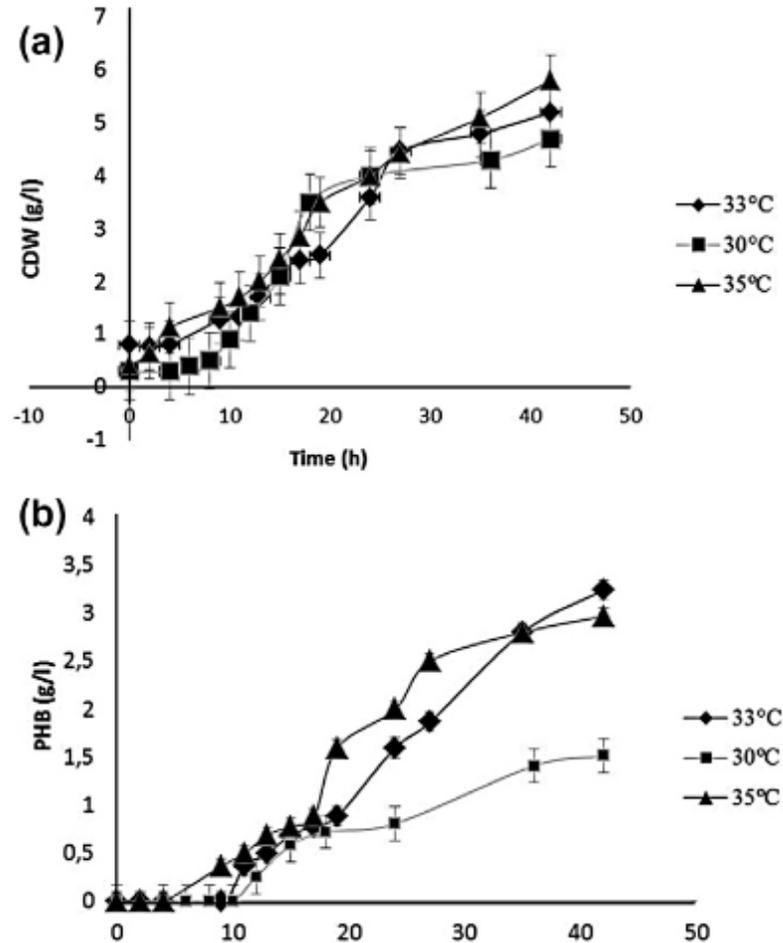
Es una técnica de separación de mezclas compuestas por productos poco volátiles ampliamente conocida. Se toma una muestra de la mezcla y se introduce en el puerto de inyección del equipo donde es arrastrada por una fase móvil específica hacia una columna de cromatografía. La interacción de los compuestos con la naturaleza de la fase móvil

genera la separación de los componentes para su posterior detección, caracterización y cuantificación empleando detectores específicos. La combinación de diversas fases móvil y detectores específicos habilitan la posibilidad de analizar una amplia gama de compuestos (UAB, 2016).

V. Antecedentes

En 2013 se realizó un estudio por Naranjo *et al.* (2013) en la Universidad Nacional de Colombia dónde se evaluó la valorización de la glicerina mediante la producción de PHB empleando *Bacillus megaterium* como cepa fermentadora. Esta última se caracterizó por ser una cepa silvestre la cual fue aislada de sedimentos superficiales del Estuario de Bahía Blanca en Buenos Aires, Argentina. Se analizó glucosa y glicerina como fuentes de carbono para el proceso fermentativo empleando un biorreactor de 3.7 L con un volumen efectivo de operación de 1.5 L. Se analizaron y compararon las siguientes variables de operación: concentración inicial de sustrato, temperatura de fermentación, pH y concentración de oxígeno disuelto. Se trabajó con una concentración inicial de glicerina de (10, 20 y 50) g/L y de glucosa de 20 g/L, además de una temperatura de 30 °C, 33 °C y 35 °C y una saturación de oxígeno de 30%, 60% y 80% por medio del control automatizado de la agitación del equipo empleando un flujo de aire constante de 12 L/min. Además, se trabajó con un pH de 5, 7 y 9 a través de la utilización de una solución 1N de hidróxido de sodio y una solución 1M de ácido sulfúrico. Se obtuvo una mayor producción de PHB de 3.4 g/L empleando el siguiente sistema: concentración inicial de glicerina de 20 g/L, temperatura de 33 °C, agitación constante de 200 rpm, flujo de aire de 12 L/min y condiciones no controladas de pH y saturación de oxígeno. Los resultados se muestran en la siguiente figura:

Figura 16. Comparación de biomasa y PHB obtenido a partir de la fermentación de 20 g/L de glicerina inicial empleando *Bacillus megaterium* a distintas temperaturas de operación



(Naranjo *et al.*, 2013)

El estudio además del análisis técnico, efectuó un análisis económico donde se comparó glucosa y glicerina como fuente de carbono para el proceso fermentativo. Se obtuvieron los costos totales de ambos sustratos a escala industrial; en comparación con la glucosa, la glicerina mostró una disminución de 10% y 20% en los costos totales de producción de PHB empleando dos esquemas de separación y purificación distintos. Además, se resalta que un margen de ganancia del 20% en el precio de venta del PHB utilizando glicerina como fuente de carbono resultó en una valorización de 166% de glicerina cruda.

VI. Metodología

El diseño experimental empleado para el desarrollo de la metodología descrita a continuación se basó en un diseño experimental comparativo por medio de la modificación de una variable, siendo esta el flujo de aire en el sistema fermentativo. Además, se efectuó el estudio por medio de un experimento confirmatorio en donde se empleó como referencia las condiciones planteadas y los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Naranjo *et al.* (2013) en la Universidad Nacional de Colombia y, por consiguiente, la precisión deseada del experimento se dictó por la tendencia obtenida en esta referencia experimental. Dado que el incremento en las replicaciones no reduce el error de la varianza, medida de dispersión de los datos con respecto a su valor promedio, pero sí mejora la precisión de las estimaciones, el incremento en las replicaciones para este diseño experimental se justifica únicamente si la precisión deseada no es obtenida. En este sentido, como se detalla en el apartado de resultados, los resultados obtenidos a partir de la metodología planteada fueron los esperados en comparación con la referencia por lo que el estudio comparativo de una variable se realizó por medio de una corrida para cada sistema planteado. Adicionalmente, cabe resaltar que la sección C del presente apartado corresponde a un estudio intermedio y complementario para efectuar la experimentación central. Esta fue desarrollada utilizando como base nuevamente la referencia experimental previamente mencionada por lo que el análisis comparativo para esta sección se llevó a cabo para siete valores distintos correspondientes a la variable de concentración inicial de sustrato.

Referirse a la sección 3 del apartado de anexos para los datos de los reactivos y equipos empleados en los distintos procedimientos descritos a continuación.

- A. Propagación de *Bacillus megaterium* ATCC 14581.
1. Propagación primaria de *Bacillus megaterium* ATCC 14581.
 - a. Pesar con una espátula analítica 3.45 g de agar nutritivo en una balanza analítica, empleando papel parafinado.
 - b. Medir 150 mL de agua destilada con una probeta de 100 mL.
 - c. Introducir el agar nutritivo y el agua a un Erlenmeyer de 250 mL.
 - d. Posicionar el Erlenmeyer en una estufa con agitación e introducir un agitador magnético.
 - e. Encender la agitación de la estufa a 150 rpm.
 - f. Calentar la solución hasta el punto de ebullición, asegurando que se disuelvan todos los sólidos.
 - g. Permitir el calentamiento por 1 min adicional a partir de este punto.
 - h. Apagar el calentamiento y la agitación de la estufa y remover el Erlenmeyer.
 - i. Tapar la boquilla del Erlenmeyer con papel aluminio y hacer un pequeño agujero en la parte superior para liberar presión durante la esterilización.
 - j. Encender la autoclave e introducir agua tratada hasta el nivel indicado por el equipo.
 - k. Introducir el Erlenmeyer a la autoclave.
 - l. Configurar la temperatura a 121 °C.
 - m. Comenzar esterilización.
 - n. Liberar presión en el equipo abriendo en la válvula de salida de vapor por 3 s cuando la temperatura alcance una temperatura entre 95 °C y 99 °C.
 - o. Permitir la esterilización por 15 min cuando la temperatura alcance 121 °C.

- p. Apagar la autoclave, remover el Erlenmeyer empleando guantes resistentes al calor y permitir que la solución se enfríe entre 7 min y 10 min. El tiempo de enfriamiento debe ser lo suficientemente corto como para no permitir que la solución se comience a solidificar.
 - q. Desinfectar la superficie de trabajo con etanol 70% (v/v) y posicionar la cantidad de mecheros de alcohol requeridos para mantener las placas Petri estériles. Ocupar entre 4 y 6 cajas por mechero.
 - r. Encender los mecheros empleando un encendedor comercial.
 - s. Verter la solución del Erlenmeyer en placas Petri de plástico estériles hasta llenarlas a la mitad de su capacidad.
 - t. Colocar las tapas de las cajas Petri sin permitir su cierre completo para permitir que se enfríe la solución hasta temperatura ambiente.
 - u. Desinfectar área de trabajo en campana de extracción con etanol 70% (v/v) y posicionar y encender mecheros nuevamente.
 - v. Destapar el paquete que contiene el recipiente del hisopo del microorganismo *Bacillus megaterium* ATCC 14581.
 - w. Aplicar presión en la parte superior del recipiente que contiene el hisopo para liberar el contenido.
 - x. Frotar el hisopo asegurando que tenga contacto con el contenido liberado.
 - y. Propagar el microorganismo en las placas Petri realizando estrías con el hisopo sobre la superficie del agar sólido y cerrarlas completamente con su tapadera.
 - z. Introducir las placas Petri en una incubadora a 33 °C por 24 h.
 - aa. Sacar las placas Petri de la incubadora, sellarlas con papel Parafilm, envolverlas en papel aluminio, rotularlas e ingresarlas al refrigerador para su conservación.
2. Propagación secundaria de *Bacillus megaterium* ATCC 14581.

- a. Pesar con una espátula analítica 9.2 g de agar nutritivo en una balanza analítica, empleando papel parafinado.
- b. Medir 400 mL de agua destilada con una probeta de 100 mL.
- c. Introducir el agar nutritivo y el agua a un Erlenmeyer de 1000 mL.
- d. Posicionar el Erlenmeyer en una estufa con agitación e introducir un agitador magnético.
- e. Encender la agitación de la estufa a 150 rpm.
- f. Calentar la solución hasta el punto de ebullición, asegurando que se disuelvan todos los sólidos.
- g. Permitir el calentamiento por 1 min adicional a partir de este punto.
- h. Apagar el calentamiento y la agitación de la estufa y remover el Erlenmeyer.
- i. Tapar la boquilla del Erlenmeyer con papel aluminio y hacer un pequeño agujero en la parte superior para liberar presión durante la esterilización.
- j. Encender la autoclave e introducir agua tratada hasta el nivel indicado por el equipo.
- k. Introducir el Erlenmeyer a la autoclave.
- l. Configurar la temperatura a 121 °C.
- m. Comenzar esterilización.
- n. Liberar presión en el equipo abriendo en la válvula de salida de vapor por 3 s cuando la temperatura alcance una temperatura entre 95 °C y 99 °C.
- o. Permitir la esterilización por 15 min cuando la temperatura alcance 121 °C.
- p. Apagar la autoclave, remover el Erlenmeyer empleando guantes resistentes al calor.
- q. Permitir que la solución se enfríe entre 7 min y 10 min. El tiempo de enfriamiento debe ser lo suficientemente corto como para no permitir que la solución se comience a solidificar.

- r. Desinfectar la superficie de trabajo con etanol 70% (v/v) y posicionar la cantidad de mecheros de alcohol requeridos para mantener las placas Petri estériles. Ocupar entre 4 y 6 cajas por mechero.
- s. Encender los mecheros empleando un encendedor comercial.
- t. Verter la solución del Erlenmeyer en placas Petri de plástico estériles hasta llenarlas a la mitad de su capacidad.
- u. Colocar las tapas de las cajas Petri sin permitir su cierre completo para permitir que se enfríe la solución hasta temperatura ambiente.
- v. Desinfectar área de trabajo en campana de extracción con etanol 70% (v/v) y posicionar y encender mecheros nuevamente.
- w. Colocar el extremo de un aza en el mechero hasta observar que la misma se torne color rojo.
- x. Remover del mechero pero colocarla cerca del mismo para que se enfríe sin contaminarse.
- y. Tomar con el aza estéril una colonia de una placa Petri de la propagación primaria de *Bacillus megaterium* ATCC 14581.
- z. Propagar el microorganismo en las placas Petri realizando estrías con el aza sobre la superficie del agar sólido y cerrarlas completamente con su tapadera. (Emplear una colonia por placa Petri)
- aa. Introducir las placas Petri en una incubadora a 33 °C por 24 h.
- bb. Sacar las placas Petri de la incubadora, sellarlas con papel Parafilm, envolverlas en papel aluminio, rotularlas e ingresarlas al refrigerador para su conservación.

B. Procedimientos generales

1. Cuantificación de biomasa por peso seco

- a. Verter 50 mL de solución de cada Erlenmeyer en tubos cónicos de 50 mL para centrífuga.

- b. Ingresar los tubos a una centrífuga.
 - c. Configurar el equipo a 5000 rpm y 15 min.
 - d. Iniciar la centrifugación.
 - e. Extraer los tubos luego del tiempo requerido y descartar el sobrenadante de cada tubo. Verificar que la pastilla de biomasa formada en el fondo del tubo no se descarte.
 - f. Aforar cada tubo a 50 mL con agua destilada empleando una piseta.
 - g. Colocar cada tubo en un agitador vortex hasta disolver la pastilla.
 - h. Ingresar los tubos y centrifugarlos nuevamente a 5000 rpm por 15 min.
 - i. Extraer los tubos luego del tiempo requerido y descartar el sobrenadante de cada tubo. Verificar que la pastilla de biomasa formada en el fondo del tubo no se descarte.
 - j. Extraer la pastilla de biomasa del fondo de cada tubo agregando una pequeña cantidad de agua destilada con una piseta.
 - k. Colocar cada tubo en un agitador vortex para facilitar la disolución de la pastilla.
 - l. Verter la solución de cada tubo por separado en beakers de 150 mL previamente tarados en una balanza analítica y rotulados.
 - m. Ingresar beakers al horno a 60 °C por 24 h o hasta que no presenten ningún tipo de sobrenadante.
 - n. Pesar los beakers en una balanza analítica, empleando guantes de nitrilo para evitar modificar el peso del recipiente.
 - o. Obtener por diferencia de peso el crecimiento de biomasa para cada muestra.
2. Cuantificación de glicerina empleando HPLC.

- a. Extraer 5 mL de sobrenadante generado por la centrifugación de las muestras e introducir en un tubo de ensayo de vidrio. Si la muestra presenta una concentración mayor a 20 g/L, realizar una dilución empleando micropipetas y agua destilada de manera que la concentración final sea no mayor a 20 g/L ; esto para evitar problemas de lectura con el equipo.
- b. Colocar por 5 s en agitador vortex.
- c. Filtrar las muestras a analizar empleando un filtro 0.22 μm y una jeringa hacia los viales de cromatografía.
- d. Filtrar la fase móvil para la lectura de glicerina, agua, empleando un filtro 0.45 μm .
- e. Insertar columna Hi plex H al equipo y configurar la temperatura a un valor de 40 °C.
- f. Insertar la muestra en el automuestreador y configurar la temperatura de la muestra a 30 °C.
- g. Configurar la temperatura del inyector a 30 °C.
- h. Configurar la temperatura del detector de índice de refracción a un valor de 40 °C.
- i. Programar la secuencia desde la interfaz del equipo. Configurar el nombre del vial, el número del vial y el archivo dónde se desea almacenar los datos.
- j. Iniciar la secuencia en dónde el equipo toma la muestra e inyecta 20 μL de muestra filtrada la cual es empujada por la fase móvil hacia la columna a caudal de 0.6 ml/min. Se da la separación de los compuestos presentes en la muestra los cuales se leen individualmente por el detector.
- k. Habilitar 21 min para la finalización de la lectura.
- l. Almacenar los datos obtenidos.

3. Cuantificación de PHA

- a. Agregar 10 mL de hipoclorito de sodio 4% (m/v) al recipiente donde se encuentra el sedimento de biomasa seco ya cuantificado.
- b. Agregar 10 mL de cloroformo.
- c. Colocar aluminio al recipiente y asegurar con papel Parafilm para evitar la evaporación de los solventes.
- d. Ingresar recipiente a una incubadora con agitación orbital a una temperatura de 37 °C y una velocidad de 300 rpm.
- e. Permitir la digestión de las células por 3 h.
- f. Verter el contenido del recipiente a tubo cónico para centrifuga una vez finalizado el tiempo de digestión.
- g. Ingresar el tubo a la centrifuga.
- h. Configurar el equipo a 3000 rpm y 20 min.
- i. Iniciar centrifugación.
- j. Remover el tubo una vez finalizado el tiempo. Se observará la formación de dos fases. La fase superior es el hipoclorito de sodio y la fase inferior es el cloroformo donde se encuentra disuelto el PHA formado. Ambas fases se encuentran separadas por la biomasa digerida.
- k. Extraer la fase inferior empleando una jeringa.
- l. Colocar la solución extraída en un recipiente previamente tarado.
- m. Permitir la evaporación del cloroformo por un mínimo de 24 h a temperatura ambiente empleando una campana de extracción para contener los gases generados.
- n. Ingresar el recipiente al horno a 60 °C por un mínimo de 24 h.
- o. Remover el recipiente del horno. Se observará un sólido blanco cristalino.
- p. Agregar entre 5 y 10 gotas de acetona al recipiente para una mejor purificación del producto.
- q. Agitar suavemente el recipiente y decantar el líquido de acetona remanente. Asegurar que no se despeguen los sólidos del recipiente.

- r. Ingresar recipiente nuevamente al horno a 60 °C por un mínimo de 24 h.
 - s. Pesar el recipiente en una balanza analítica, empleando guantes de nitrilo para evitar modificar el peso del recipiente.
 - t. Obtener por diferencia de peso el producto generado.
 - u. Repetir procedimiento para la cantidad de muestras que se posea.
4. Caracterización de PHA por medio de espectroscopia FTIR.
- a. Raspar contenido sólido del recipiente empleando para la cuantificación de PHA empleando una espátula.
 - b. Encender el espectrofotómetro y abrir la interfaz.
 - c. Correr el espectro de fondo en la interfaz del equipo para la eliminación de interferencias provenientes del ambiente.
 - d. Colocar una pequeña muestra lo suficiente para cubrir el cristal del equipo.
 - e. Aplicar una leve presión con la prensa incorporada en el equipo.
 - f. Realizar lectura de la muestra.
 - g. Colocar números de onda de referencia en el espectro generado.
 - h. Sobreponer el espectro generado con espectros de PHA de referencia previamente analizados.
 - i. Guardar archivo con el nombre correspondiente.
5. Formulación de solución de sales con elementos trazas empleando de referencia la formulación reportada en el estudio realizado por Naranjo *et al.* (2013)

La solución de sales con elementos trazas se realizó empleando la composición descrita a continuación:

Cuadro 6. Composición de solución de sales y solución de elementos trazas

Reactivo	Cantidad	Unidades
Composición de la solución de sales		
Sulfato de amonio	1	g/L
Fosfato diácido de potasio	1.5	g/L
Fosfato ácido de sodio	9	g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2	g/L
Composición de la solución de elementos trazas (1 mL de solución de sales /L de solución de sales)		
Sulfato de hierro heptahidratado	10	g/L
Sulfato de zinc	2.25	g/L
Sulfato de cobre	1	g/L
Sulfato de manganeso tetrahidratado	0.5	g/L
Cloruro de calcio dihidratado	2	g/L
Ácido bórico	0.23	g/L
Molibdato de amonio	0.2	g/L
Ácido clorhídrico 35% (v/v)	10	mL/L

Las cantidades de los distintos reactivos y el tamaño de la cristalería depende directamente del volumen de solución que se decida formular.

- a. Utilizar una espátula analítica, papel parafinado y una balanza analítica para pesar los componentes sólidos de la solución de sales.
- b. Introducir los componentes a un beaker y agregar agua destilada con una probeta de 100 mL.
- c. Posicionar el beaker en una estufa con agitación e introducir un agitador magnético.
- d. Encender la agitación de la estufa a 150 rpm.
- e. Calentar levemente hasta que los sólidos se disuelvan.
- f. Apagar el calentamiento y la agitación de la estufa y remover el beaker.
- g. Introducir solución a un balón aforado con ayuda de una varilla de vidrio y aforar el balón con agua destilada utilizando una piseta y colocar su tapón.
- h. Agitar suavemente el balón inclinándolo 180° hacia abajo sosteniendo el tapón del balón en todo momento para asegurar que la solución se contenga dentro del recipiente.
- i. Utilizar una espátula analítica, papel parafinado y una balanza analítica para pesar los componentes sólidos de la solución de trazas.
- j. Introducir los componentes a un beaker y agregar agua destilada con una probeta de 100 mL.
- k. Utilizar una pipeta de 10 mL para medir los componentes líquidos de la solución de trazas.
- l. Posicionar el beaker en una estufa con agitación e introducir un agitador magnético.
- m. Encender la agitación de la estufa a 150 rpm.
- n. Calentar levemente hasta que los sólidos se disuelvan.
- o. Apagar el calentamiento y la agitación de la estufa y remover el beaker.
- p. Emplear una pipeta de 10 mL para los componentes líquidos.
- q. Introducir los componentes líquidos al beaker.

- r. Introducir solución a un balón aforado con ayuda de una varilla de vidrio y aforar el balón con agua destilada utilizando una piseta y colocar su tapón.
 - s. Agitar suavemente el balón inclinándolo 180° hacia abajo sosteniendo el tapón del balón en todo momento para asegurar que la solución se contenga dentro del recipiente.
 - t. Empleando una pipeta de 5 mL agregar solución de trazas a solución de sales en la proporción descrita.
6. Cuantificación de nitrógeno (Método 10071 extraído del manual del equipo HACH DR 890)
- a. Encender el reactor DRB 200.
 - b. Calentar el reactor a una temperatura entre 103 °C y 106 °C.
 - c. Adicionar el contenido de un paquete de reactivo en polvo de persulfato de nitrógeno total a un vial de reactivo líquido de hidróxido de nitrógeno total. Realizar en duplicado.
 - d. Adicionar 2 mL de solución de sobrenadante de la solución fermentativa ya centrifugada a un vial. Dado que el equipo posee un rango de medición entre 0 mg/L de nitrógeno y 25 mg/L de nitrógeno, se realizó una solución de 2 mL 1:100 empleando micropipetas y agua destilada.
 - e. Adicionar 2 mL de agua destilada al segundo vial.
 - f. Colocar el tapón a cada vial y agitar vigorosamente por 30 s.
 - g. Colocar ambos viales en el reactor.
 - h. Calentar por 30 min.
 - i. Empleando guantes resistentes al calor, remover los viales del reactor.
 - j. Permitir el enfriamiento de los viales a temperatura ambiente.
 - k. Oprimir PRGM en el colorímetro.
 - l. Oprimir 58 y ENTER. Se mostrará en la pantalla mg/L N y el ícono de ZERO.

- m. Remover los tapones de los viales y agregar a cada uno un paquete de reactivo en polvo TN A.
- n. Colocar tapón a cada vial.
- o. Agitar por 15 s.
- p. Oprimir en el colorímetro TIMER y ENTER. Se dará inicio a una reacción de 3 min.
- q. Remover los tapones de los viales después de escuchar el sonido del colorímetro y agregar a cada uno un paquete de reactivo en polvo RN B.
- r. Colocar tapón a cada vial.
- s. Agitar por 15 s.
- t. Oprimir ENTER luego de la agitación. Se dará inicio a una reacción de 2 min.
- u. Remover el tapón de dos viales de reactivo líquido TN C.
- v. Agregar 2 mL de la muestra digerida a un vial.
- w. Agregar 2 mL del blanco al segundo vial.
- x. Colocar tapón a cada vial.
- y. Invertir los viales suavemente 10 veces para mezclar. Tomar en cuenta que estos se calentarán.
- z. Oprimir ENTER en el colorímetro. Se dará inicio a una reacción de 5 min.
- aa. Insertar el adaptador COD/TNT en el soporte de la celda girando el adaptador hasta que sujete en su lugar.
- bb. Limpiar los viales una vez finalizada la reacción.
- cc. Insertar el vial del blanco en el adaptador.
- dd. Colocar la tapa del colorímetro y oprimir ZERO. Se mostrará en el equipo 0.0 mg/L N.
- ee. Remover el blanco e introducir el segundo vial de la misma manera.

- ff. Oprimir READ. Se mostrará en el equipo la concentración medida.
- gg. Multiplicar este factor por 100 del factor de dilución para obtener la concentración real de nitrógeno.

7. Conteo celular

- a. Realizar una solución con contenido celular de 1 mL 1:10 empleando micropipetas y colocar en un microtubo de capacidad de 1.5 mL. Esta dilución puede ser modificada a 1:100 de manera que se facilite el conteo de soluciones con altas concentraciones microbianas.
- b. Agregar una gota de azul tripano empleando una pipeta pasteur de plástico a la solución.
- c. Colocar por 5 s en agitador vortex.
- d. Colocar cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer.
- e. Encender el microscopio.
- f. Cargar la cámara de Neubauer por capilaridad ingresando la solución, empleando una micropipeta, por el borde del cubreobjetos.
- g. Colocar cámara de Neubauer en el sujetador del microscopio.
- h. Enfocar las 4 zonas trazadas ubicadas en las esquinas del trazado general. Estas presentan un retícula menos densa en comparación a las que dividen las zonas.
- i. Contar las células observadas por zona.
- j. Efectuar un promedio de estos valores.
- k. Multiplicar este valor obtenido por un factor de 10^4 y finalmente por 10, o por el factor de dilución empleado, para obtener la concentración de células/mL.

C. Reducción de la fase de adaptación del crecimiento de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio que contiene glicerina.

- 1. Primera adaptación del microorganismo a glicerina como fuente de carbono.

- a. Agregar a siete Erlenmeyers de 250 mL distintas concentraciones iniciales de glicerina (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60) g/L empleando un pipeteador, una pipeta de 10 mL y una balanza.
- b. Pesar con una espátula analítica 1.2 g de caldo nutritivo en una balanza analítica, empleando papel parafinado.
- c. Medir 150 mL de agua destilada con una probeta de 100 mL.
- d. Introducir el caldo nutritivo y el agua destilada a un Erlenmeyer de 250 mL.
- e. Posicionar el Erlenmeyer en una estufa con agitación e introducir un agitador magnético.
- f. Encender la agitación de la estufa a 150 rpm.
- g. Calentar levemente hasta que los sólidos se disuelvan.
- h. Apagar el calentamiento y la agitación de la estufa y remover el Erlenmeyer.
- i. Agregar a cada Erlenmeyer que contiene glicerina la diferencia de agua destilada empleando una probeta de 100 mL, tomando en cuenta que se trabaja con un volumen efectivo de 100 mL y que se agrega posteriormente 10 mL de caldo nutritivo posterior a la esterilización.
- j. Tapar la boquilla de cada Erlenmeyer con papel aluminio y hacer un pequeño agujero en la parte superior para liberar presión durante la esterilización.
- k. Colocar su respectiva tapa a cada Erlenmeyer por encima del aluminio para asegurar mayor hermeticidad.
- l. Envolver una pipeta de 10 mL en papel aluminio.
- m. Encender la autoclave e introducir agua tratada hasta el nivel indicado por el equipo.
- n. Introducir la pipeta y los Erlenmeyers a la autoclave.
- o. Configurar la temperatura a 121 °C.
- p. Comenzar esterilización.

- q. Liberar presión en el equipo abriendo en la válvula de salida de vapor por 3 s cuando la temperatura alcance una temperatura entre 95 °C y 99 °C.
- r. Permitir la esterilización por 15 min cuando la temperatura alcance 121 °C.
- s. Apagar la autoclave, remover los Erlenmeyers y la pipeta empleando guantes resistentes al calor.
- t. Permitir que se enfríen por 20 min.
- u. Desinfectar el área de trabajo en campana de extracción con etanol 70% (v/v) y posicionar la cantidad de mecheros de alcohol requeridos para mantener los Erlenmeyers estériles. Ocupar entre 4 y 6 Erlenmeyers por mechero.
- v. Encender los mecheros empleando un encendedor comercial.
- w. Agregar 10 mL de caldo nutritivo estéril empleando la pipeta de 10 mL estéril a cada Erlenmeyer con contenido de glicerina. Realizar procedimiento manteniendo la cristalería siempre alrededor de los mecheros utilizados.
- x. Colocar el extremo de un aza en el mechero hasta observar que la misma se torne color rojo.
- y. Remover del mechero pero colocarla cerca del mismo para que se enfríe sin contaminarse.
- z. Tomar con el aza estéril una colonia de una placa Petri de la propagación secundaria de *Bacillus megaterium* ATCC 14581.
- aa. Inocular solución ingresando el aza a un Erlenmeyer y agitar levemente dentro de la solución hasta observar que la colonia ya no se encuentra en el extremo del aza. (Emplear una colonia por Erlenmeyer)
- bb. Colocar su respectiva tapa a cada Erlenmeyer.
- cc. Ingresar los siete Erlenmeyers a una incubadora con agitación orbital.
- dd. Configurar la temperatura a 33 °C y agitación de 200 rpm
- ee. Permitir el crecimiento durante 60 h dentro del equipo.

- ff. Verificar crecimiento cualitativamente luego de las 60 h de todos los Erlenmeyers.
 - gg. Realizar cuantificación de biomasa. (Referir a la sección de procedimientos generales.)
 - hh. Realizar cuantificación de glicerina. (Referir a la sección de procedimientos generales.)
 - ii. Repetir procedimiento en quintuplicado a partir de 20 g/L.
 - jj. Extraer un Erlenmeyer cada 12 h.
 - kk. Colocar papel Parafilm en la sección de la tapa del Erlenmeyer e ingresarlos a un refrigerador para evitar que continúe la fermentación. (Realizar este procedimiento únicamente si el análisis de las muestras no se realiza en el momento.)
 - ll. Realizar conteo celular. (Referir a la sección de procedimientos generales.)
2. Segunda adaptación del microorganismo a glicerina como fuente de carbono.
- a. Agregar a siete Erlenmeyers de 250 mL distintas concentraciones iniciales de glicerina (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60) g/L empleando un pipeteador, una pipeta de 10 mL y una balanza.
 - b. Realizar 1 L de solución de sales con elementos trazas. (Referir a la sección de procedimientos generales.)
 - c. Colocar solución de sales con elementos trazas en un recipiente de vidrio de 1 L.
 - d. Agregar a cada Erlenmeyer que contiene glicerina la diferencia de agua destilada empleando una probeta de 100 mL, tomando en cuenta que se trabaja con un volumen efectivo de 100 mL y que se agrega posteriormente 10 mL de solución de sales con elementos trazas posterior a la esterilización y 1 mL de cultivo.
 - e. Tapar la boquilla de cada Erlenmeyer con papel aluminio y hacer un pequeño agujero en la parte superior para liberar presión durante la esterilización.

- f. Colocar su respectiva tapa a cada Erlenmeyer por encima del aluminio para asegurar mayor hermeticidad.
- g. Envolver una pipeta de 10 mL y una pipeta de 5 mL en papel aluminio.
- h. Encender la autoclave e introducir agua tratada hasta el nivel indicado por el equipo.
- i. Introducir las pipetas, los Erlenmeyers y el recipiente de vidrio a la autoclave.
- j. Configurar la temperatura a 121 °C.
- k. Comenzar esterilización.
- l. Liberar presión en el equipo abriendo en la válvula de salida de vapor por 3 s cuando la temperatura alcance una temperatura entre 95 °C y 99 °C.
- m. Permitir la esterilización por 15 min cuando la temperatura alcance 121 °C.
- n. Apagar la autoclave, remover los Erlenmeyers, las pipetas y el recipiente de vidrio empleando guantes resistentes al calor.
- o. Permitir que se enfríen por 20 min.
- p. Desinfectar el área de trabajo en campana de extracción con etanol 70% (v/v) y posicionar la cantidad de mecheros de alcohol requeridos para mantener los Erlenmeyers y el recipiente de vidrio estériles. Ocupar entre 4 y 6 Erlenmeyers por mechero.
- q. Encender los mecheros empleando un encendedor comercial.
- r. Agregar 10 mL de solución estéril de sales con elementos trazas empleando la pipeta de 10 mL estéril a cada Erlenmeyer con contenido de glicerina. Realizar procedimiento manteniendo la cristalería siempre alrededor de los mecheros utilizados.
- s. Agregar 1mL de la primera adaptación del microorganismo empleando la pipeta de 5 mL estéril a cada Erlenmeyer correspondiente según la concentración inicial de glicerina.

- t. Colocar su respectiva tapa a cada Erlenmeyer.
 - u. Ingresar los siete Erlenmeyers a una incubadora con agitación orbital.
 - v. Configurar la temperatura a 33 °C y agitación de 200 rpm
 - w. Permitir el crecimiento durante 96 h dentro del equipo.
 - x. Verificar crecimiento cualitativamente luego de las 96 h de todos los Erlenmeyers.
 - y. Realizar cuantificación de biomasa. (Referir a la sección de procedimientos generales.)
 - z. Realizar cuantificación de glicerina. (Referir a la sección de procedimientos generales.)
 - aa. Repetir procedimiento en quintuplicado a partir de 20 g/L.
 - bb. Extraer un Erlenmeyer cada 12 h.
 - cc. Colocar papel Parafilm en la sección de la tapa del Erlenmeyer e ingresarlos a un refrigerador para evitar que continúe la fermentación. (Realizar este procedimiento únicamente si el análisis de las muestras no se realiza en el momento.)
 - dd. Realizar conteo celular. (Referir a la sección de procedimientos generales.)
3. Tercera adaptación del microorganismo a glicerina como fuente de carbono.
- a. Agregar a siete Erlenmeyers de 250 mL distintas concentraciones iniciales de glicerina (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60) g/L empleando un pipeteador, una pipeta de 10 ml y una balanza.
 - b. Realizar 1 L de solución de sales con elementos trazas. (Referir a la sección de procedimientos generales.)
 - c. Colocar solución de sales con elementos trazas en un recipiente de vidrio de 1 L.

- d. Agregar a cada Erlenmeyer que contiene glicerina la diferencia de agua destilada empleando una probeta de 100 mL, tomando en cuenta que se trabaja con un volumen efectivo de 100 mL y que se agrega posteriormente 10 mL de solución de sales con elementos trazas posterior a la esterilización y 1 mL de cultivo.
- e. Tapar la boquilla de cada Erlenmeyer con papel aluminio y hacer un pequeño agujero en la parte superior para liberar presión durante la esterilización.
- f. Colocar su respectiva tapa a cada Erlenmeyer por encima del aluminio para asegurar mayor hermeticidad.
- g. Envolver una pipeta de 10 mL y una pipeta de 5 mL en papel aluminio.
- h. Encender la autoclave e introducir agua tratada hasta el nivel indicado por el equipo.
- i. Introducir las pipetas, los Erlenmeyers y el recipiente de vidrio a la autoclave.
- j. Configurar la temperatura a 121 °C.
- k. Comenzar esterilización.
- l. Liberar presión en el equipo abriendo en la válvula de salida de vapor por 3 s cuando la temperatura alcance una temperatura entre 95 °C y 99 °C.
- m. Permitir la esterilización por 15 min cuando la temperatura alcance 121 °C.
- n. Apagar la autoclave, remover los Erlenmeyers, las pipetas y el recipiente de vidrio empleando guantes resistentes al calor.
- o. Permitir que se enfríen por 20 min.
- p. Desinfectar el área de trabajo en campana de extracción con etanol 70% (v/v) y posicionar la cantidad de mecheros de alcohol requeridos para mantener los Erlenmeyers y el recipiente de vidrio estériles. Ocupar entre 4 y 6 Erlenmeyers por mechero.
- q. Encender los mecheros empleando un encendedor comercial.

r. Agregar 10 mL de solución estéril de sales con elementos trazas empleando la pipeta de 10 mL estéril a cada Erlenmeyer con contenido de glicerina. Realizar procedimiento manteniendo la cristalería siempre alrededor de los mecheros utilizados.

s. Agregar 1mL de la segunda adaptación del microorganismo empleando la pipeta de 5 mL estéril a cada Erlenmeyer correspondiente según la concentración inicial de glicerina.

t. Colocar su respectiva tapa a cada Erlenmeyer.

u. Ingresar los siete Erlenmeyers a una incubadora con agitación orbital.

v. Configurar la temperatura a 33 °C y agitación de 200 rpm

w. Permitir el crecimiento durante 48 h dentro del equipo.

x. Verificar crecimiento cualitativamente luego de las 48 h de todos los Erlenmeyers.

y. Realizar cuantificación de biomasa. (Referir a la sección de procedimientos generales.)

z. Realizar cuantificación de glicerina. (Referir a la sección de procedimientos generales.)

aa. Repetir procedimiento en quintuplicado a partir de 20 g/L.

bb. Extraer un Erlenmeyer cada 12 h.

cc. Colocar papel Parafilm en la sección de la tapa del Erlenmeyer e ingresarlos a un refrigerador para evitar que continúe la fermentación. (Realizar este procedimiento únicamente si el análisis de las muestras no se realiza en el momento.)

dd. Realizar conteo celular. (Referir a la sección de procedimientos generales.)

D. Evaluación de distintas concentraciones iniciales de glicerina como fuente de carbono para la producción de polihidroxialcanoato a escala de 0.1 L.

1. Realizar 100 mL de inóculo adaptado empleando *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a distintas concentraciones iniciales de glicerina (10, 20, 30, 40, 50 y 60) g/L. (Referir a la sección de reducción de la fase de adaptación del crecimiento de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio que contiene glicerina).
2. Agregar a seis Erlenmeyers de 250 mL distintas concentraciones iniciales de glicerina (10, 20, 30, 40, 50 y 60) g/L empleando un pipeteador, una pipeta de 10 mL y una balanza. Realizar este procedimiento en quintuplicado.
3. Realizar 4 L de solución de sales con elementos trazas. (Referir a la sección de procedimientos generales.)
4. Colocar solución de sales con elementos trazas en recipientes de vidrio de 1 L.
5. Tapar la boquilla de cada Erlenmeyer con papel aluminio y hacer un pequeño agujero en la parte superior para liberar presión durante la esterilización.
6. Colocar su respectiva tapa a cada Erlenmeyer por encima del aluminio para asegurar mayor hermeticidad.
7. Envolver una probeta de 100 mL y una pipeta de 10 mL en papel aluminio.
8. Encender la autoclave e introducir agua tratada hasta el nivel indicado por el equipo.
9. Introducir la pipeta, la probeta, los Erlenmeyers y los recipientes de vidrio a la autoclave.
10. Configurar la temperatura a 121 °C.
11. Comenzar esterilización.
12. Liberar presión en el equipo abriendo en la válvula de salida de vapor por 3 s cuando la temperatura alcance una temperatura entre 95 °C y 99 °C.
13. Permitir la esterilización por 15 min cuando la temperatura alcance 121 °C.
14. Apagar la autoclave, remover los Erlenmeyers, la probeta, la pipeta y los recipientes de vidrio empleando guantes resistentes al calor.

15. Permitir que se enfríen por 20 min.
16. Desinfectar el área de trabajo en campana de extracción con etanol 70% (v/v) y posicionar la cantidad de mecheros de alcohol requeridos para mantener los Erlenmeyers y los recipientes de vidrio estériles. Ocupar entre 4 y 6 Erlenmeyers por mechero.
17. Encender los mecheros empleando un encendedor comercial.
18. Agregar a cada Erlenmeyer que contiene glicerina la diferencia de solución de sales con elementos trazas empleando la probeta estéril de 100 mL, tomando en cuenta que se trabaja con un volumen efectivo de 100 mL y que se agrega posteriormente 8% (v/v) de inóculo adaptado de *Bacillus megaterium* ATCC 14581. Realizar procedimiento manteniendo la cristalería siempre alrededor de los mecheros utilizados.
19. Agregar 8% (v/v) de inóculo adaptado de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 empleando la pipeta de 10 mL estéril a cada Erlenmeyer correspondiente según la concentración inicial de glicerina.
20. Colocar su respectiva tapa a cada Erlenmeyer.
21. Ingresar los Erlenmeyers a una incubadora con agitación orbital.
22. Configurar la temperatura a 33 °C y agitación de 200 rpm
23. Permitir el crecimiento durante 60 h dentro del equipo.
24. Extraer un Erlenmeyer para cada concentración inicial de glicerina cada 12 h.
25. Colocar papel Parafilm en la sección de la tapa del Erlenmeyer e ingresarlos a un refrigerador para evitar que continúe la fermentación. (Realizar este procedimiento únicamente si el análisis de las muestras no se realiza en el momento.)
26. Medir el pH de cada muestra empleando un potenciómetro.
27. Realizar cuantificación de biomasa. (Referir a la sección de procedimientos generales)

28. Realizar cuantificación de glicerina. (Referir a la sección de procedimientos generales)
29. Realizar cuantificación de nitrógeno. (Referir a la sección de procedimientos generales).
30. Realizar cuantificación de PHA. (Referir a la sección de procedimientos generales).
31. Realizar caracterización de PHA por medio de espectroscopia FTIR. (Referir a la sección de procedimientos generales).

E. Fermentaciones por lotes a escala de 10 L empleando un bioreactor *Bioflo 415*

1. Realizar 900 mL el inóculo adaptado empleando *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a una concentración inicial de glicerina de 20 g/L. (Referir a la sección de reducción de la fase de adaptación del crecimiento de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio que contiene glicerina).
2. Pesar 20 g/L de glicerina empleando un pipeteador, una pipeta de 10 mL y una balanza en un recipiente de vidrio de 250 mL previamente tarado. Considerar que el volumen efectivo de la fermentación es de 10 L.
3. Encender la autoclave e introducir agua tratada hasta el nivel indicado por el equipo.
4. Introducir el recipiente de vidrio con contenido de glicerina a la autoclave.
5. Configurar la temperatura a 121 °C.
6. Comenzar esterilización.
7. Liberar presión en el equipo abriendo en la válvula de salida de vapor por 3 s cuando la temperatura alcance una temperatura entre 95 °C y 99 °C.
8. Permitir la esterilización por 15 min cuando la temperatura alcance 121 °C.
9. Apagar la autoclave, remover el recipiente de vidrio empleando guantes resistentes al calor.

10. Realizar 10 L de solución de sales con elementos trazas. (Referir a la sección de procedimientos generales.)
11. Agregar al biorreactor solución de sales con elementos trazas empleando un pichel de 2 L, tomando en cuenta que se trabaja con un volumen efectivo de 10 L y que se agrega posteriormente 8% (v/v) de inóculo adaptado de *Bacillus megaterium* ATCC 14581.
12. Encender el bioreactor y la pantalla del mismo.
13. Abrir la sección de esterilización y configurar la temperatura de esterilización a 96 °C, la temperatura de enfriamiento a 33 °C y el tiempo de esterilización a 400 min.
14. Levantar el sistema de inyección de aire de forma que se mantenga en su posición pero no se encuentre completamente hermético. (Esto se realiza como medida de seguridad para el protocolo de esterilización.)
15. Verificar que la válvula de alimentación de agua esté abierta y presurizada.
16. Encender la agitación del equipo en el menú principal a 50 rpm.
17. Iniciar esterilización en la sección de esterilización de la pantalla del equipo.
18. Introducir el sistema de inyección de aire de forma que se encuentre completamente hermético una vez haya concluido la esterilización.
19. Apagar agitación.
20. Agregar glicerina estéril por la parte superior del reactor.
21. Limpiar el medidor de oxígeno disuelto con etanol 70% (v/v) y esperar a que el mismo se evapore.
22. Conectar e introducir el medidor al bioreactor por la parte superior y sellar de forma que se encuentre completamente hermético.
23. En la sección de calibración de la pantalla del equipo, seleccionar DO.
24. Remover el cable del medidor de oxígeno.
25. Colocar 0 en la casilla de SET ZERO y oprimir SET ZERO en la pantalla.

26. Conectar el cable al medidor de oxígeno.
27. Encender agitación a 50 rpm.
28. Verificar que las válvulas de aire comprimido estén abiertas y presurizadas.
29. Encender O₂ enrichment en el menú principal.
30. Introducir un flujo de aire vigoroso al sistema en el menú principal. Entre 14 L/min y 15 L/min.
31. Encender el escape de aire. Este se regula independientemente por el equipo.
32. Esperar 10 min a que se establezca la lectura RAW VALUE en la sección de calibración para el DO.
33. Colocar 100 en la casilla de SET SPAN y oprimir SET SPAN en la pantalla.
34. Apagar el O₂ enrichment, el flujo de aire y el escape de aire en el menú principal.
35. Encender la temperatura en el menú principal a 33 °C.
36. Agregar al reactor por la parte superior 8% (v/v) de inóculo adaptado de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 una vez la temperatura haya llegado al valor introducido.
37. Encender agitación a 200 rpm.
38. Encender O₂ enrichment en el menú principal.
39. Introducir un flujo de aire en el menú principal. (Este depende de la fermentación a realiza.)
40. Encender el escape de aire. Este se regula independientemente por el equipo.
41. Encender la señal del medidor de oxígeno disuelto (DO) en la pantalla principal.
42. Tomar una muestra de 40 mL empleando un tubo cónico de centrifuga estéril a la hora 0 de la reacción.

43. Rotular el tubo e ingresar al refrigerador para evitar que continúe la fermentación.
44. Tomar una muestra de 40 mL empleando tubos cónicos de centrifuga estériles cada hora para el primer día de reacción.
45. Tomar una muestra de 40 mL empleando tubos cónicos de centrifuga estériles cada hora después del primer día de reacción hasta completar entre 70 h y 72 h de fermentación.
46. Apagar todos los controles encendidos de la pantalla principal.
47. Cerrar las válvulas de aire comprimido.
48. Vaciar el reactor completamente por la parte inferior utilizando recipientes plásticos estériles de 5 L.
49. Rotular recipientes e ingresar los mismos al refrigerador para evitar que continúe la fermentación.
50. Llenar el reactor con 12 L de agua tratada.
51. Repetir el procedimiento de esterilización desde el paso n hasta el paso t para completar la limpieza del reactor.
52. Vaciar el contenido del bioreactor y apagar la pantalla y el bioreactor.
53. Medir el pH de cada muestra empleando un potenciómetro.
54. Realizar cuantificación de biomasa. (Referir a la sección de procedimientos generales)
55. Realizar cuantificación de glicerina. (Referir a la sección de procedimientos generales).
56. Realizar cuantificación de nitrógeno. (Referir a la sección de procedimientos generales).
57. Realizar cuantificación de PHA. (Referir a la sección de procedimientos generales).

58. Realizar caracterización de PHA por medio de espectroscopia FTIR. (Referir a la sección de procedimientos generales).

F. Generación de modelo matemático del proceso fermentativo

1. Tabular la cuantificación de PHA, biomasa y glicerina con respecto al tiempo en Excel.
2. Emplear una técnica para el suavizado de datos.
3. Calcular la velocidad de crecimiento celular, r_N , a lo largo del tiempo como se muestra en la ecuación 1.
4. Calcular el inverso del promedio instantáneo de la concentración de sustrato, $\frac{1}{C_s}$, a lo largo del tiempo.
5. Calcular el promedio instantáneo de la concentración celular C_N a lo largo del tiempo.
6. Calcular la división del factor calculado de C_N entre el factor r_N , $\frac{C_N}{r_N}$, a lo largo del tiempo.
7. Insertar un gráfico de dispersión donde se coloque los valores de $\frac{1}{C_s}$ en el eje x y los valores de $\frac{C_N}{r_N}$ en el eje y correspondientes a la fase exponencial de crecimiento.
8. Ajustar los puntos graficados a una tendencia lineal.
9. Obtener la ecuación de la recta generada.
10. Obtener un valor preliminar de μ_{max} a través del inverso del intercepto de la ecuación de la recta.
11. Obtener un valor preliminar de K_S a través de la multiplicación de μ_{max} por la pendiente de la ecuación de la recta.
12. Obtener un valor preliminar de Y_{xs} global como se muestra en la ecuación 8
13. Obtener un valor preliminar de Y_{px} global como se muestra en la ecuación.

14. Abrir un nuevo archivo de Excel y copiar en la primera columna los valores de tiempo y en la segunda columna los valores de PHA obtenidos.
15. Guardar como un archivo de valores separados por comas (CSV).
16. Abrir un nuevo archivo de Excel y copiar en la primera columna los valores de tiempo y en la segunda columna los valores de biomasa obtenidos.
17. Guardar como un archivo de valores separados por comas (CSV).
18. Abrir un nuevo archivo de Excel y copiar en la primera columna los valores de tiempo y en la segunda columna los valores de glicerina obtenidos.
19. Guardar como un archivo de valores separados por comas (CSV).
20. Abrir el Software Berkeley Madonna ®.
21. Abrir un nuevo documento en el programa e insertar un nuevo gráfico.
22. Configurar en la sección de la izquierda del programa el método de aproximación Runge-Kutta 4 (RK4), un tiempo inicial de 0 h, el tiempo de duración del sistema fermentativo y un incremento diferencial en el simulador de 0.02.
23. Importar los archivos CSV generados y nombrarlos correspondientemente. Esto genera una gráfica con puntos dispersos que representan los datos experimentales importados al programa.
24. Ingresar en la sección de la izquierda del programa el código correspondiente al modelo de Monod presentado en la ecuación 3 y las velocidades de formación de producto, biomasa y sustrato con sus correspondientes modificaciones constituidas por constantes cinéticas, las cuales habilitan una mejor representación de los datos experimentales. La programación se realizó de la siguiente manera:

$$u = u_{max} * (C_s / (C_s + K_s))$$

$$R_n = u * C_n$$

$$R_s = -R_n / Y_{xs}$$

$$R_p = R_n * Y_{px}$$

$$d/dt(C_s)=R_s+(h*C_n)$$

$$d/dt(C_n)=(R_n+(i*C_s))*((C_s/(C_s+C_{sm}))^k)*(w*EXP(C_s*g))$$

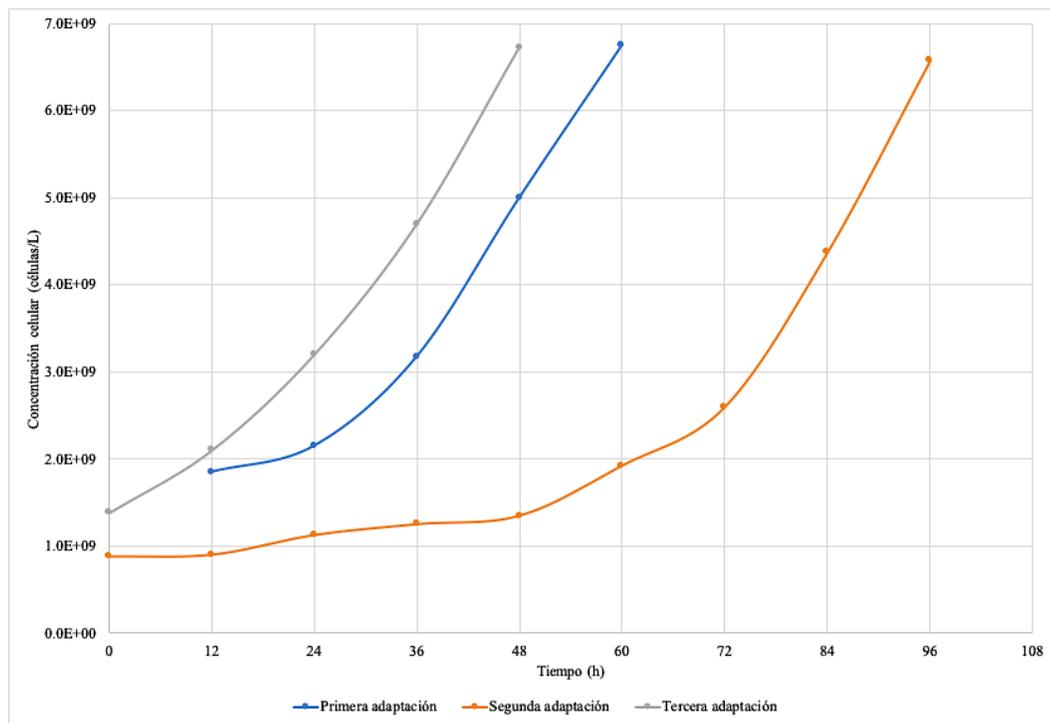
$$d/dt(C_p)=R_p+(j*C_n)$$

[Extracto del código escrito en el Software Berkeley Madonna ®]

25. Ingresar en la sección de la izquierda del programa los valores preliminares calculados anteriormente para las siguientes constantes cinéticas: μ_{max} , K_s , Y_{xs} y Y_{px} como valores iniciales.
26. Ingresar un valor de 0 para las siguientes constantes cinéticas definidas: h , i , C_{sm} , k , w , g y j .
27. Configurar la concentración inicial de PHA, sustrato y biomasa con los valores correspondientes del sistema bajo análisis.
28. Ajustar los parámetros cinéticos de la ecuación de formación de PHA, j y Y_{px} , empleando la función de Curve Fit en el programa para asegurar una mejor aproximación del modelo a los datos experimentales importados.
29. Ajustar los parámetros cinéticos de la ecuación de formación de biomasa, i , C_{sm} , k , w , g , μ_{max} y K_s , empleando la función de Curve Fit en el programa para asegurar una mejor aproximación del modelo a los datos experimentales importados.
30. Ajustar los parámetros cinéticos de la ecuación de consumo de glicerina, h y Y_{xs} , empleando la función de Curve Fit en el programa para asegurar una mejor aproximación del modelo a los datos experimentales importados.
31. Leer los valores de las constantes cinéticas definidas de manera tabular en la sección de la derecha del programa.
32. Realizar el mismo procedimiento con los demás sistemas analizados.

VII. Resultados

Figura 17. Comparación de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina de las adaptaciones realizadas



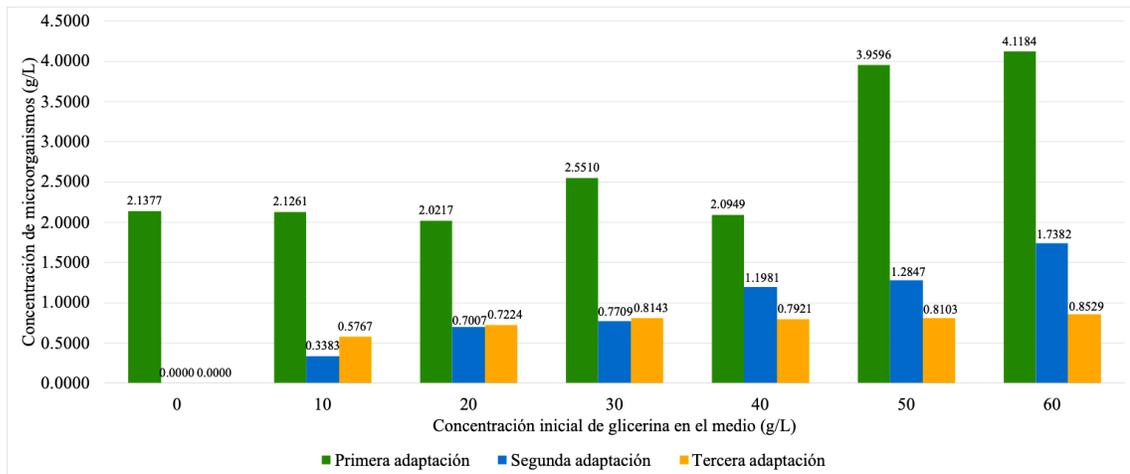
Se trabajó a una temperatura de 33 °C, a una agitación constante de 200 rpm y a una presión de 0.83 atm correspondiente a la presión atmosférica de la ciudad de Guatemala para todos los sistemas. Se utilizó glicerina USP 99.7% (m/m). El crecimiento se realizó a escala de 0.1 L empleando una incubadora con agitación orbital. Se empleó un Erlenmeyer individualmente para la determinación de cada uno de los puntos para evitar contaminación por la toma de muestras en el tiempo. La primera adaptación no posee un valor inicial correspondiente a la hora 0 puesto que se empleó como inóculo una unidad formadora de colonia (UFC). El valor inicial de la primera y segunda adaptación corresponden a la concentración celular final de la adaptación posterior tomando en consideración el factor de dilución (1:100). Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 7. Velocidad de crecimiento celular global de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 de las adaptaciones realizadas en un medio de 20 g/L de glicerina

Adaptación efectuada	Velocidad de crecimiento celular global ($\frac{g}{L \cdot h}$)
Primera adaptación	1.0E+08 ± 5.5E+06
Segunda adaptación	6.8E+07 ± 4.8E+06
Tercera adaptación	1.3E+08 ± 1.1E+07

Valores representan el crecimiento celular neto alcanzado con respecto al tiempo necesario para obtener dicha concentración. Fuente: Elaboración propia.

Figura 18. Comparación de las adaptaciones realizadas para el crecimiento microbiano de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina



Se trabajó a una temperatura de 33 °C, a una agitación constante de 200 rpm y a una presión de 0.83 atm correspondiente a la presión atmosférica de la ciudad de Guatemala para todos los sistemas. Se utilizó glicerina USP 99.7% (m/m). El crecimiento se realizó a escala de 0.1 L empleando una incubadora con agitación orbital. Los resultados representan datos promedios ya que se realizó el estudio en duplicado. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 8. Comparación de la conversión de glicerina por parte de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 de las adaptaciones realizadas empleando distintas concentraciones iniciales de glicerina

Glicerina inicial (g/L)	Conversión de glicerina (m/m)		
	Primera adaptación	Segunda adaptación	Tercera adaptación
0	0.00 ± 0.00E-04%	0.00 ± 0.00E-04%	0.00 ± 0.00E-04%
10	27.0 ± 1.35E-03%	9.44 ± 4.77E-04%	16.0 ± 8.05E-04%
20	22.5 ± 5.63E-04%	11.8 ± 2.97E-04%	16.4 ± 4.11E-04%
30	18.4 ± 3.08E-04%	13.6 ± 2.28E-04%	14.4 ± 2.42E-04%
40	20.8 ± 2.60E-04%	19.5 ± 2.44E-04%	14.5 ± 1.81E-04%
50	29.9 ± 3.00E-04%	25.2 ± 2.52E-04%	21.3 ± 2.13E-04%
60	37.6 ± 3.14E-04%	32.2 ± 2.69E-04%	21.1 ± 1.77E-04%

Valores obtenidos a partir del consumo determinado de glicerina con respecto a su concentración inicial. Para esto se emplearon concentraciones cuantificadas con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 9. Comparación de producción fermentativa con *Bacillus megaterium* ATCC 14581 empleando distintas concentraciones iniciales de glicerina a escala de 0.1 L

Glicerina inicial (g/L)	PHA (± 0.0031 g/L)	Conversión de glicerina (m/m)	Biomasa (± 0.0031 g/L)	Rendimientos (m/m)		
				\bar{Y}_{ps}	\bar{Y}_{xs}	\bar{Y}_{px}
10	0.2533	79.0	1.4444	0.0321	0.1046	0.1754
		± 3.95E-03%		±	±	±
20	0.7844	68.4	3.5422	0.0574	0.1966	0.2215
		± 1.71E-03%		±	±	±
30	0.6111	58.9	3.8667	0.0346	0.1662	0.1580
		± 9.82E-04%		±	±	±
40	0.4978	53.2	4.1578	0.0234	0.1536	0.1197
		± 6.66E-04%		±	±	±
50	0.2378	36.3	3.7689	0.0131	0.1595	0.0631
		± 3.64E-04%		±	±	±
60	0.1333	18.5	2.6911	0.0120	0.1573	0.0495
		± 1.55E-04%		±	±	±

Se trabajó a una temperatura de 33 °C, a una agitación constante de 200 rpm, a una presión de 0.83 atm correspondiente a la presión atmosférica de la ciudad de Guatemala y un tiempo de fermentación de 60 h para todos los sistemas. Se utilizó glicerina USP 99.7% (m/m). La fermentación se realizó a escala de 0.1 L empleando una incubadora con agitación orbital. Notación empleada: \bar{Y}_{ps} =Rendimiento específico de producto con respecto a sustrato, \bar{Y}_{xs} =Rendimiento específico de biomasa con respecto a sustrato, \bar{Y}_{px} =Rendimiento específico de producto con respecto a biomasa. Los resultados para la

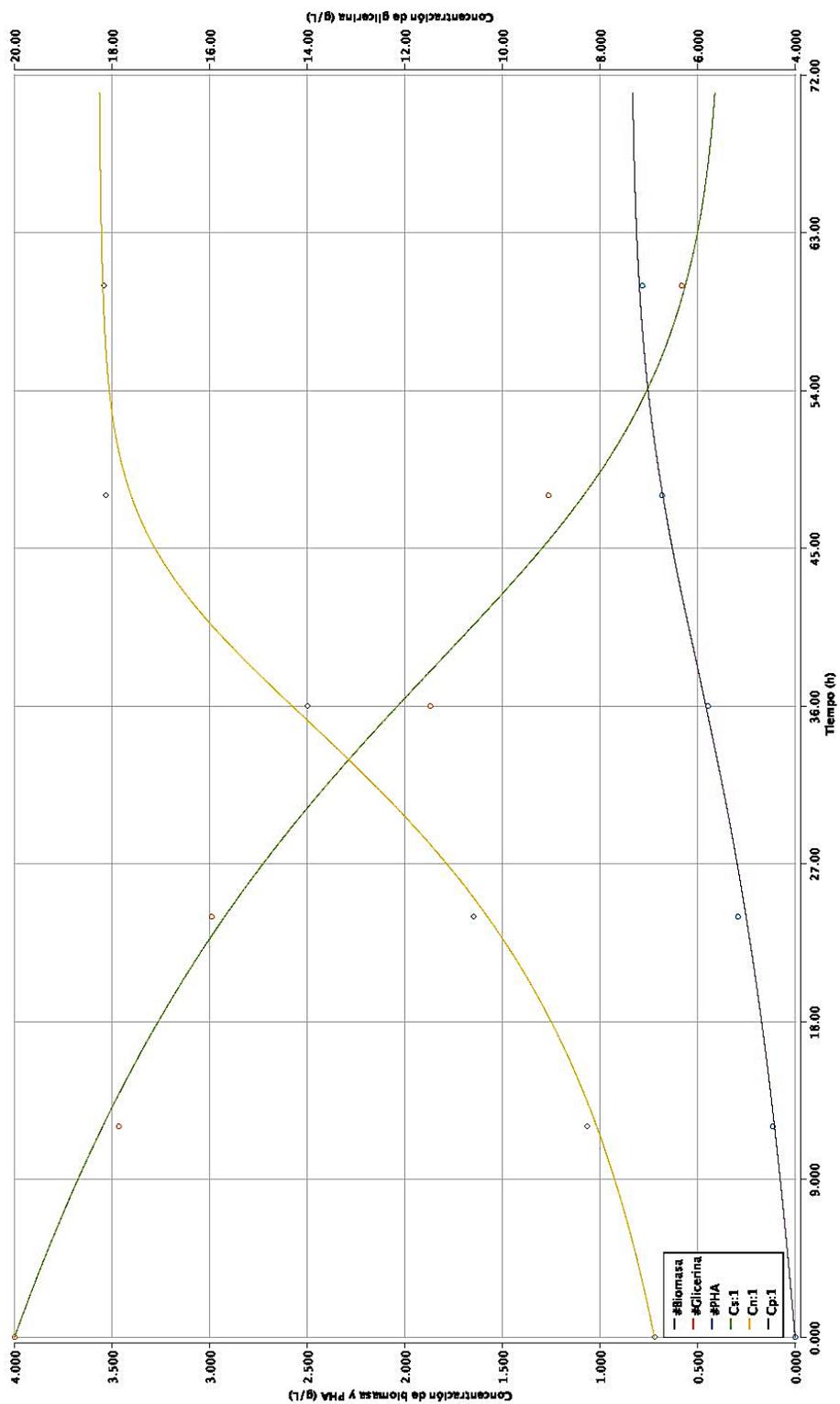
concentración de 20 g/L de glicerina inicial representan datos promedios ya que se realizó el estudio en duplicado. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 10. Comparación de producción fermentativa de PHA con *Bacillus megaterium* ATCC 14581 empleando 20 g/L de glicerina a escala de 0.1 L y 10 L

Parámetro	Sistema 0	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Unidades
Volumen efectivo de fermentación	0.1	10	10	10	L
Tiempo de fermentación	60	71	71	70	h
PHA	0.7844	2.7000	1.7225	2.1675	± 0.0035 g/L
Producción de PHA	$0.0131 \pm 5.833E-03$	$0.0380 \pm 4.930E-05$	$0.0243 \pm 4.930E-05$	$0.0310 \pm 5.000E-05$	± 0.0035 g/L*h
Biomasa	3.5422	5.8125	3.7025	4.9275	± 0.0035 g/L
Conversión de glicerina	$68.4 \pm 1.71E-03\%$	$80.0 \pm 2.00E-03\%$	$77.0 \pm 1.92E-03\%$	$80.8 \pm 2.02E-03\%$	m/m
$\overline{Y_{px}}$	0.2215 ± 0.0009	0.4645 ± 0.0008	0.4652 ± 0.0014	0.4399 ± 0.0009	m/m
$\overline{Y_{ps}}$	0.0574 ± 0.0002	0.1688 ± 0.0002	0.1119 ± 0.0002	0.1341 ± 0.0002	m/m
$\overline{Y_{xs}}$	0.1966 ± 0.0002	0.3152 ± 0.0002	0.1905 ± 0.0002	0.2567 ± 0.0002	m/m
Conversión de sulfato de amonio	$69 \pm 7.9E-02\%$	$90 \pm 8.4E-02\%$	$80 \pm 8.1E-02\%$	$85 \pm 8.3E-02\%$	m/m
Rango de operación de pH	7.54-5.87	7.53-5.68	7.51-5.15	7.55-5.27	± 0.005
Flujo de aire	-	12	1	5	L/min

Se trabajó a una temperatura de 33 °C, a una agitación constante de 200 rpm y a una presión de 0.83 atm correspondiente a la presión atmosférica de la ciudad de Guatemala para todos los sistemas. Se utilizó glicerina USP 99.7% (m/m). La fermentación correspondiente al sistema 0 se realizó a escala de 0.1 L empleando una incubadora con agitación orbital y se realizó en duplicado, por lo que los resultados reportados son valores promedio. Las fermentaciones correspondientes al sistema 1, 2 y 3 se realizaron a escala de 10 L empleando un biorreactor *Bioflo 415* el cual presenta la posibilidad de configurar un flujo constante de aire en el sistema. Notación empleada: \overline{Y}_{ps} =Rendimiento específico de producto con respecto a sustrato, \overline{Y}_{xs} =Rendimiento específico de biomasa con respecto a sustrato, \overline{Y}_{px} =Rendimiento específico de producto con respecto a biomasa. Fuente: Elaboración propia.

Figura 19. Ajuste del modelo a los datos experimentales de crecimiento microbiano, consumo de glicerina y formación de PHA para el sistema 0



Código de colores:

Puntos negros: datos experimentales de generación de biomasa con respecto al tiempo.

Curva amarilla: modelo del crecimiento celular ajustado por el modelo matemático determinado.

Puntos naranjas: datos experimentales de consumo de glicerina con respecto al tiempo.

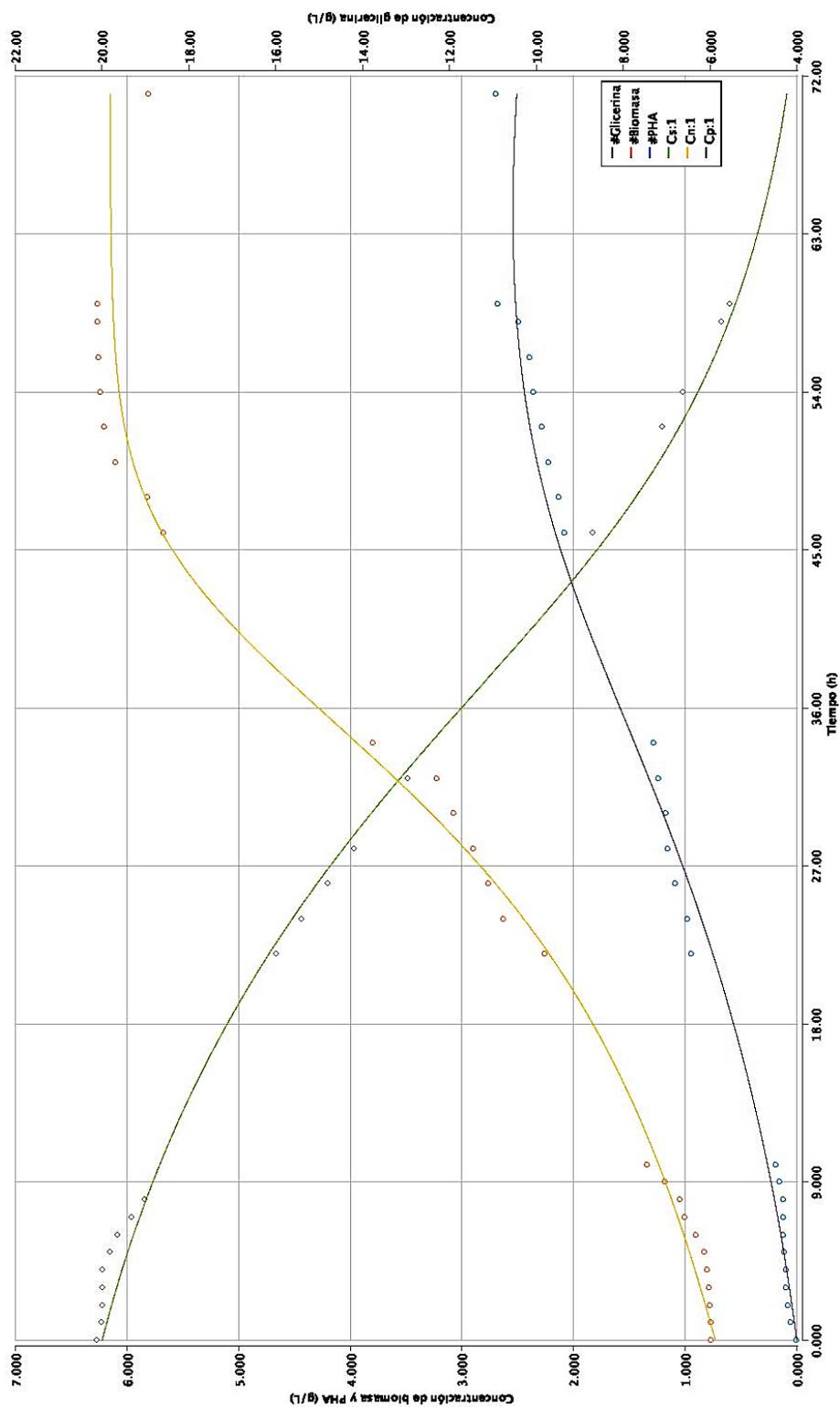
Curva verde: modelo del consumo de sustrato ajustado por el modelo matemático determinado.

Puntos azules: datos experimentales de formación de PHA con respecto del tiempo.

Curva morada: modelo de la formación de producto ajustado por el modelo matemático determinado.

Fuente: Elaboración propia empleando el Software Berkeley Madonna ®.

Figura 20. Ajuste del modelo a los datos experimentales de crecimiento microbiano, consumo de glicerina y formación de PHA para el sistema 1



Código de colores:

Puntos naranjas: datos experimentales de generación de biomasa con respecto al tiempo.

Curva amarilla: modelo del crecimiento celular ajustado por el modelo matemático determinado.

Puntos negros: datos experimentales de consumo de glicerina con respecto al tiempo.

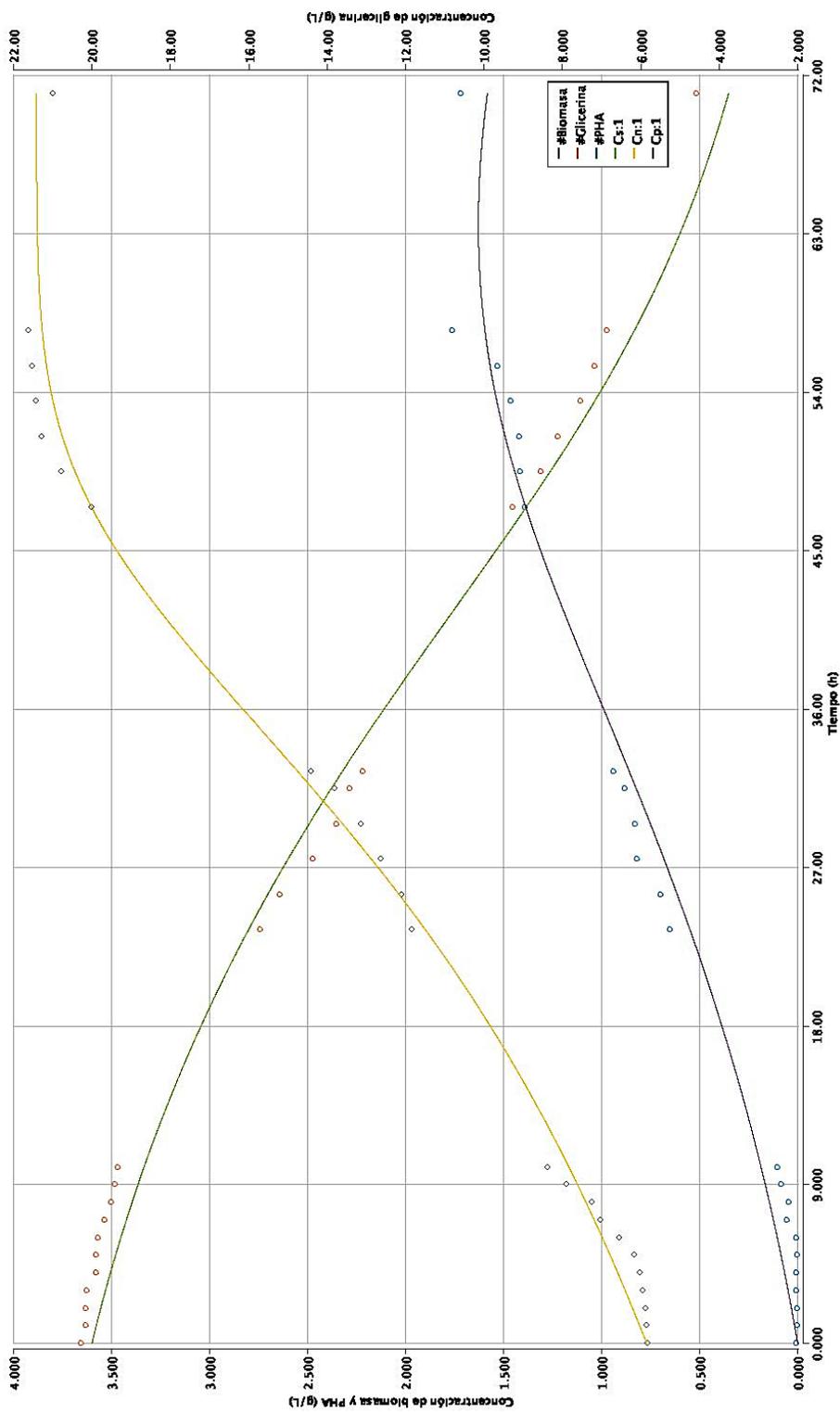
Curva verde: modelo del consumo de sustrato ajustado por el modelo matemático determinado.

Puntos azules: datos experimentales de formación de PHA con respecto del tiempo.

Curva morada: modelo de la formación de producto ajustado por el modelo matemático determinado.

Fuente: Elaboración propia empleando el Software Berkeley Madonna ®.

Figura 21. Ajuste del modelo a los datos experimentales de crecimiento microbiano, consumo de glicerina y formación de PHA para el sistema 2



Código de colores:

Puntos negros: datos experimentales de generación de biomasa con respecto al tiempo.

Curva amarilla: modelo del crecimiento celular ajustado por el modelo matemático determinado.

Puntos naranjas: datos experimentales de consumo de glicerina con respecto al tiempo.

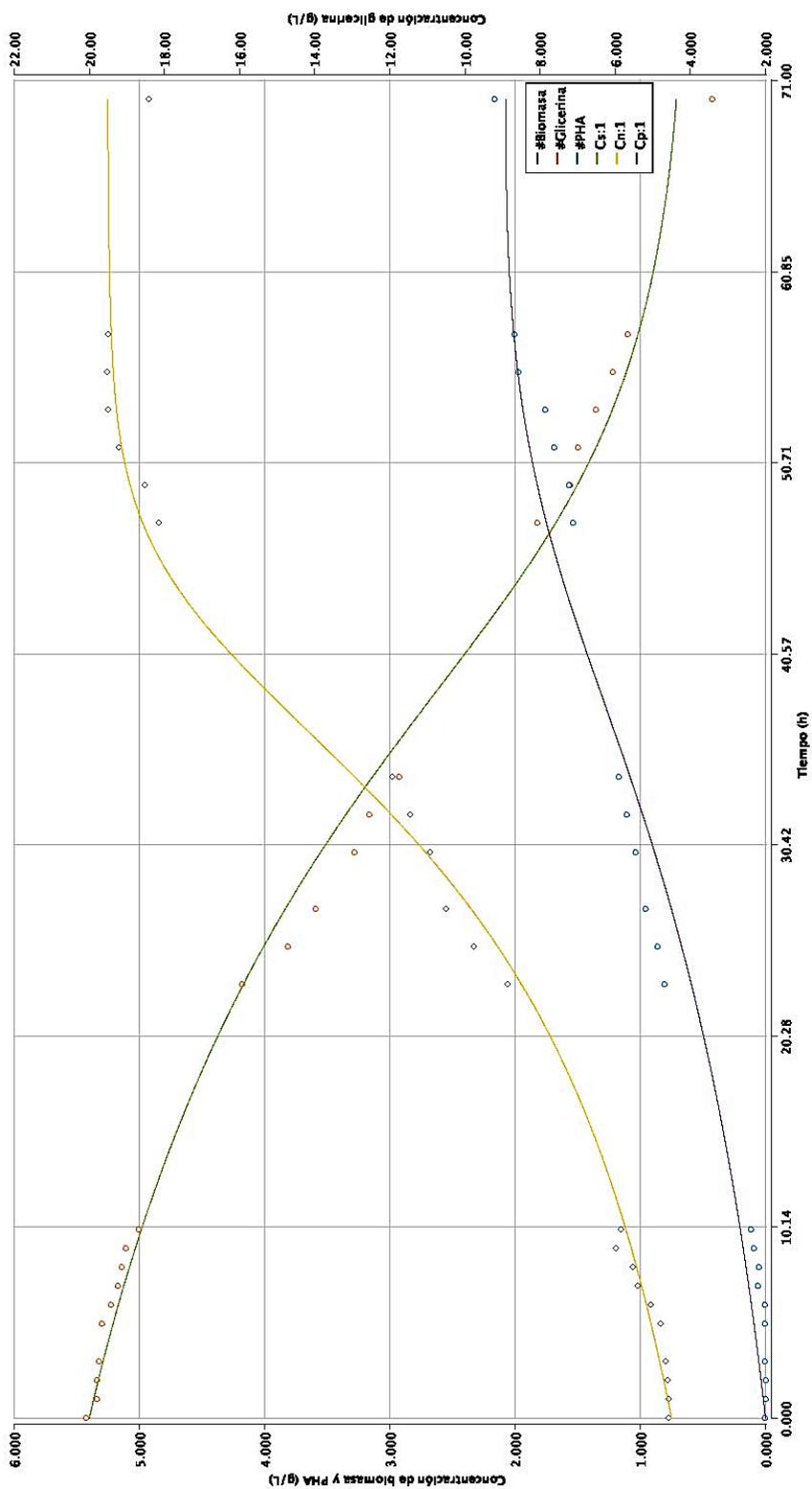
Curva verde: modelo del consumo de sustrato ajustado por el modelo matemático determinado.

Puntos azules: datos experimentales de formación de PHA con respecto del tiempo.

Curva morada: modelo de la formación de producto ajustado por el modelo matemático determinado.

Fuente: Elaboración propia empleando el Software Berkeley Madonna ®.

Figura 22. Ajuste del modelo a los datos experimentales de crecimiento microbiano, consumo de glicerina y formación de PHA para el sistema 3



Código de colores:

Puntos negros: datos experimentales de generación de biomasa con respecto al tiempo.

Curva amarilla: modelo del crecimiento celular ajustado por el modelo matemático determinado.

Puntos naranjas: datos experimentales de consumo de glicerina con respecto al tiempo.

Curva verde: modelo del consumo de sustrato ajustado por el modelo matemático determinado.

Puntos azules: datos experimentales de formación de PHA con respecto del tiempo.

Curva morada: modelo de la formación de producto ajustado por el modelo matemático determinado.

Fuente: Elaboración propia empleando el Software Berkeley Madonna ®.

Ecuación 11. Ecuación velocidad de crecimiento específica del *Bacillus megaterium* ATCC 14581 basada en el modelo cinético de Monod empleada en las ecuaciones cinéticas de formación de PHA, biomasa y consumo de glicerina

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_s}{C_s + K_s}$$

Descripción de variables:

μ : Tasa de crecimiento específica de la biomasa [h^{-1}]

μ_{\max} : Tasa de crecimiento específica máxima de la biomasa [h^{-1}]

C_s : Concentración de glicerina en un determinado instante de tiempo [$g \cdot L^{-1}$]

K_s : Coeficiente constante del modelo de Monod [$g \cdot L^{-1}$]

Cuadro 11. Definición cuantitativa de las constantes cinéticas de la ecuación de la velocidad de crecimiento específica del *Bacillus megaterium* ATCC 14581 basada en el modelo cinético de Monod empleada en las ecuaciones cinéticas de formación de PHA, biomasa y consumo de glicerina

Coeficiente	Valor				Unidad
	Sistema 0	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	
μ_{\max}	0.04438	0.11237	0.05913	0.04711	h^{-1}
K_s	1.84402	33.56712	11.62334	8.5469	$g \cdot L^{-1}$

Fuente: Elaboración propia. Valores obtenidos empleando el Software Berkeley Madonna ®.

Ecuación 12. Ecuación de cinética de formación de PHA en función del tiempo para la producción fermentativa de PHA a partir de glicerina empleando *Bacillus megaterium* ATCC 14581

$$\frac{dC_p}{dt} = \mu * C_n * Y_{px} + j * C_n$$

Descripción de variables:

$\frac{dC_p}{dt}$: Cambio de concentración de producto con el tiempo [$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$]

C_p : Concentración de PHA en un determinado instante de tiempo [$g \cdot L^{-1}$]

C_n : Concentración de biomasa en un determinado instante de tiempo [$g \cdot L^{-1}$]

Y_{px} : Coeficiente de rendimiento de PHA frente a biomasa [m/m]

j : Coeficiente constante [h^{-1}]

Cuadro 12. Definición cuantitativa de las constantes cinéticas de formación de PHA para la producción fermentativa de PHA a partir de glicerina empleando *Bacillus megaterium* ATCC 14581

Coeficiente	Valor				Unidad
	Sistema 0	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	
Y_{px}	0.24998	0.47023	0.48011	0.45054	m/m
j	-0.14451	0.00019869	-0.00233	0.00062933	h^{-1}

Fuente: Elaboración propia. Valores obtenidos empleando el Software Berkeley Madonna ®.

Ecuación 13. Ecuación cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo para la producción fermentativa de PHA a partir de glicerina, empleando *Bacillus megaterium* ATCC 14581

$$\frac{dC_n}{dt} = (\mu * C_n + i * C_s) * \left(\frac{C_s}{C_s + C_{sm}} \right)^k * (w * e^{C_s * g})$$

Descripción de variables:

$\frac{dC_n}{dt}$: Cambio de concentración de biomasa con el tiempo [$g * L^{-1} * h^{-1}$]

i : Coeficiente constante [h^{-1}]

C_{sm} : Coeficiente constante [$g * L^{-1}$]

k : Coeficiente constante [-]

w : Coeficiente constante [-]

g : Coeficiente constante [$L * g^{-1}$]

Cuadro 13. Definición cuantitativa de las constantes cinéticas de crecimiento microbiano para la producción fermentativa de PHA a partir de glicerina, empleando *Bacillus megaterium* ATCC 14581

Coeficiente	Valor				Unidad
	Sistema 0	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	
i	-0.09882	-0.20096	-0.20096	-0.23849	h^{-1}
C_{sm}	-0.86868	-0.47051	-0.47051	-0.51083	$g * L^{-1}$
k	-81.1022	-110.05113	-89.96214	-100.4114	-
w	-46612.25937	-1689.45469	-80.06034	-1661.85811	-
g	-0.59127	-0.46751	-0.34837	-0.49467	$L * g^{-1}$

Fuente: Elaboración propia. Valores obtenidos empleando el Software Berkeley Madonna ®.

Ecuación 14. Ecuación cinética de consumo de glicerina en función del tiempo para la producción fermentativa de PHA empleando *Bacillus megaterium* ATCC 14581

$$\frac{dC_s}{dt} = -\mu \frac{C_n}{Y_{xs}} + h * C_s$$

Descripción de variables:

$\frac{dC_s}{dt}$: Cambio de concentración de glicerina con el tiempo [$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$]

Y_{xs} : Coeficiente de rendimiento de biomasa frente a glicerina [m/m]

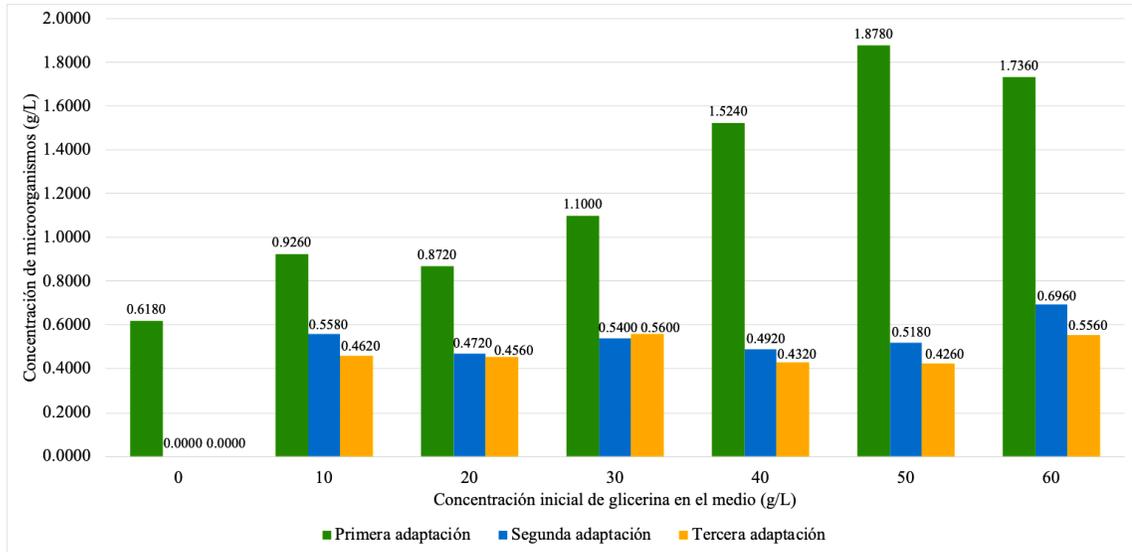
h : Coeficiente constante [h^{-1}]

Cuadro 14. Definición cuantitativa de las constantes cinéticas de consumo de glicerina para la producción fermentativa de PHA, empleando *Bacillus megaterium* ATCC 14581

Coeficiente	Valor				Unidad
	Sistema 0	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	
Y_{xs}	0.21698	0.2945	0.213	0.2231	m/m
h	0.05003	0.0187	0.03516	0.02061	h^{-1}

Fuente: Elaboración propia. Valores obtenidos empleando el Software Berkeley Madonna ®.

Figura 23. Comparación de las adaptaciones realizadas para el crecimiento microbiano de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel



Se trabajó a una temperatura de 33 °C, a una agitación constante de 200 rpm y a una presión de 0.83 atm correspondiente a la presión atmosférica de la ciudad de Guatemala para todos los sistemas. Se utilizó glicerina cruda $92 \pm 0.97\%$ (m/m). El crecimiento se realizó a escala de 0.1 L empleando una incubadora con agitación orbital. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 15. Comparación de la conversión de glicerina cruda del proceso de biodiésel por parte de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 de las adaptaciones realizadas empleando distintas concentraciones iniciales de sustrato

Glicerina inicial (g/L)	Conversión de glicerina (m/m)		
	Primera adaptación	Segunda adaptación	Tercera adaptación
0	0.00 ± 0.00E-03%	0.00 ± 0.00E-04%	0.00 ± 0.00E-04%
10	28.5 ± 1.43E-04%	11.2 ± 5.63E-04%	7.07 ± 3.61E-04%
20	24.0 ± 6.02E-04%	16.3 ± 4.10E-04%	9.58 ± 2.42E-04%
30	31.9 ± 5.31E-04%	14.1 ± 2.36E-04%	10.9 ± 1.83E-04%
40	34.7 ± 4.34E-04%	14.6 ± 1.84E-04%	10.6 ± 1.34E-04%
50	33.2 ± 3.32E-04%	17.3 ± 1.74E-04%	13.7 ± 1.38E-04%
60	38.0 ± 3.17E-04%	17.0 ± 1.42E-04%	19.0 ± 1.59E-04%

Valores obtenidos a partir del consumo determinado de glicerina con respecto a su concentración inicial. Para esto se emplearon concentraciones cuantificadas con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 16. Comparación de producción fermentativa con *Bacillus megaterium* ATCC 14581 empleando distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel a escala de 0.1 L

Glicerina inicial (g/L)	PHA (\pm 0.0028 g/L)	Conversión de glicerina (m/m)	Biomasa (\pm 0.0028 g/L)	Rendimientos (m/m)		
				\bar{Y}_{ps}	\bar{Y}_{xs}	\bar{Y}_{px}
10	0.2100	50.3 \pm 2.51E-03%	1.802	0.0418	0.2519	0.1165
				\pm	\pm	\pm
				0.0006	0.0006	0.0017
20	0.5280	59.9 \pm 1.50E-03%	2.88	0.0441	0.1911	0.1833
				\pm	\pm	\pm
				0.0003	0.0003	0.0011
30	0.2980	50.4 \pm 8.41E-04%	2.588	0.0197	0.1249	0.1151
				\pm	\pm	\pm
				0.0002	0.0002	0.0012
40	0.2320	44.1 \pm 5.51E-04%	1.996	0.0132	0.0737	0.1162
				\pm	\pm	\pm
				0.0002	0.0002	0.0016
50	0.1760	28.3 \pm 2.84E-04%	2.064	0.0124	0.0927	0.0853
				\pm	\pm	\pm
				0.0002	0.0002	0.0015
60	0.0960	16.7 \pm 1.39E-04%	1.888	0.0096	0.1125	0.0508
				\pm	\pm	\pm
				0.0003	0.0003	0.0016

Se trabajó a una temperatura de 33 °C, a una agitación constante de 200 rpm, a una presión de 0.83 atm correspondiente a la presión atmosférica de la ciudad de Guatemala y un tiempo de fermentación de 60 h para todos los sistemas. Se utilizó glicerina cruda $92 \pm 0.97\%$ (m/m). El crecimiento se realizó a escala de 0.1 L empleando una incubadora con agitación orbital. Notación empleada: \bar{Y}_{ps} =Rendimiento específico de producto con respecto a sustrato, \bar{Y}_{xs} =Rendimiento específico de biomasa con respecto a sustrato,

$\overline{Y_{px}}$ =Rendimiento específico de producto con respecto a biomasa. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 17. Balance de masa del sistema 0

Especie	Entradas (g)	Masa consumida/generada (g)	Salidas (g)
Glicerina	2.0000 ± 0.0000	-1.3677 ± 0.0156	0.6324 ± 0.0156
Biomasa	0.0722 ± 0.0131	0.2820 ± 0.0136	0.3542 ± 0.0038
PHA	0.0000 ± 0.0000	0.0784 ± 0.0022	0.0784 ± 0.0022
Nitrógeno	0.1000 ± 0.0000	-0.0690 ± 0.0050	0.0310 ± 0.0050
Mantenimiento celular	0.0000 ± 0.0000	1.0762 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
Total	2.1722 ± 0.0131	0.0000 ± 0.0214	1.0960 ± 0.0170

La diferencia presentada entre el total de entradas y el total de salidas del sistema corresponde al mantenimiento celular del microorganismo durante el tiempo de fermentación. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 18. Balance de masa del sistema 1

Especie	Entradas (g)	Masa consumida/generada (g)	Salidas (g)
Glicerina	200.0000 ± 0.0000	-159.9744 ± 0.0050	40.0256 ± 0.0050
Biomasa	7.7000 ± 0.0350	50.4250 ± 0.0495	58.1250 ± 0.0350
PHA	0.0000 ± 0.0000	27.0000 ± 0.0350	27.0000 ± 0.0350
Nitrógeno	10.0000 ± 0.0000	-9.0000 ± 0.5000	1.0000 ± 0.5000
Mantenimiento celular	0.0000 ± 0.0000	91.5494 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
Total	217.7000 ± 0.0350	0.0000 ± 0.5037	126.1506 ± 0.5025

La diferencia presentada entre el total de entradas y el total de salidas del sistema corresponde al mantenimiento celular del microorganismo durante el tiempo de fermentación. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 19. Balance de masa del sistema 2

Especie	Entradas (g)	Masa	
		consumida/generada (g)	Salidas (g)
Glicerina	200.0000 ± 0.0000	-153.9200 ± 0.0050	46.0800 ± 0.0050
Biomasa	7.7000 ± 0.0350	29.3250 ± 0.0495	37.0250 ± 0.0350
PHA	0.0000 ± 0.0000	17.2250 ± 0.0350	17.2250 ± 0.0350
Nitrógeno	10.0000 ± 0.0000	-8.0000 ± 0.5000	2.0000 ± 0.5000
Mantenimiento celular	0.0000 ± 0.0000	115.3700 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
Total	217.7000 ± 0.0350	0.0000 ± 0.5037	102.3300 ± 0.5025

La diferencia presentada entre el total de entradas y el total de salidas del sistema corresponde al mantenimiento celular del microorganismo durante el tiempo de fermentación. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 20. Balance de masa del sistema 3

Especie	Entradas (g)	Masa	
		consumida/generada (g)	Salidas (g)
Glicerina	200.0000 ± 0.0000	-161.6900 ± 0.0050	38.3100 ± 0.0050
Biomasa	7.7770 ± 0.0350	41.4980 ± 0.0495	49.2750 ± 0.0350
PHA	0.0000 ± 0.0000	21.6750 ± 0.0350	21.6750 ± 0.0350
Nitrógeno	10.0000 ± 0.0000	-8.5000 ± 0.5000	1.5000 ± 0.5000
Mantenimiento celular	0.0000 ± 0.0000	107.0170 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
Total	217.7770 ± 0.0350	0.0000 ± 0.5037	110.7600 ± 0.5025

La diferencia presentada entre el total de entradas y el total de salidas del sistema corresponde al mantenimiento celular del microorganismo durante el tiempo de fermentación. Fuente: Elaboración propia.

VIII. Análisis de resultados

El objetivo general del presente trabajo de graduación consistió en determinar el modelo cinético para la producción fermentativa de polihidroxialcanoato empleando glicerina como fuente de carbono y *Bacillus megaterium* ATCC 14581 como cepa fermentadora a dos diferentes escalas. Para el cumplimiento de lo anterior, fue necesario evaluar y reducir la fase de adaptación del microorganismo en un medio con distintas concentraciones iniciales de glicerina, con el propósito de realizar la preparación de inóculo de las fermentaciones a evaluar. Considerando que el uso de glicerina USP 99.7% (m/m) como fuente de carbono para la fermentación microbiana presenta una desviación en la ruta metabólica general del microorganismo, en donde usualmente se parte de glucosa como sustrato, fue esencial generar la reducción de su fase de adaptación para provocar el consumo inmediato de este sustrato en las fermentaciones realizadas. La utilización de glicerina USP 99.7% (m/m) permitió estudiar los sistemas fermentativos sin la influencia de ningún contaminante proveniente de la fuente de carbono. Posteriormente, se efectuó la evaluación de distintas concentraciones iniciales de glicerina para la producción de PHA. Este estudio se llevó a cabo a una escala de 0.1 L donde el número de condiciones de operación que llegaron a ser controladas fueron limitadas dada la naturaleza del equipo, una incubadora con agitación orbital. La concentración inicial seleccionada fue empleada en una serie de fermentaciones a escala de 10 L empleando un bioreactor marca *Bioflo 145*, donde se evaluaron distintos flujos de aire. La naturaleza de este equipo permitió un mayor control sobre las condiciones de operación. Se cuantificó la formación de PHA, el consumo de glicerina y el crecimiento microbiano a lo largo del tiempo para ambas escalas, a partir de las cuales se generaron los modelos matemáticos respectivos para cada sistema y se determinó la influencia que la escala puede llegar a tener en estas representaciones.

Al partir de glucosa como fuente de carbono, el microorganismo lleva a cabo el proceso de glucólisis como ruta metabólica general para su procesamiento como se muestra en la Figura 2 (referir al apartado de marco teórico). Sin embargo, al partir de glicerina como fuente de carbono, el microorganismo se ve obligado a desviarse inicialmente antes de iniciar el proceso de glucólisis. En primer instancia, es necesario el transporte del glicerol desde el medio de cultivo a través de la membrana citoplasmática empleando la proteína facilitadora de la absorción de glicerol (GlpF). El glicerol intracelular se convierte en gliceraldehído-3-fosfato (GAP) por medio de la acción de tres enzimas: glicerol quinasa (GlpK), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GlpD) y triosafosfato isomerasa (TPI). Este proceso se muestra en la Figura 1 (referir al apartado de marco teórico). El compuesto GAP formado ya es un intermediario en la ruta metabólica de la glucólisis. En este sentido, la reducción de la fase de adaptación del microorganismo a glicerina como único sustrato era necesaria para la preparación de inóculo de las fermentaciones a evaluar, por lo que se estableció que la reducción de la fase de adaptación se generaría hasta una concentración celular final entre 6×10^9 células/L y 7×10^9 células/L en un máximo de 48 h empleando únicamente glicerina como fuente de carbono. Esto, de acuerdo a Blanch y Clark (1997), son las condiciones adecuadas que un inóculo debe presentar para asegurar una cantidad de biomasa viable en una forma fisiológica apropiada para fomentar un proceso fermentativo inmediato que exhiba un rendimiento aceptable de acuerdo a la formación de producto. La reducción se efectuó utilizando una serie consecutiva de adaptaciones para aumentar paulatinamente el volumen de inóculo hasta obtener la concentración microbiana deseada en el tiempo requerido. En cada adaptación realizada se tomó 1% (v/v) de medio de la adaptación anterior para inocular la adaptación posterior. Cabe resaltar que se derivó el inóculo de la adaptación anterior en la fase de crecimiento exponencial, de manera que se presentara una fase de retardo más corta en la adaptación posterior del microorganismo.

En la Figura 17 se muestra la comparación de las curvas de crecimiento celular del microorganismo en un medio que contiene 20 g/L de glicerina de las adaptaciones realizadas. Se determinó que la primera adaptación del microorganismo alcanzó el rango establecido de concentración celular en 60 h. Si bien la fase de adaptación de la primera adecuación muestra una duración relativamente corta de 24 h, no se atribuye este comportamiento únicamente al consumo de glicerina ya que el medio de la primera

adaptación estaba conformado por 10% (v/v) de caldo nutritivo. En este sentido, el microorganismo estaba expuesto a una segunda fuente de carbono que contribuyó a su crecimiento. La incorporación inicial de caldo nutritivo es requerida para generar una propagación inicial del microorganismo, de forma que cuando este sea expuesto únicamente a glicerina como sustrato, se inocule una mayor cantidad de células viables en el medio, en comparación a una inoculación directa únicamente con una unidad formadora de colonia (UFC), y se asegure su crecimiento. Asimismo, en el Cuadro 7 se observa que la primera adaptación presentó una velocidad de crecimiento celular global de $1.0E+08 \pm 5.5E+06 \text{ g} * \text{L}^{-1} * \text{h}^{-1}$. La segunda adaptación realizada demostró una fase de adaptación más prolongada con respecto a la primera, con una duración de 48 h. Es importante notar que en esta adaptación la incorporación de caldo nutritivo se reemplaza por la adición de 10% (v/v) de una solución de sales con elementos traza, cuya composición se muestra en el Cuadro 6. Puesto que la fase de latencia presentada en el crecimiento microbiano se genera principalmente por el transporte de cofactores, aminoácidos e iones intracelulares a través de la membrana celular y hacia el medio fresco de cultivo, la introducción de una solución de sales con elementos trazas provee un medio rico en nutrientes, de forma que el microorganismo puede emplearlos para su metabolismo celular y no se ve obligado a reponer sus reservas antes de iniciar su división celular. No obstante, se obtiene la concentración celular deseada en el inóculo hasta después de 96 h de reacción. Pese a que la solución de sales con elementos trazas evita que la fase de adaptación sea más prolongada, el retardo se genera de igual forma por la expresión obligatoria de determinadas enzimas que el microorganismo se ve forzado a generar para poder procesar la glicerina como fuente de energía para su mantenimiento y crecimiento celular, estas se muestran en la Figura 2 (referir al apartado de marco teórico). Para la segunda adaptación se determinó una velocidad de crecimiento celular global de $6.8E+07 \pm 4.8E+06 \text{ g} * \text{L}^{-1} * \text{h}^{-1}$, siendo considerablemente menor que la primera adaptación debido al aumento en el tiempo global de la misma para alcanzar la concentración celular deseada. Por consiguiente, una tercera adaptación fue requerida la cual se formuló con la misma composición que la segunda. El comportamiento celular presentado fue directamente un crecimiento exponencial de forma que el rango de concentración celular establecido se alcanza en 48 h. El retardo prácticamente se elimina debido a que el microorganismo presenta un historial

reciente de la expresión de las enzimas necesarias para el consumo de glicerina, en consecuencia, la generación de estos catalizadores se realiza de manera más acelerada por lo que el consumo de sustrato y el crecimiento celular es inmediato. Además, se determinó su velocidad de crecimiento celular global de $1.3E+08 \pm 1.1E+07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, la cual aumenta considerablemente con la segunda adaptación debido a la reducción en el tiempo necesario para alcanzar la concentración celular deseada. De modo que, se establece el requerimiento de tres adaptaciones consecutivas del microorganismo a glicerina como fuente de carbono para la preparación de inóculo de las fermentaciones a evaluar en un máximo de 48 h, de forma que este presente una cantidad de biomasa viable en una forma fisiológica adecuada.

En la Figura 18 se observa el crecimiento celular del microorganismo a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina, (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60) g/L, de las tres adaptaciones requeridas para la preparación de inóculo. Los datos presentados son datos promedios ya que se realizó en duplicado; además, se restó un blanco de solución de sales y elementos traza a las cantidades finales para considerar cualquier sólido sedimentable. Se resalta la tendencia general observada de mayor crecimiento celular a mayor concentración inicial de sustrato en el medio para las adaptaciones efectuadas. Se observa mayor crecimiento microbiano en la primera adaptación para todas las concentraciones debido a exposición del microorganismo a una doble fuente de carbono, alcanzando la concentración celular máxima de $4.1184 \pm 0.4673 \text{ g/L}$ para 60 g/L de glicerina en el medio después de 60 h. No obstante, en la segunda adaptación se observa que a pesar que existe crecimiento microbiano en todas las concentraciones, exceptuando para 0 g/L de glicerina en el medio, este disminuye en gran proporción, alcanzando una concentración celular máxima de $1.7382 \pm 0.0999 \text{ g/L}$ para 60g/L de glicerina en el medio después de 96 h. De la misma manera, para la tercera adaptación se presenta crecimiento microbiano en todas las concentraciones iniciales de sustrato, alcanzando un crecimiento máximo de $0.8529 \pm 0.1263 \text{ g/L}$ para 60 g/L de glicerina en el medio después de 48 h. Cabe resaltar que para la medición de concentración microbiana por medio de la técnica de peso seco (referir al apartado de metodología) se busca alcanzar una concentración celular final entre 0.5 g/L y 1 g/L, de acuerdo al estudio realizado por Naranjo *et al.* (2013), para la preparación de inóculo en un tiempo máximo igualmente de 48 h, a fin de asegurar que este presente una

cantidad de biomasa viable en una forma fisiológica adecuada. Se observa que para todas las concentraciones iniciales de glicerina en el medio de la tercera adaptación se alcanzó una concentración microbiana dentro de este rango.

En el Cuadro 8 se muestra la conversión de glicerina para las concentraciones iniciales evaluadas de las tres adaptaciones realizadas. Se observa una tendencia general de mayor conversión de glicerina a mayor concentración inicial en el medio, obteniendo una conversión máxima de $37.6 \pm 3.14E-04\%$ (m/m), $32.2 \pm 2.69E-04\%$ (m/m) y $21.1 \pm 1.77E-04\%$ (m/m) para 60 g/L de glicerina inicial para la primera, segunda y tercera adaptación, respectivamente. Si bien la conversión de glicerina disminuye conforme avanzan las adaptaciones realizadas, los valores obtenidos de conversión no solo aseguran el consumo de glicerina por parte del microorganismo, y por ende su adaptación a glicerina como fuente de sustrato, sino también indican que las conversiones presentadas en la tercera adaptación son suficientes para alcanzar la concentración final de microorganismos requerida para la preparación de un inóculo.

En el Cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de distintas concentraciones iniciales de glicerina, (10, 20, 30, 40 50 y 60) g/L, para la producción de PHA a escala de 0.1L, empleando una incubadora con agitación orbital como equipo auxiliar de fermentación. Se resalta que para todas las fermentaciones se mantuvo la temperatura constante a 33°C, agitación de 200 rpm, inóculo inicial adaptado a glicerina como único sustrato de 8% (v/v) y un tiempo de fermentación de 60 h, con el fin de determinar la influencia de la concentración inicial en los rendimientos obtenidos de la fermentación. Dado que estas se llevaron a cabo empleando Erlenmeyers de 250 mL, es importante notar que no se colocó papel Parafilm alrededor del tapón del mismo, de forma que el microorganismo tuviera acceso a un ingreso arbitrario de aire, permitiendo su respiración celular en todo momento dada su naturaleza aerobia. Se determinó una mayor concentración final de PHA partiendo de una concentración inicial de glicerina de 20 g/L obteniendo 0.7844 ± 0.0031 g/L. Es importante notar que este resultado concuerda con el estudio realizado por Naranjo *et al.* (2013), en donde una concentración inicial de 20g/L presenta la mayor producción de PHA. No obstante, la concentración final de PHA reportada bajo condiciones similares de fermentación es de 3.4 g/L, lo cual es considerablemente mayor al obtenido. La obtención de un bajo rendimiento de PHA se

discute más adelante. Por otra parte, se obtuvo una menor concentración final de PHA a partir de 60 g/L de glicerina inicial, obteniendo 0.1333 ± 0.0031 g/L.

En la misma línea, se obtuvo el mayor rendimiento específico de producto con respecto al crecimiento de biomasa para 20 g/L de glicerina inicial y el menor para 60 g/L de glicerina, obteniendo 0.2215 ± 0.0009 (m/m) y 0.0495 ± 0.0008 (m/m), respectivamente. Por lo tanto, la acumulación intracelular de PHA fue notablemente mayor para 20 g/L de glicerina que para 60 g/L de glicerina inicial. Además, la fermentación a partir de 20 g/L mostró el mayor rendimiento específico de biomasa con respecto a la glicerina con un valor de 0.1966 ± 0.0002 (m/m) y el mayor rendimiento específico de producto con respecto a glicerina con un valor de 0.0574 ± 0.0002 (m/m). En este sentido, se muestra que una mayor concentración inicial de sustrato en el sistema no necesariamente implica un aumento en los rendimientos específicos de la fermentación.

Si bien se obtiene la mayor concentración final de biomasa para 40 g/L de glicerina inicial de 4.1578 ± 0.0031 g/L, esta no presenta el mayor rendimiento específico de producto con respecto al crecimiento de biomasa ya que se obtiene un valor de 0.1197 ± 0.0008 (m/m), siendo este menor al obtenido por 20 g/L de glicerina inicial. En este sentido, se observa que una mayor reproducción celular no implica necesariamente una mayor generación de PHA por medio del microorganismo. La generación de producto no presenta un comportamiento asociado al crecimiento celular. Este comportamiento coincide con lo investigado, ya que la generación de PHA a partir de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 ocurre cuando en el medio existe un exceso de sustrato y una limitante en la fuente de nitrógeno. El microorganismo frente a una limitación de nitrógeno se ve obligado a almacenar energía de alguna manera para subsistir ya que este compuesto es el responsable de habilitar la síntesis de proteínas, aminoácidos, ADN y ARN. Por lo tanto, se habilita la producción y almacenamiento de PHA como reserva de energía. Dado que la fuente de nitrógeno permanece constante, 1 g/L, para todas las fermentaciones y se obtiene del sulfato de amonio contenido en la solución de sales con elementos traza (referirse al apartado de metodología), se asume que la mayor producción de PHA se dicta exclusivamente por la concentración inicial en el comparativo realizado.

Si bien se observa, que a mayor concentración inicial de sustrato, mayor es la producción de biomasa, este comportamiento se presenta hasta una concentración de 40 g/L de glicerina. A partir de este valor, a medida que se aumenta la concentración inicial de sustrato, la producción de biomasa disminuye, produciendo para 60 g/L únicamente 2.6911 ± 0.0031 g/L de biomasa. Este comportamiento se debe a la posible inhibición del crecimiento celular por parte de un exceso de sustrato en el medio fermentativo. Esta inhibición también genera una disminución en la conversión de glicerina, indicando que esta siendo subutilizada en el sistema; obteniendo una conversión de $18.5 \pm 1.55E-04\%$ (m/m) para 60 g/L de glicerina inicial. Por otro lado, se obtiene la mayor conversión de sustrato de $79.0 \pm 3.95E-03\%$ (m/m) para una concentración inicial de 10 g/L. Dicha conversión se atribuye a la concentración inicial empleada, no obstante, no promueve necesariamente la producción de PHA. Al estar fuertemente ligada la formación del biopolímero a la relación en exceso de carbono y escasez de nitrógeno, el alto consumo de glicerina genera un déficit de sustrato en el medio lo cual no promueve una alta formación de producto, obteniendo 0.2533 ± 0.0031 g/L de PHA. Por lo tanto, el comparativo realizado resulta en la selección de 20g/L de glicerina cómo la condición más favorable para la formación de producto. Es importante mencionar que la fermentación empleando esta concentración se realizó en duplicado para la verificación del método, por lo que los resultados mostrados en el Cuadro 9 para 20 g/L de glicerina y en el Cuadro 10 para el sistema 0 son datos promedio. Su respectivo balance de masa se muestra en el Cuadro 17.

Se prosiguió a realizar experimentaciones empleando la concentración inicial determinada de 20 g/L de glicerina a escala de 10 L empleando un bioreactor marca *Bioflo 145*. De igual forma, se llevó a cabo la cuantificación de PHA, biomasa y glicerina a lo largo del tiempo para la generación del modelo cinético. Las fermentaciones efectuadas a esta escala se realizaron por un máximo de 71 h, con el propósito de asegurar que el crecimiento microbiano se desarrollara completamente y alcanzara su fase final de muerte de manera que este comportamiento se pudiera incluir en el modelo cinético generado. Además, los sistemas analizados a esta escala se realizaron bajo las mismas condiciones de operación que las experimentaciones ejecutadas a escala de 0.1L, con la excepción de la introducción de un flujo de aire distinto para cada sistema. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 10.

Para el sistema 1 se efectuó la introducción de un flujo de aire de 12 L/min. Se decidió estudiar la influencia de esta magnitud de flujo en el sistema fermentativo ya que este se empleó en el estudio generado por Naranjo *et al.* (2013). Se determinó una concentración final de PHA de 2.7000 ± 0.0035 g/L y una concentración final de biomasa de 5.8125 ± 0.0035 g/L. Ambos presentan valores significativamente mayores en comparación con los obtenidos por el sistema 0. Además, la conversión de la fuente de nitrógeno, sulfato de amonio, fue de $90 \pm 8.4E-02\%$ (m/m), cuyo valor es significativamente mayor que la conversión de $69 \pm 7.9E-02\%$ (m/m) obtenida por el sistema 0. Se infiere que la baja conversión de nitrógeno en el sistema 0 se atribuye a que el crecimiento celular alcanzó su fase estacionaria debido a la limitación de oxígeno en el sistema y no debido a una limitación de nitrógeno. Dada la naturaleza del equipo empleado para la fermentación, el flujo de aire en el sistema dependía de la apertura arbitraria que poseía el tapón con respecto al Erlenmeyer utilizado. En este sentido, el oxígeno disponible era escaso, arbitrario y variable, siendo este el nutriente limitante en el medio, lo cual restringió la respiración celular aerobia por parte del microorganismo. Esto limitó la conversión de nitrógeno, por lo que el microorganismo no tuvo la necesidad de almacenar intracelularmente altas cantidades de energía en forma de PHA, disminuyendo la concentración final obtenida de producto. Por lo tanto, se obtuvo un rendimiento específico de producto con respecto a biomasa de 0.4645 ± 0.0008 (m/m), lo cual indica que la acumulación intracelular de PHA se duplicó para el sistema 1 en relación al sistema 0 que presentó un rendimiento específico de 0.2215 ± 0.0009 (m/m). Asimismo, se presentó un mayor rendimiento específico de producto con respecto a sustrato de 0.1688 ± 0.0002 (m/m) y un mayor rendimiento específico de biomasa con respecto a sustrato de 0.3152 ± 0.0002 (m/m) en comparación con los rendimientos del sistema 0 mencionados anteriormente. Es importante recalcar que la presencia de oxígeno en el medio también promueve la oxidación de la glicerina en los compuestos intermedios de la ruta metabólica del microorganismo para la posterior formación de PHA. Esto justifica la mayor conversión de sustrato obtenida por el sistema 1 de $80.0\% \pm 2.00E-03\%$ (m/m) en comparación a la menor conversión de glicerina obtenida por el sistema 0 de $68.4 \pm 1.71E-03\%$ (m/m).

Por lo contrario, es sustancial recalcar que el flujo de aire empleado para el sistema 1 presentó cualitativamente un comportamiento turbulento en el medio fermentativo. Si bien, de manera inicial este régimen de flujo fomentó un sistema homogéneo, la temperatura de 33°C del sistema dio como resultado aire con niveles altos de humedad, lo que a su vez condujo a un alto contenido de agua en el gas de escape y, consecuentemente, generó una disminución en el volumen efectivo de fermentación. Se observó que la disminución en el contenido de agua del sistema provocó que el medio presentara una consistencia de mayor densidad y viscosidad. El incremento de viscosidad en la solución pudo resultar en un mezclado menos eficiente, y, por consiguiente, en un líquido relativamente heterogéneo donde se deduce que la resistencia a la transferencia de masa por parte de la fase líquida aumentó. Por lo que se limitó la transferencia de masa del microorganismo, del sustrato, de los nutrientes y del oxígeno a través de la solución donde la transferencia de calor también se vio restringida; estos factores presentaron un impacto negativo en los rendimientos específicos de la fermentación por lo que se obtuvieron valores menores que los reportados en el estudio generado por Naranjo *et al.* (2013). El balance de masa respectivo de este sistema se muestra en el Cuadro 18.

De manera complementaria, para el sistema 2 se realizó una modificación del flujo de aire a un valor de 1 L/min. Se determinó la concentración final de PHA como 1.7225 ± 0.0035 g/L y la concentración final de biomasa como 3.7025 ± 0.0035 g/L. Ambos valores presentaron una disminución con respecto al sistema 1 pero un aumento con respecto al sistema 0. El régimen de aire empleado presentó de manera cualitativa un comportamiento laminar en la solución fermentativa por lo que el volumen efectivo no presentó una variación significativa a raíz de la transferencia de masa de agua de la fase líquida hacia el gas de escape. No obstante, la reducción del flujo de aire resultó en un rendimiento específico de biomasa con respecto a glicerina menor con respecto al sistema 1 de 0.1905 ± 0.0002 (m/m). Sin embargo, cabe resaltar que el rendimiento específico de producto con respecto a biomasa se mantuvo relativamente igual con un valor de 0.4652 ± 0.0014 (m/m), por lo que la acumulación intracelular de PHA se mantiene, más no se alcanzan las mismas concentraciones finales de producto y biomasa del sistema 1 como se mencionó previamente. Se obtuvo una conversión de sustrato de $77.0 \pm 1.92E-03\%$ (m/m); su disminución con respecto al sistema 1 se atribuye a el descenso en el régimen de aire

empleado y al decremento en la generación de biomasa. Adicionalmente, la menor conversión de nitrógeno de $80 \pm 8.1E-02\%$ refleja la disminución en la generación final de producto. Por consiguiente, se determinó que la disminución en la disponibilidad de oxígeno en el sistema fermentativo provocó una disminución general en los rendimientos específicos de la fermentación. El balance de masa respectivo de este sistema se muestra en el Cuadro 19.

Para el sistema 3 se empleó un flujo de 5 L/min, un valor intermedio entre el sistema 1 y el sistema 2. El aumento en el flujo de aire con respecto al sistema 2 permitió la obtención de una mayor concentración final de PHA de 2.1675 ± 0.0035 g/L y una mayor concentración final de biomasa de 4.9275 ± 0.0035 g/L. El régimen de aire empleado presentó de manera cualitativa un comportamiento levemente turbulento en la solución por lo que fomentó un medio de fermentación relativamente homogéneo lo cual propició la transferencia de masa por parte de la fase líquida. Además, no se observó una variación significativa en el volumen efectivo de fermentación a raíz de la transferencia de masa de agua de la fase líquida hacia el gas de escape. En este sentido, se obtuvo un mayor rendimiento específico de biomasa con respecto a glicerina de 0.2567 ± 0.0002 (m/m). De igual manera, se determinó una mayor conversión de nitrógeno de $85 \pm 8.3E-02\%$ (m/m) lo cual se refleja en un mayor rendimiento específico de PHA con respecto a glicerina que se determinó como 0.1341 ± 0.0002 (m/m). Se recalca que el incremento en la disponibilidad de oxígeno también generó un aumento en la conversión de glicerina, obteniendo un valor de $80.8 \pm 2.02E-03\%$ (m/m) debido a su capacidad oxidativa y a la habilitación de una mayor respiración celular por parte del microorganismo. De modo que, se demuestra que el aumento de oxígeno presente en el sistema resulta en el incremento de los rendimientos específicos de la fermentación. El balance de masa respectivo de este sistema se muestra en el Cuadro 20.

Debido a que el objetivo de la fermentación microbiana consistió principalmente en la formación de PHA, fue pertinente el análisis adicional de la fuente de sustrato a transformar en producto y del comportamiento microbiano resultante de ello en el tiempo. Este estudio habilitó la obtención de un modelo matemático que contempla la representación de los datos experimentales medidos para la predicción de estas variables con el tiempo. En este sentido, a partir de las muestras obtenidas, se generó un gráfico

dónde se muestra el ajuste del modelo matemático a los valores experimentales de consumo de glicerina, generación de microorganismo y formación de PHA en el tiempo empleando el Software Berkley Madonna ®; el sistema 0 se observa en la Figura 19, el sistema 1 en la Figura 20, el sistema 2 en la Figura 21 y el sistema 3 en la Figura 22. Se recalca que las variables cuantificadas de los cuatro sistemas analizados exhiben un comportamiento similar, específicamente, se resalta la presencia de un crecimiento microbiano asociado al consumo de glicerina a lo largo del tiempo. Esto habilitó la posibilidad de representar todos los sistemas bajo el mismo modelo cinético pero con la obtención de diferentes parámetros cinéticos característicos de cada sistema. En este sentido, la construcción del modelo cinético se basó en el modelo de Monod descrito en la ecuación 11, el cual establece que la determinación del comportamiento de un solo sustrato, C_s , es suficiente para determinar la velocidad específica de crecimiento celular, μ , y que los inhibidores de crecimiento se encuentran a bajas concentraciones en el medio; siendo ambos casos verdaderos para los sistemas estudiados. Dicho modelo se compone de dos parámetros cinéticos característicos: la tasa de crecimiento específica máxima de la biomasa, μ_{max} , y el coeficiente constante del modelo de Monod, K_s , cuyos valores se presentan en el Cuadro 11. Se obtuvo el menor valor de K_s para el sistema 0 de $1.84402 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, lo cual indica que este sistema presenta la mayor afinidad con respecto al sustrato empleado. Este comportamiento se debe principalmente a que la mayoría del crecimiento celular presentado en el sistema 0 se debe al consumo de glicerina y no a la respiración celular proveniente del oxígeno en el sistema dada la restricción de aire que presentaba el mismo como se mencionó anteriormente. De manera contraria, el sistema 1 presentó el mayor valor de K_s , siendo este de $33.56712 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, representando una menor afinidad por el sustrato dada la abundancia de oxígeno en el medio que resultó en un alto crecimiento celular. De igual forma, se obtuvo el menor valor de μ_{max} para el sistema 0 de 0.04438 h^{-1} dado que exhibió la menor concentración final de biomasa resultado de la restricción de oxígeno en el sistema. Por otro lado, el sistema 1, el cual operó con la mayor disponibilidad de oxígeno en comparación a los demás, mostró la mayor μ_{max} de 0.11237 h^{-1} . En ese marco, se recalca que el equipo empleado en la fermentación a escala de 0.1 L presenta una limitante con respecto al suministro de oxígeno en el medio, la cual no se presenta en las fermentaciones a escala de 10 L, provocando una modificación brusca de los parámetros cinéticos de reacción. De la

misma manera, la variación en el parámetro de μ_{\max} se pudo haber visto influenciado por la heterogeneidad de la temperatura en el sistema 0. El equipo empleado a esta escala posee un control de temperatura con respecto al aire del exterior del Erlenmeyer, no precisamente con respecto al interior del sistema. Por consiguiente, se pudo haber presentado una temperatura menor dentro del mismo que la temperatura medida por el equipo. Sin embargo, este inconveniente se elimina en las fermentaciones a escala de 10 L, dado que el reactor posee un control de temperatura interno, lo cual permite una lectura más cercana a la realidad y un control más preciso.

Partiendo de esta definición, se propuso la ecuación cinética de formación de producto en función del tiempo que se muestra en la ecuación 12. Dicha ecuación se compone de dos parámetros cinéticos: el coeficiente de rendimiento de producto con respecto a biomasa, Y_{px} , y un modificador constante, j , cuyos valores se presentan en el Cuadro 12. Se observa que la generación de PHA en el tiempo equivale a la velocidad específica de crecimiento celular por la concentración celular en determinado instante de tiempo, C_n , tomando en cuenta el parámetro Y_{px} . Además, su formación posee una dependencia adicional con respecto a C_n , la cual sufre una modificación por una constante j . Se infiere que esta última dependencia con respecto a la biomasa se incluye dada la acumulación intracelular que ocurre por parte del producto, más no precisamente por una producción asociada al crecimiento. Se examina que el sistema 2 presenta el mayor valor de Y_{px} de 0.4811 (m/m) lo cual concuerda, con una ligera variación, con el valor calculado experimentalmente mostrado en el Cuadro 10 y discutido previamente. De igual forma, el sistema 0 presenta el menor valor de Y_{px} de 0.24998 (m/m), el cual también presenta concordancia.

Asimismo, se propuso la ecuación cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo la cual se presenta en la ecuación 13. Se señala que la generación de biomasa en el tiempo equivale nuevamente a la velocidad específica de crecimiento celular por la concentración celular en determinado instante de tiempo. Además, se introduce la dependencia con respecto a la concentración de sustrato en determinado tiempo que sufre una modificación por una constante i . Como se mencionó anteriormente, se observa un crecimiento celular asociado al consumo de sustrato a lo largo del tiempo, por lo tanto, se

incluye la modificación presentada por el segundo término de la ecuación que se compone por C_s y dos constantes cinéticas, C_{sm} y k . La introducción de este término se realizó tomando de referencia las modificaciones realizadas a la velocidad específica de crecimiento celular por Blanch y Clark (1997) para la incorporación de la dependencia ya sea de la concentración de producto o de sustrato. De igual forma, se resalta la última modificación a la ecuación cinética realizada por un término de carácter exponencial que contempla nuevamente C_s y dos constantes cinéticas, w y g . La introducción de este término permite representar la finalización de la fase exponencial de crecimiento celular de forma que el modelo, a partir de ese punto, adquiera la forma característica de una curva de crecimiento celular que se encuentra en fase estacionaria. Las constantes cinéticas permiten que este decaimiento se ajuste de mejor manera a los datos experimentales. En el Cuadro 13 se presentan los valores de los parámetros cinéticos ya mencionados. Se denota que el sistema 0 posee el valor más alto de w de -46612.25937. Esto se debe a que se alcanza de manera más acelerada la fase de crecimiento estacionaria debido a la limitante de oxígeno, contrario a los valores de w observados en el Cuadro 13 para los demás sistemas, los cuales presentan magnitudes menores.

Por último, se propone la ecuación cinética de consumo de glicerina en función del tiempo la cual se muestra en la ecuación 14. Se presenta que el consumo de sustrato en el tiempo equivale al negativo de μ por C_n , tomando en cuenta el parámetro cinético del coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a glicerina, Y_{xs} . Cabe resaltar que el negativo de la ecuación permite representar el decremento de la concentración de sustrato a lo largo del tiempo. De igual manera, para habilitar un mejor ajuste del modelo a los datos experimentales, se incorporó una segunda dependencia con respecto a C_s , la cual sufre una modificación por una constante de proporcionalidad, h , que modifica la dependencia de C_s sobre el modelo. Los valores obtenidos de los parámetros cinéticos se presentan en el Cuadro 14. Se denota que el sistema 0 muestra el mayor valor de h de 0.05003 h^{-1} , indicando una mayor dependencia con respecto a C_s . Esto muestra concordancia ya que este sistema presenta la mayor afinidad al sustrato en comparación a los demás como se mencionó anteriormente. Se examina que el sistema 1 presenta el mayor valor de Y_{xs} de 0.2945 (m/m) el cual concuerda, con una ligera variación, con el valor calculado experimentalmente mostrado en el Cuadro 10. De manera contraria, se observa que el

sistema 2 posee el menor valor de Y_{xs} de 0.213 (m/m), el cual también presenta concordancia.

De manera complementaria, se realizó un estudio exploratorio y preliminar del crecimiento de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio de cultivo a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda $92 \pm 0.97\%$ (m/m), (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60) g/L. Esta glicerina cruda fue obtenida del proceso de producción de biodiésel realizado internamente en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Esta fuente de carbono fue sometida a una serie de operaciones unitarias para su purificación, se resaltan las siguientes: acidificación empleando ácido clorhídrico 32% (v/v), extracción líquido-líquido, neutralización empleando hidróxido de sodio, filtración, evaporación de agua, dilución en metanol, adsorción utilizando carbón activado y evaporación de metanol. Se observa en el Figura 23 los crecimientos obtenidos a partir de todas las concentraciones iniciales de glicerina cruda de las tres adaptaciones establecidas para la preparación de un inóculo. Si bien se resalta que se presentó crecimiento microbiano a partir de esta fuente de carbono, lo cual se justifica con la conversión de glicerina determinada y presentada en el Cuadro 15, las concentraciones finales de biomasa obtenidas fueron menores que las presentadas anteriormente a partir de glicerina USP. Este comportamiento se debe al posible contenido en la glicerina de ceniza, metales pesados, componentes clorados, entre otros que presenten una fuente de contaminación y de inhibición para el microorganismo. Se resalta de la Figura 23 que no se alcanza la concentración celular final deseada para la preparación de inóculo para la mayoría de escenarios, entre 0.5 g/L y 1 g/L. Se propone estudiar el crecimiento celular empleando tiempos de reacción mayores a 60 h para alcanzar la concentración final deseada, o incluso estudiar la posibilidad de una cuarta adaptación a la fuente de carbono. Asimismo, se estudió de manera preliminar y exploratoria la fermentación de esta glicerina cruda a distintas concentraciones inicial, (10, 20, 30, 40, 50 y 60) g/L, para la producción de PHA. Los resultados obtenidos se observan en el Cuadro 16. Se destaca que se obtuvo la mayor producción de PHA de 0.5280 ± 0.0028 g/L nuevamente para la concentración inicial de 20 g/L en comparación con las demás concentraciones. No obstante, se presenta un rendimiento específico de producto con respecto a biomasa menor de 0.1833 ± 0.0011 (m/m). Si bien se obtuvo producción de PHA a partir de las diversas concentraciones, las

concentraciones finales obtenidas de productos fueron menores que las obtenidas a partir de glicerina USP. De la misma manera, se denota que a medida que se aumenta la concentración inicial de glicerina cruda en el medio a partir de 20 g/L, la concentración de biomasa final obtenida comienza a descender hasta obtener 1.888 ± 0.0028 g/L para 60 g/L de concentración inicial. Asimismo, la conversión de la fuente de carbono comienza a descender hasta alcanzar para 60 g/L el menor valor de $16.7 \pm 1.39E-04\%$. Estos comportamientos nuevamente se justifica con el posible contenido de componentes contaminantes en la fuente de carbono, los cuales provocan una interferencia con el desarrollo y crecimiento del microorganismo. La futura caracterización de esta fuente de carbono podría proveer un mayor entendimiento del sistema de manera que se permitan estudiar posibles métodos para el mejoramiento de los rendimientos. No obstante, se resalta la importancia de la exploración realizada con este sustrato, ya que precisamente representa un residuo agroindustrial, que si bien sufrió una serie de operaciones unitarias para eliminar contaminantes, las cuales pueden asociar un costo a esta fuente de carbono, se presenta un uso preliminar para este subproducto, al cual actualmente no se le otorga ninguna aplicación relevante posterior.

La caracterización del producto obtenido de los sistemas fermentativos estudiados se realizó por medio de un análisis de espectroscopia FTIR (referirse al apartado de metodología). Los espectros obtenidos para el sistema 0, 1 2 y 3 y para la fermentación a partir de glicerina del proceso de biodiésel se muestran en las figuras 27, 28, 29, 30 y 31, respectivamente (referirse al apartado de anexos). Los gráficos obtenidos fueron comparados con un espectro estándar de PHA el cual se muestra en la Figura 32. En este, se resalta principalmente la presencia del pico en el número de onda 1710.32 cm^{-1} , el cual corresponde al enlace doble entre el carbono y el oxígeno contenido en los enlaces tipo éster que se forman a partir de los monómeros constituyentes del PHA. En los espectros obtenidos se resalta la presencia de este pico característico en el número de onda 1683.99 cm^{-1} , 1722.54 cm^{-1} , 1684.82 cm^{-1} , 1637.21 cm^{-1} y 1638.91 cm^{-1} para el sistema 0, 1 2 y 3 y para la fermentación a partir de glicerina del proceso de biodiésel, respectivamente. La discrepancia en el número de onda observado se puede deber principalmente a impurezas oxidadas en la muestra analizada, las cuales generan una disminución en la intensidad de la absorción del enlace carbonilo y también una absorción

relativamente ancha. De igual forma, se resalta la presencia de un pico en el número de onda de 3456.71 cm^{-1} , 3454.12 cm^{-1} , 2959.05 cm^{-1} , 3460.69 cm^{-1} y 3266.76 cm^{-1} para el sistema 0, 1 2 y 3 y para la fermentación a partir de glicerina del proceso de biodiésel, respectivamente. Se denota la absorción ancha y débil de este pico el cual puede deberse a la presencia de trazas de agua en la muestra analizada. En términos generales, se distingue la presencia de un producto en todos los sistemas compuesto por un enlace carbonilo, el cual puede corresponder a un enlace tipo éster, característico de los monómeros constituyentes de PHA. Las discrepancias entre los espectros obtenidos y el estándar analizado se debe principalmente a las impurezas contenidas en las muestras analizadas resultado del proceso de lisis celular y de extracción del producto. Se resalta la importancia en futuras investigaciones de realizar un estudio exploratorio de diversas técnicas de extracción y de purificación del producto obtenido con el fin de obtener un compuesto con una menor cantidad de impurezas.

Dada la naturaleza poco coloreada y levemente transparente de la fuente de carbono, la determinación de concentración celular en función del tiempo para las fermentaciones realizadas tuvieron que limitarse al método de peso seco (referirse al apartado de metodología); ya que tecnologías más avanzadas de alta sensibilidad para conteo microbiano emplean técnicas de detección por fluorescencia y tecnología de micro capilaridad. En este sentido, se debe considerar que la cuantificación por peso seco contempla la población total de células en el medio, considerando las células viables y las no viables. Además, el secado requerido por el método resulta en la cuantificación de células deshidratadas, despreciando el peso que aporta el agua a las mismas. De igual manera, la evaporación del agua del medio en las fermentaciones a escala de 10 L llegaron a provocar una ligera concentración de la solución fermentativa, en ese marco, las concentraciones determinadas presentan una ligera variación con respecto a las concentraciones reales basadas en un volumen inicial mayor. En futuros estudios, esta variación de volumen puede llegar a cuantificarse de manera más precisa de forma que sea incluida en el modelo cinético determinado para aumentar la predictibilidad de las variables con el tiempo.

IX. Conclusiones

1. Se estableció el requerimiento de tres adaptaciones consecutivas para reducir la fase de adaptación de crecimiento del microorganismo *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio que contiene glicerina para la preparación de un inóculo donde se determinó la velocidad de crecimiento celular global como $1.0E+08 \pm 5.5E+06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en 60 h para la primera adaptación, $6.8E+07 \pm 4.8E+06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en 96 h para la segunda adaptación y $1.3E+08 \pm 1.1E+07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en 48 h para la tercera adaptación.
2. Se determinó del comparativo realizado de concentraciones iniciales para la producción fermentativa de PHA a escala de 0.1 L, que la concentración inicial de 20 g/L de glicerina produce la concentración final más alta de producto con un valor de $0.7844 \pm 0.0031 \text{ g/L}$. Además, de las concentraciones iniciales analizadas, presentó el mayor rendimiento específico de producto con respecto al crecimiento de biomasa de $0.2215 \pm 0.0009 \text{ (m/m)}$, el mayor rendimiento específico de biomasa con respecto al consumo de glicerina con un valor de $0.1966 \pm 0.0002 \text{ (m/m)}$ y el mayor rendimiento específico de producto con respecto al consumo de glicerina con un valor de $0.0574 \pm 0.0002 \text{ (m/m)}$.
3. Se determinó del comparativo realizado para la producción fermentativa de PHA a escala de 10 L, que el sistema 1 donde se empleó un flujo de aire de 12 L/min presentó la mayor concentración final de PHA de $2.7000 \pm 0.0035 \text{ g/L}$ y de biomasa de $5.8125 \pm 0.0035 \text{ g/L}$ y el mayor rendimiento específico de producto con respecto a sustrato de $0.1688 \pm 0.0002 \text{ (m/m)}$.
4. Se generó un modelo cinético basado en el modelo de Monod, el cual por medio de modificaciones específicas en las ecuaciones de formación de PHA, de generación de biomasa y de consumo de glicerina en función del tiempo (referirse a la ecuación 12, 13 y 14, respectivamente), logró presentar

predictibilidad para los sistemas analizados a escala de 0.1 L y a escala de 10 L a través de variaciones entre los parámetros cinéticos característicos de cada sistema.

5. Se determinó que el sistema 1, el cual operó con la mayor disponibilidad de oxígeno en comparación a los demás, mostró la mayor la tasa de crecimiento específica máxima de la biomasa, μ_{\max} , de 0.11237 h^{-1} y el mayor valor de la constante de Monod, K_S , de $33.56712 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.
6. Se estableció que las variaciones presentadas de los parámetros cinéticos característicos entre el sistema a escala de 0.1 L y los sistemas a escala de 10 L (referirse a los cuadros 12, 13 y 14) se deben principalmente al incremento en la disponibilidad y control de oxígeno, al incremento en la resistencia a la transferencia de masa de la fase líquida dado un aumento en la viscosidad y el régimen de flujo observado y al incremento en el control interno de temperatura de los sistemas a escala de 10 L dada la naturaleza del biorreactor empleado, lo cual resultó en un incremento general de los rendimientos específicos de las fermentaciones a esta escala.
7. Se determinó del comparativo realizado de concentraciones iniciales para la producción fermentativa de PHA a escala de 0.1 L empleando glicerina cruda del proceso de biodiésel, que la concentración inicial de 20 g/L de glicerina produce la concentración final más alta de producto con un valor de $0.5280 \pm 0.0028 \text{ g/L}$, siendo esta menor que la obtenida a partir de glicerina USP.

X. Recomendaciones

1. Realizar estudios de secuencia genética e identificación enzimática con la finalidad de determinar de manera más precisa la ruta metabólica adquirida por el microorganismo *Bacillus megaterium* ATCC 14581 para obtener una mayor claridad sobre las enzimas involucradas tanto en el procesamiento de glicerina como fuente de carbono como en la formación de PHA como fuente de almacenamiento de energía. Esto con el fin de estudiar una posible modificación genética del microorganismo para reducir aún más su fase de adaptación de crecimiento a través de un consumo más acelerado de glicerina y también con el fin de aumentar la formación de PHA.
2. Evaluar la preservación del microorganismo *Bacillus megaterium* ATCC 14581 una vez realizado el proceso establecido de adaptación a glicerina como fuente de carbono para emplearlo directamente en procesos fermentativos y examinar su impacto en los rendimientos específicos en relación a la producción de PHA, generación de biomasa y consumo de glicerina.
3. Explorar técnicas para la medición de oxígeno disuelto en función del tiempo en el sistema con el propósito de estudiar la variación en las condiciones de respiración que se presentan en el medio fermentativo y examinar su posible incorporación al modelo cinético propuesto para la comparación de su influencia entre escalas.
4. Evaluar los rendimientos específicos en relación a la producción de PHA, generación de biomasa y consumo de glicerina empleando variaciones en la relación carbono-nitrógeno, carbono-fósforo, carbono-azufre, entre otros nutrientes relevantes contenidos en la solución de sales del sistema fermentativo y evaluar su cuantificación en función del tiempo para considerar su incorporación en el modelo cinético. En la misma línea, explorar distintas fuentes de nutrientes a las empleadas.

5. Evaluar los rendimientos específicos en relación a la producción de PHA, generación de biomasa y consumo de glicerina en un sistema fermentativo que presente un control de pH de manera que se busque minimizar la formación de esporas del microorganismo *Bacillus megaterium* ATCC 14581 y examinar su posible incorporación al modelo cinético propuesto para la comparación de su influencia entre escalas.
6. Realizar un estudio comparativo complementado por un análisis estadístico de los rendimientos específicos obtenidos en relación a la producción de PHA, generación de biomasa y consumo de glicerina en sistemas que presenten variaciones en sus condiciones de operación de temperatura, agitación, fuente y concentración de nutrientes, concentración de inóculo inicial, tiempo de fermentación, entre otras condiciones relevantes.
7. Estudiar los fenómenos de transporte asociados en los sistemas analizados con el propósito de determinar su influencia de manera más precisa en el sistema y examinar posibles acciones para minimizar su efecto en los rendimientos específicos de fermentación. Se destaca la cuantificación de modelos reológicos, difusión de solutos, solubilidad de oxígeno en un medio con contenido alto de sales y glicerina, regímenes de flujo, entre otros fenómenos que se consideren relevantes.
8. Cuantificar y caracterizar el caldo fermentativo residual de la fermentación, considerando no solo la presencia de la glicerina sobrante sino también los posibles subproductos generados que puedan considerarse elementos finales de valor para analizar su posible proceso de recuperación y posterior purificación.
9. Evaluar diversas técnicas de extracción y de purificación de PHA con el fin de obtener un producto con una menor presencia de contaminantes, y, en este sentido, un espectro IR más representativo del producto y más cercano al estándar de comparación. En la misma línea, explorar otras técnicas de caracterización del producto.
10. Evaluar la fermentación de glicerina cruda del proceso de biodiésel en función del tiempo a ambas escalas para generar un modelo cinético representativo y comparar el efecto que la fuente de carbono pueda llegar a tener en los parámetros cinéticos característicos de cada sistema.

XI. Referencias bibliográficas

- Berkeley Madonna. (2021). *Berkeley Madonna Version 10*. <https://berkeley-madonna.myshopify.com>
- Blanch, H. W., & Clark, D. S. (1997). *Biochemical Engineering*. Taylor & Francis Inc. https://kupdf.net/download/biochemical-engineering-harvey-w-blanch-douglas-s-clark_5af47792e2b6f5d953ee201a_pdf
- Bunk, B., Biedendieck, R., Jahn, D., & Vary, P. S. (2010). *Bacillus megaterium* and Other *Bacilli*: Industrial Applications. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 1–15. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib063>
- Castellar Ortega, G. C., Angulo Mercado, E. R., & Cardozo Arrieta, B. M. (2014). Transesterificación de aceites vegetales empleando catalizadores heterogéneos. *Prospectiva*, 12(2),90–104.<https://doi.org/10.15665/rp.v12i2.293>
- FES Zaragoza. (2018). *Manual de bioquímica celular y de los tejidos II*. CETA. <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). *El Estado Mundial de la Agricultura Y la Alimentación*. FAO.https://books.google.nl/books?id=O4Na_qQkNuYC&printsec=frontcover&hl=nl&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- González, M. G. (2008). *Producción de poli-hidroxicanoatos por bacterias del género Bacillus de origen marino*.https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/288/1/gonzalez_m.pdf

- Higuchi-Takeuchi, M., Morisaki, K., Toyooka, K., & Numata, K. (2016). Synthesis of High-Molecular-Weight Polyhydroxyalkanoates by Marine Photosynthetic Purple Bacteria. *PLOS ONE*, *11*(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160981>
- Hipkiss, A. R., Cartwright, S. P., Bromley, C., Gross, S. R., & Bill, R. M. (2013). Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? *Chemistry Central Journal*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1752-153x-7-38>
- Lemos Delgado, A. C., & Mina Cordoba, A. (2015). Polihidroxiálcanoatos (PHAs) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, *79*(1), 93–101. <https://doi.org/10.23850/22565035.139>
- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C., & Samantaray, D. (2017). *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *12*, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>
- Naranjo, J. M. (2010). *Producción de polihidroxi-butirato a partir de residuos agroindustriales*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/70146>
- Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higuera, J. C., & Cardona, C. A. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, *133*, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.129>
- Nikodinovic-Runic, J., Guzik, M., Kenny, S. T., Babu, R., Werker, A., & O Connor, K. E. (2013). Carbon-Rich Wastes as Feedstocks for Biodegradable Polymer (Polyhydroxyalkanoate) Production Using Bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 139–200. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407673-0.00004-7>
- Polich, N. (2019). *Glicerol, residuo de la producción de biodiésel: posibles alternativas como materia prima para productos de mayor valor agregado*.

- <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1207/Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Posadas, J., & Cardona, C. (2010). *Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiésel*. <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/iyu/article/view/966/564>
- Rolón-Ortiz, H., Acevedo-Peñalosa, C., & Villamizar-González, Y. (2019). Análisis térmico, modelamiento matemático y simulación de un reactor de agitación discontinuo para volumen específico. *Revista UIS Ingenierías*, 18(1), 39–48. <https://doi.org/10.18273/revuin.v18n1-2019003>
- Schmidt, S. L. (1998). *The Engineering of Chemical Reactions*. Oxford University Press.
- Statista. (2021a, junio 21). *Global plastic production 1950–2020*. <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>
- Statista. (2021b, julio 6). *Global polyethylene and polypropylene demand 2017–2023*. <https://www.statista.com/statistics/1118063/global-polyethylene-polypropylene-demand/>
- UAB. (2016). *Cromatografía Líquida | Servei d'Anàlisi Química*. Universidad Autónoma de Barcelona. <https://sct.uab.cat/saq/es/content/cromatografia-liquida>
- Vélez, M. (2012). *Estudio sobre el modelado y control de las condiciones óptimas de cultivo de microalgas en fotobiorreactores para producción de biodiésel*. <http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/2826/Trabajo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Verlinden, R., Hill, D., Kenward, M., Williams, C., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437–1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>

- Wade, L. G., Simek, J. W., & Brito, P. A. E. (2017). *Química orgánica* (Vol. 1). Pearson Educación de México.
- Wiedmann, M., & Zhang, W. (2011). *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens*. Springer Publishing. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>
- Yang, X. (2014). Scale-Up of Microbial Fermentation Process. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 669–675. <https://doi.org/10.1128/9781555816827.ch47>
- Zhu, C., Chiu, S., Nakas, J. P., & Nomura, C. T. (2013). Bioplastics from waste glycerol derived from biodiesel industry. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/app.39157>

XII. Anexos

A. Datos originales

Cuadro 21. Conteo celular empleado en la determinación de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la primera adaptación realizada

Tiempo (h)	Número de células			
	Sección 1	Sección 2	Sección 1	Sección 4
12	19	21	15	19
24	22	19	24	21
36	32	30	31	34
48	49	52	51	48
60	68	69	65	68

Conteo celular empleando la cámara de NeuBauer y un factor de dilución 1:10. El recuento se realizó en las cuatro secciones correspondientes a las esquinas de la cuadrícula de la cámara.

Cuadro 22. Conteo celular empleado en la determinación de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la segunda adaptación realizada.

Tiempo (h)	Número de células			
	Sección 1	Sección 2	Sección 1	Sección 4
12	8	9	10	9
24	12	11	9	13
36	15	10	12	13
48	12	15	16	11
60	20	19	18	20
72	25	27	30	22
84	40	45	51	39
96	65	67	71	60

Conteo celular empleando la cámara de NeuBauer y un factor de dilución 1:10. El recuento se realizó en las cuatro secciones correspondientes a las esquinas de la cuadrícula de la cámara.

Cuadro 23. Conteo celular empleado en la determinación de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la tercera adaptación

Tiempo (h)	Número de células			
	Sección 1	Sección 2	Sección 3	Sección 4
12	25	19	22	18
24	30	38	29	31
36	47	41	49	51
48	67	69	70	63

Conteo celular empleando la cámara de NeuBauer y un factor de dilución 1:10. El recuento se realizó en las cuatro secciones correspondientes a las esquinas de la cuadrícula de la cámara.

Cuadro 24. Pesos empleados para la determinación de la concentración de sales y elementos trazas sedimentables

Pr ($\pm 0.0001\text{g}$)	Prss ($\pm 0.0001\text{g}$)
19.0485	19.0487

Notación empleada: Pr=Peso del recipiente y Prss= Peso del recipiente con sales y elementos trazas sedimentables luego del secado a 60 °C.

Cuadro 25. Pesos empleados para la determinación de la concentración final celular de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina para la primera corrida

Glicerina inicial (g/L)	Primera adaptación ($\pm 0.0001\text{g}$)		Segunda adaptación ($\pm 0.0001\text{g}$)		Tercera adaptación ($\pm 0.0001\text{g}$)	
	Pr	Prm	Pr	Prm	Pr	Prm
0	60.2391	60.3432	60.3581	60.3581	60.4476	60.4476
10	43.2568	43.3577	43.2568	43.2737	43.2568	43.2848
20	29.2908	29.3868	55.5488	55.5822	54.2103	54.2489
30	30.5743	30.6949	62.7974	62.8346	49.6052	49.6473
40	62.6806	62.7799	54.1793	54.2401	55.5853	55.6254
50	49.4511	49.6470	49.5467	49.6125	60.3728	60.4122
60	53.1402	53.3404	60.4125	60.4941	62.8142	62.8568

Notación empleada: Pr=Peso del recipiente y Prm=Peso del recipiente con microorganismo luego del secado a 60 °C.

Cuadro 26. Pesos empleados para la determinación de la concentración final celular de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina para la segunda corrida

Glicerina inicial (g/L)	Pr (± 0.0001g)	Primera adaptación (± 0.0001g)	Segunda adaptación (± 0.0001g)	Tercera adaptación (± 0.0001g)
		Prm	Prm	Prm
0	32.1030	32.2011	32.1030	32.1030
10	29.3054	29.4059	29.3209	29.3324
20	29.8646	29.9601	29.8980	29.8944
30	29.2100	29.3311	29.2462	29.2451
40	32.4454	32.5446	32.4981	32.4805
50	31.4327	31.6110	31.4885	31.4704
60	29.5517	29.7411	29.6353	29.5901

Notación empleada: Pr=Peso del recipiente y Prm=Peso del recipiente con microorganismo luego del secado a 60 °C. Se empleó el mismo recipiente para las tres adaptaciones realizadas.

Cuadro 27. Concentraciones finales de glicerina en el medio empleado para las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina

Glicerina inicial (g/L)	Glicerina final (\pm 0.0005 g/L)		
	Primera adaptación	Segunda adaptación	Tercera adaptación
0	0.000	0.000	0.000
10	7.300	9.056	8.396
20	15.504	17.640	16.728
30	24.476	25.916	25.672
40	31.696	32.204	34.220
50	35.040	37.420	39.364
60	37.420	40.668	47.320

Valores de glicerina final cuantificados por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Resultados ya corregidos con factor de dilución para análisis (1:5) para (30, 40, 50 y 60) g/L.

Cuadro 28. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA y concentración final de glicerina de las fermentaciones realizadas a escala de 0.1L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina

Glicerina inicial (g/L)	Pr (± 0.0001g)	Prb (± 0.0001g)	Pr (± 0.0001g)	Prp (± 0.0001g)	Glicerina final (± 0.0005 g/L)
10	62.4113	62.4763	60.6887	60.7001	2.099
20	60.6884	60.8495	60.6887	60.7250	6.168
20	60.6884	60.8461	60.6887	60.7230	6.479
30	68.9785	69.1525	60.6887	60.7162	12.336
40	29.3056	29.4927	60.6887	60.7111	18.710
50	49.4470	49.6166	49.5712	49.5819	31.832
60	29.3056	29.4267	60.6887	60.6947	48.882

Los pesos correspondientes para la determinación de la concentración inicial de biomasa para cada sistema corresponde a las concentraciones finales de microorganismos de la tercera adaptación presentes en el Cuadro 25 y 26. Además, se presentan dos resultados a partir de 20 g/L ya que se realizó en duplicado para la validación de los mismos. Valores de glicerina final cuantificados por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Resultados ya corregidos con factor de dilución para análisis (1:5) para (30, 40, 50 y 60) g/L. Notación empleada: Pr=Peso del recipiente, Prb=Peso del recipiente con biomasa y Prp=Peso del recipiente con producto luego del secado a 60 °C.

Cuadro 29. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA y la concentración final de glicerina en distintos tiempos de fermentación a escala de 0.1 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina de la primera corrida

Tiempo (h)					Glicerina
	Pr (± 0.0001 g)	Prb (± 0.0001 g)	Pr (± 0.0001 g)	Prb (± 0.0001 g)	final (± 0.0005 g/L)
12	60.3701	60.4197	60.3693	60.3741	17.030
24	54.1964	54.2716	54.1972	54.2111	15.961
36	60.4399	60.5543	60.4401	60.4610	11.465
48	53.0464	53.2072	53.0464	53.0772	8.760
60	60.6884	60.8495	60.6887	60.7250	6.168

Valores de glicerina final cuantificados por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Notación empleada: Pr=Peso del recipiente, Prb=Peso del recipiente con biomasa y Prp=Peso del recipiente con producto luego del secado a 60 °C.

Cuadro 30. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA y la concentración final de glicerina y nitrógeno en distintos tiempos de fermentación a escala de 0.1L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina de la segunda corrida

Tiempo (h)	Pr (±	Prb (±	Pr (±	Prb (±	Glicerina	Nitrógeno
	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	final	final
	g)	g)	g)	g)	(± 0.0005	(± 0.05
					g/L)	g/L)
12	60.3701	60.4167	60.3693	60.3750	18.698	-
24	54.1964	54.2697	54.1972	54.2099	16.293	-
36	60.4399	60.5505	60.4401	60.4594	302.297	-
48	53.0464	53.2038	53.0464	53.0769	9.355	-
60	60.6884	60.8461	60.6887	60.7230	6.479	0.31

Valores de glicerina final cuantificados por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Valores de nitrógeno final cuantificados por el método 10071 extraído del manual del equipo HACH DR 890. Se obtiene la concentración de nitrógeno únicamente a la hora 60 de fermentación para obtener la conversión global del nutriente. Notación empleada: Pr=Peso del recipiente, Prb=Peso del recipiente con biomasa y Prp=Peso del recipiente con producto luego del secado a 60 °C.

Cuadro 31. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA, el pH y la concentración final de glicerina y nitrógeno en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 1

Tiempo (h)	pH	Pr (± 0.0001 g)	Prb (± 0.0001 g)	Prp (± 0.0001 g)	Glicerina final (± 0.0005 g/L)	Nitrógeno final (± 0.05 g/L)
0	7.54	31.1009	31.1317	31.1013	20.736	1.0
1	7.49	29.3053	29.3362	29.3054	20.322	-
2	7.44	29.8635	29.8947	29.8636	20.712	-
3	7.37	29.5502	29.5819	29.5505	20.601	-
4	7.33	31.1663	31.1987	31.1666	20.041	-
5	7.31	29.2081	29.2415	29.2083	19.837	-
6	7.26	23.9303	23.9668	23.9307	19.857	-
7	7.23	60.5658	60.6062	60.5681	19.543	-
8	7.20	49.4498	49.4920	49.4517	19.941	-
9	7.14	68.9792	69.0266	68.9827	-	-
10	7.02	31.4309	31.4848	31.4352	-	-
22	6.45	60.3106	60.4130	60.3499	16.002	-
24	6.44	32.4411	32.5464	32.4832	15.416	-
26	6.43	54.0695	54.1801	54.1132	14.817	-
28	6.37	55.3801	55.4962	55.4264	14.207	-
30	6.33	81.3216	81.4447	81.3687	-	-
32	6.30	49.3281	49.4573	49.3780	12.968	-
34	6.27	60.2294	60.3694	60.2810	-	-
46	6.01	52.9151	53.1334	52.9868	8.721	-
48	6.01	62.4131	62.6459	62.4862	-	-
50	6.01	75.4644	75.7087	75.5432	-	-
52	6.02	78.3875	78.6357	78.4696	7.116	-
54	6.00	62.6624	62.9121	62.7544	6.631	-

56	6.01	68.2205	68.4710	68.3164	-	-
58	5.97	107.8305	108.0812	107.9307	5.754	-
59	5.94	49.4493	49.6999	49.5567	5.556	-
71	5.87	62.6614	62.8939	62.7694	-	0.10

Valores de glicerina final cuantificados por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Valores de nitrógeno final cuantificados por el método 10071 extraído del manual del equipo HACH DR 890. Se obtiene la concentración de nitrógeno únicamente a la hora 71 de fermentación para obtener la conversión global del nutriente. Los espacios vacíos corresponden a mediciones no cuantificadas. Notación empleada: Pr=Peso del recipiente, Prb=Peso del recipiente con biomasa y Prp=Peso del recipiente con producto luego del secado a 60 °C.

Cuadro 32. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA, el pH y la concentración final de glicerina y nitrógeno en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 2

Tiempo (h)	pH	Pr (± 0.0001 g)	Prb (± 0.0001 g)	Prb (± 0.0001 g)	Glicerina final (± 0.0005 g/L)	Nitrógeno final (± 0.05 g/L)
0	7.51	33.3926	33.4234	33.3930	20.294	1.0
1	7.54	30.9059	30.9368	30.9060	20.669	-
2	7.54	32.8914	32.9226	32.8915	20.172	-
3	7.53	30.1904	30.2221	30.1907	20.546	-
4	7.54	32.0517	32.0841	32.0520	20.513	-
5	7.49	32.5875	32.6209	32.5877	20.439	-
6	7.46	32.1123	32.1488	32.1127	20.610	-
7	7.40	32.4109	32.4513	32.4132	20.568	-
8	7.31	32.6883	32.7305	32.6902	20.114	-
9	7.20	34.4327	34.4801	34.4422	19.848	-
10	7.15	33.0672	33.1211	33.0715	19.549	-
23.5	6.14	34.3621	34.4409	34.3923	15.720	-
25.5	5.94	32.2234	32.3044	32.2558	15.233	-
27.5	5.77	74.4228	74.5079	74.4580	14.387	-
29.5	5.62	73.4645	73.5538	73.5001	13.777	-
31.5	5.52	75.2188	75.3135	75.2550	13.451	-
32.5	5.48	67.5626	67.6620	67.6010	13.105	-
47.5	5.26	72.4915	72.6357	72.5393	9.295	-
49.5	5.22	54.0755	54.2294	54.1242	8.569	-
51.5	5.19	52.9127	53.0729	52.9652	8.134	-
53.5	5.19	65.6983	65.8611	65.7530	7.564	-
55.5	5.15	60.2373	60.4004	60.2986	7.196	-
57.5	5.15	49.4493	49.6122	49.5199	6.873	-

71	5.15	62.6614	62.8095	62.7303	4.608	0.20
----	------	---------	---------	---------	-------	------

Valores de glicerina final cuantificados por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Valores de nitrógeno final cuantificados por el método 10071 extraído del manual del equipo HACH DR 890. Se obtiene la concentración de nitrógeno únicamente a la hora 71 de fermentación para obtener la conversión global del nutriente. Los espacios vacíos corresponden a mediciones no cuantificadas. Notación empleada: Pr=Peso del recipiente, Prb=Peso del recipiente con biomasa y Prp=Peso del recipiente con producto luego del secado a 60 °C.

Cuadro 33. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA, el pH y la concentración final de glicerina y nitrógeno en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 3

Tiempo (h)	pH	Pr (± 0.0001 g)	Prb (± 0.0001 g)	Prp (± 0.0001 g)	Glicerina final (± 0.0005 g/L)	Nitrógeno final (± 0.05 g/L)
0	7.55	31.4357	31.4668	31.4361	20.887	1.0
1	7.55	29.2094	29.2406	29.2095	19.835	-
2	7.56	32.1041	32.1356	32.1042	19.840	-
3	7.56	31.1670	31.1990	31.1673	19.889	-
5	7.52	29.8656	29.8993	29.8658	19.679	-
6	7.51	29.5552	29.5921	29.5556	19.723	-
7	7.47	29.1240	29.1648	29.1265	19.749	-
8	7.40	29.3068	29.3494	29.3089	19.653	-
9	7.32	32.2232	32.2711	32.2271	19.426	-
10	7.28	32.8919	32.9463	32.8966	19.263	-
23	6.40	32.5878	32.6824	32.6201	15.530	-
25	6.18	32.1121	32.2093	32.1468	14.417	-
27	6.01	34.4383	34.5404	34.4766	13.822	-
30	5.77	33.0628	33.1700	33.1045	12.843	-
32	5.66	32.4080	32.5216	32.4524	12.048	-
34	5.56	30.9041	31.0234	30.9512	11.549	-
47.5	5.33	33.3740	33.5600	33.4357	8.581	-
49.5	5.30	34.3643	34.5628	34.4271	7.817	-
51.5	5.30	32.0510	32.2577	32.1187	7.303	-
53.5	5.29	32.6877	32.8977	32.7583	6.933	-
55.5	5.28	52.9151	53.1255	52.9942	6.364	-
57.5	5.28	68.9803	69.1904	69.0606	5.967	-
70	5.27	68.2195	68.4166	68.3062	3.831	0.15

Valores de glicerina final cuantificados por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Valores de nitrógeno final cuantificados por el método 10071 extraído del manual del equipo HACH DR 890. Se obtiene la concentración de nitrógeno únicamente a la hora 70 de fermentación para obtener la conversión global del nutriente. Los espacios vacíos corresponden a mediciones no cuantificadas. Notación empleada: Pr=Peso del recipiente, Prb=Peso del recipiente con biomasa y Prp=Peso del recipiente con producto luego del secado a 60 °C.

Cuadro 34. Pesos empleados para la determinación de la concentración final celular de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel

Glicerina inicial (g/L)	Pr (± 0.0001g)	Primera	Segunda	Tercera
		adaptación Prm (± 0.0001g)	adaptación Prm (± 0.0001g)	adaptación Prm (± 0.0001g)
0	30.4561	30.4870	30.4870	30.4870
10	29.3098	29.3561	29.3377	29.3329
20	29.2081	29.2517	29.2317	29.2309
30	32.4429	32.4979	32.4699	32.4709
40	29.5503	29.6265	29.5749	29.5719
50	31.4322	31.5261	31.4581	31.4535
60	49.3150	49.4018	49.3498	49.3428

Notación empleada: Pr=Peso del recipiente y Prm=Peso del recipiente con microorganismo luego del secado a 60 °C. Se empleó el mismo recipiente para las tres adaptaciones realizadas.

Cuadro 35. Concentraciones finales de glicerina en el medio empleado para las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel

Glicerina inicial (g/L)	Glicerina final (\pm 0.0005 g/L)		
	Primera adaptación	Segunda adaptación	Tercera adaptación
0	0.000	0.000	0.000
10	7.153	8.882	9.293
20	15.191	16.731	18.085
30	20.445	25.767	26.731
40	26.132	34.145	35.765
50	33.420	41.344	43.140
60	37.190	49.787	48.611

Valores de glicerina final cuantificados por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Resultados ya corregidos con factor de dilución para análisis (1:5) para (30, 40, 50 y 60) g/L.

Cuadro 36. Pesos empleados para la determinación de la concentración final de biomasa y PHA y concentración final de glicerina de las fermentaciones realizadas a escala de 0.1 L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel

Glicerina inicial (g/L)	Pr (± 0.0001g)	Prb (± 0.0001g)	Prp (± 0.0001g)	Glicerina final (± 0.0005 g/L)
10	29.3098	29.3999	29.3203	4.973
20	29.2081	29.3521	29.2345	8.023
30	32.4429	32.5723	32.4578	14.869
40	29.5503	29.6501	29.5619	22.375
50	31.4322	31.5354	31.4410	35.826
60	49.3150	49.4094	49.3198	50.002

Los pesos correspondientes para la determinación de la concentración inicial de biomasa para cada sistema corresponde a las concentraciones finales de microorganismos de la tercera adaptación presentes en el Cuadro 34. Valores de glicerina final cuantificados por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Resultados ya corregidos con factor de dilución para análisis (1:5) para (30, 40, 50 y 60) g/L. Notación empleada: Pr=Peso del recipiente, Prb=Peso del recipiente con biomasa y Prp=Peso del recipiente con producto luego del secado a 60 °C. Se empleó el mismo recipiente para ambas cuantificaciones.

B. Datos calculados

Cuadro 37. Concentración final celular empleada para la elaboración de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la primera adaptación

Tiempo (h)	Número de células promedio	Células/L
12	19± 2.2	1.9E+09 ± 2.2E+08
24	22 ± 1.8	2.2E+09 ± 1.8E+08
36	32 ± 1.5	3.2E+09 ± 1.5E+08
48	50 ± 1.6	5.0E+09 ± 1.6E+08
60	68 ± 1.5	6.8E+09 ± 1.5E+08

Se determinó el promedio celular considerando el recuento celular de las cuatro secciones correspondientes a las esquinas de la cuadrícula de la cámara de NeuBauer. Valores de concentración final celular ya corregidos con un factor de dilución 1:10.

Cuadro 38. Concentración final celular empleada para la elaboración de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la segunda adaptación

Tiempo (h)	Número de células promedio	Células/L
12	9.9 ± 0.7	9.0E+08 ± 7.1E+07
24	11 ± 1.5	1.1E+09 ± 1.5E+08
36	13 ± 1.8	1.3E+09 ± 1.8E+08
48	14 ± 2.1	1.4E+09 ± 2.1E+08
60	19 ± 0.8	1.9E+09 ± 8.3E+07
72	26 ± 2.9	2.6E+09 ± 2.9E+08
84	44 ± 4.8	4.3E+09 ± 4.8E+08
96	66 ± 4.0	6.6E+09 ± 4.0E+08

Se determinó el promedio celular considerando el recuento celular de las cuatro secciones correspondientes a las esquinas de la cuadrícula de la cámara de NeuBauer. Valores de concentración final celular ya corregidos con un factor de dilución 1:10.

Cuadro 39. Concentración final celular empleada para la elaboración de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina para la tercera adaptación

Tiempo (h)	Número de células promedio	Células/L
12	21 ± 2.7	2.1E+09 ± 2.7E+08
24	32 ± 3.5	3.2E+09 ± 3.5E+08
36	47 ± 3.7	4.7E+09 ± 3.7E+08
48	67 ± 2.7	6.7E+09 ± 2.7E+08

Se determinó el promedio celular considerando el recuento celular de las cuatro secciones correspondientes a las esquinas de la cuadrícula de la cámara de NeuBauer. Valores de concentración final celular ya corregidos con un factor de dilución 1:10.

Cuadro 40. Concentración final de sales y elementos trazas sedimentables

Sales y elementos trazas sedimentables (± 0.0031 g/L)
0.0044

Se realizó el peso seco de un blanco para determinar las sales sedimentables y elementos trazas sedimentables en el proceso de centrifugación.

Cuadro 41. Concentración final de microorganismos de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina para la primera corrida

Glicerina inicial (g/L)	Concentración final de microorganismos (± 0.0044 g/L)		
	Primera adaptación	Segunda adaptación	Tercera adaptación
0	2.3133	0.0000	0.0000
10	2.2422	0.3711	0.6178
20	2.1333	0.7378	0.8533
30	2.6800	0.8222	0.9311
40	2.2067	1.3467	0.8867
50	4.3533	1.4578	0.8711
60	4.4489	1.8089	0.9422

Valores de concentración ya corregidos por el blanco de sales y elementos trazas sedimentables mostrado en el Cuadro 40.

Cuadro 42. Concentración final de microorganismos de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina para la segunda corrida

Glicerina inicial (g/L)	Concentración final de microorganismos (± 0.0044 g/L)		
	Primera adaptación	Segunda adaptación	Tercera adaptación
0	1.9620	0.0000	0.0000
10	2.0100	0.3056	0.5356
20	1.9100	0.6636	0.5916
30	2.4220	0.7196	0.6976
40	1.9832	1.0496	0.6976
50	3.5658	1.1116	0.7496
60	3.7880	1.6676	0.7636

Valores de concentración ya corregidos por el blanco de sales y elementos trazas sedimentables mostrado en el Cuadro 40.

Cuadro 43. Concentración final promedio de microorganismos de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones de glicerina

Glicerina inicial (g/L)	Concentración final promedio de microorganismos (g/L)		
	Primera adaptación	Segunda adaptación	Tercera adaptación
0	2.1377 ± 0.2484	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
10	2.1261 ± 0.1642	0.3383 ± 0.0464	0.5767 ± 0.0581
20	2.0217 ± 0.1579	0.7007 ± 0.0525	0.7224 ± 0.1851
30	2.5510 ± 0.1824	0.7709 ± 0.0726	0.8143 ± 0.1651
40	2.0949 ± 0.1580	1.1981 ± 0.2101	0.7921 ± 0.1337
50	3.9596 ± 0.5569	1.2847 ± 0.2448	0.8103 ± 0.0860
60	4.1184 ± 0.4673	1.7382 ± 0.0999	0.8529 ± 0.1263

Se obtuvo el promedio con los valores cuantificados para la primera y la segunda corrida del Cuadro 41 y 42, respectivamente.

Cuadro 44. Concentración final de biomasa y PHA en distintos tiempos de fermentación a escala de 0.1 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina para ambas corridas

Tiempo (h)	Biomasa final (± 0.0031 g/L)		PHA final (± 0.0031 g/L)	
	Primera corrida	Segunda corrida	Primera corrida	Segunda corrida
0	0.8533	0.5916	0.0000	0.0000
12	1.1022	1.0356	0.1067	0.1267
24	1.6711	1.6289	0.3089	0.2822
36	2.5422	2.4578	0.4644	0.4289
48	3.5733	3.4978	0.6844	0.6778
60	3.5800	3.5044	0.8067	0.7622

Las concentraciones finales de biomasa correspondientes al tiempo 0 se obtienen de las concentraciones finales de microorganismos de la tercera adaptación presentes en el Cuadro 41 y 42.

Cuadro 45. Concentración promedio final de biomasa, PHA y glicerina en distintos tiempos de fermentación a escala de 0.1 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 0

Tiempo (h)	Biomasa final promedio (g/L)	Glicerina final promedio (g/L)	PHA final promedio (g/L)
0	0.7224 ± 0.1309	20.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
12	1.0689 ± 0.0333	17.8640 ± 0.08340	0.1167 ± 0.0100
24	1.6500 ± 0.0211	15.9610 ± 0.0032	0.2956 ± 0.0133
36	2.5000 ± 0.0422	11.4775 ± 0.0125	0.4467 ± 0.0178
48	3.5356 ± 0.0378	9.0575 ± 0.2975	0.6811 ± 0.0033
60	3.5422 ± 0.0378	6.3235 ± 0.15555	0.7844 ± 0.0222

Se obtienen las concentraciones promedio a partir de los datos obtenidos en duplicado de los cuadros 29, 30 y 44.

Cuadro 46. Concentración final de biomasa y de PHA en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 1

Tiempo (h)	Biomasa final (± 0.0035 g/L)	PHA final (± 0.0035 g/L)
0	0.7700	0.0100
1	0.7725	0.0025
2	0.7800	0.0025
3	0.7925	0.0075
4	0.8100	0.0075
5	0.8350	0.0050
6	0.9125	0.0100
7	1.0100	0.0575
8	1.0550	0.0475
9	1.1850	0.0875
10	1.3475	0.1075
22	2.5610	0.9815
24	2.6325	1.0530
26	2.7658	1.0920
28	2.9022	1.1570
30	3.0778	1.1765
32	3.2305	1.2480
34	3.5002	1.2902
46	5.4575	1.7925
48	5.8200	1.8275
50	6.1075	1.9700
52	6.2050	2.0525
54	6.2425	2.3000
56	6.2625	2.3975
58	6.2675	2.5050
59	6.2650	2.6850

71

5.8125

2.7000

Valores de concentración ya corregidos por el blanco de sales y elementos trazas sedimentables mostrado en el Cuadro 40.

Cuadro 47. Concentración final de biomasa y de PHA en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 2

Tiempo (h)	Biomasa final (± 0.0035 g/L)	PHA final (± 0.0035 g/L)
0	0.7700	0.0100
1	0.7725	0.0025
2	0.7800	0.0025
3	0.7925	0.0075
4	0.8100	0.0075
5	0.8350	0.0050
6	0.9125	0.0100
7	1.0100	0.0575
8	1.0550	0.0475
9	1.1850	0.0875
10	1.3475	0.1075
23.5	1.9700	0.7550
25.5	2.0250	0.8100
27.5	2.1275	0.8400
29.5	2.2325	0.8900
31.5	2.3675	0.9050
32.5	2.4850	0.9600
47.5	3.6050	1.1950
49.5	3.8475	1.2175
51.5	4.0050	1.3125
53.5	4.0700	1.3675
55.5	4.0775	1.5325
57.5	4.0725	1.7650
71	3.7025	1.7225

Valores de concentración ya corregidos por el blanco de sales y elementos trazas sedimentables mostrado en el Cuadro 40.

Cuadro 48. Concentración final de biomasa y de PHA en distintos tiempos de fermentación a escala de 10 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina correspondiente al sistema 3

Tiempo (h)	Biomasa final (± 0.0035 g/L)	PHA final (± 0.0035 g/L)
0	0.7777	0.0110
1	0.7802	0.0027
2	0.7878	0.0028
3	0.8004	0.0082
5	0.8433	0.0055
6	0.9216	0.0110
7	1.0201	0.0633
8	1.0656	0.0522
9	1.1969	0.0962
10	1.3610	0.1183
23	2.3640	0.8075
25	2.4300	0.8675
27	2.5530	0.9575
30	2.6790	1.0425
32	2.8410	1.1110
34	2.9820	1.1770
47.5	4.6504	1.5415
49.5	4.9633	1.5706
51.5	5.1664	1.6931
53.5	5.2503	1.7641
55.5	5.2600	1.9769
57.5	5.2535	2.0075
70	4.9275	2.1675

Valores de concentración ya corregidos por el blanco de sales y elementos trazas sedimentables mostrado en el Cuadro 40.

Cuadro 49. Concentración final celular de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel

Glicerina inicial (g/L)	Concentración final de microorganismos (± 0.0028 g/L)		
	Primera adaptación	Segunda adaptación	Tercera adaptación
0	0.6180	0.0000	0.0000
10	0.9260	0.5580	0.4620
20	0.8720	0.4720	0.4560
30	1.1000	0.5400	0.5600
40	1.5240	0.4920	0.4320
50	1.8780	0.5180	0.4260
60	1.7360	0.6960	0.5560

Valores de concentración ya corregidos por el blanco de sales y elementos trazas sedimentables mostrado en el Cuadro 40.

C. Datos de reactivos y equipos

1. Datos de reactivos

Cuadro 50. Datos de *Bacillus megaterium* ATCC 14581

Reactivo	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581
Marca	Microbiologies
Línea	KWIK-STIK
Número de referencia	0201P
Presentación	2 hisopos

Cuadro 51. Datos de agar nutritivo

Reactivo	Agar nutritivo
Marca	BD Difco
Condiciones de preparación (g de sólido/L de agua destilada)	23
pH del medio	6.8±0.2 (25 °C)

Cuadro 52. Datos de caldo nutritivo

Reactivo	Caldo nutritivo
Marca	Merck
Condiciones de preparación (g de sólido/L de agua destilada)	8
pH del medio	7±0.2 (25 °C)

Cuadro 53. Datos de glicerina USP

Reactivo	Glicerina
Marca	Del Caribe
Código de referencia	70300130
Pureza	99.7% (m/m)
Densidad (g/mL)	$1.26 \pm 2.15 \times 10^{-4}$
Viscosidad (mPa*s)	1166 ± 5.477

Cuadro 54. Datos glicerina cruda obtenida del proceso de biodiésel

Reactivo	Glicerina
Pureza	$92 \pm 0.97\%$ (m/m)
Densidad (g/mL)	1.63 ± 0.243
Viscosidad (mPa*s)	2088 ± 120.7
pH	7.17 ± 0.048 (25 °C)

Cuadro 55. Datos de sulfato de amonio

Reactivo	Sulfato de amonio
Marca	Fisher Scientific
CAS	7783-20-2
Masa molecular (g/mol)	132.134

Cuadro 56. Datos de fosfato diácido de potasio

Reactivo	Fosfato diácido de potasio
Marca	Fisher Scientific
CAS	7778-77-0
Masa molecular (g/mol)	136.08

Cuadro 57. Datos de fosfato ácido de sodio

Reactivo	Fosfato ácido de sodio
Marca	Merck
CAS	7558-79-4
Masa molecular (g/mol)	141.96

Cuadro 58. Datos de sulfato de magnesio heptahidratado

Reactivo	Sulfato de magnesio heptahidratado
Marca	Merck
CAS	10034-99-8
Masa molecular (g/mol)	246.5

Cuadro 59. Datos de sulfato de hierro heptahidratado

Reactivo	Sulfato de hierro heptahidratado
Marca	Merck
CAS	7782-63-0
Masa molecular (g/mol)	278.01

Cuadro 60. Datos de sulfato de zinc heptahidratado

Reactivo	Sulfato de zinc heptahidratado
Marca	Merck
CAS	7446-20-0
Masa molecular (g/mol)	287.54

Cuadro 61. Datos de sulfato de cobre pentahidratado

Reactivo	Sulfato de cobre pentahidratado
Marca	Merck
CAS	7758-99-8
Masa molecular (g/mol)	249.68

Cuadro 62. Datos de sulfato de manganeso monohidratado

Reactivo	Sulfato de manganeso monohidratado
Marca	Merck
CAS	10034-96-5
Masa molecular (g/mol)	169.02

Cuadro 63. Datos de cloruro de calcio dihidratado

Reactivo	Cloruro de calcio dihidratado
Marca	Merck
CAS	10035-04-8
Masa molecular (g/mol)	147.01

Cuadro 64. Datos de ácido bórico

Reactivo	Ácido bórico
Marca	Merck
CAS	10043-35-3
Masa molecular (g/mol)	61.83

Cuadro 65. Datos de molibdato de amonio tetrahidratado

Reactivo	Molibdato de amonio tetrahidratado
Marca	Merck
CAS	12054-85-2
Masa molecular (g/mol)	1235.86

Cuadro 66. Datos de ácido clorhídrico

Reactivo	Ácido clorhídrico
Marca	Merck
Pureza	32 %(v/v)

Cuadro 67. Datos de cloroformo

Reactivo	Cloroformo
Marca	Merck
CAS	67-66-3
Masa molecular (g/mol)	119.38

2. Datos de equipos

Cuadro 68. Datos de balanza analítica

Equipo	Balanza analítica
Marca	OHAUS
Modelo	PA114
Número de serie	8329290114
Capacidad máxima (g)	110
Legibilidad (g)	0.0001
Requerimientos energéticos	8-14.5 V, 50/60 Hz

Cuadro 69. Datos de estufa con sistema de agitación

Equipo	Estufa con sistema de agitación
Marca	Thermo Scientific
Modelo	Serie Cimarec +
Temperatura superficial máxima (°C)	540
Rango de agitación (rpm)	50-1500
Requerimientos energéticos	100-120 V, 50/60 Hz

Cuadro 70. Datos de autoclave

Equipo	Autoclave
Marca	Market Forge
Modelo	Sterilmatic
Temperatura máxima (°C)	121
Tiempo máximo de esterilización (min)	60

Cuadro 71. Datos de incubadora

Equipo	Incubadora
Marca	Lab Line
Modelo	Imperial III
Número de serie	0599-0437
Temperatura máxima (°C)	150
Requerimientos energéticos	120 V, 50/60 Hz

Cuadro 72. Datos de balanza

Equipo	Balanza
Marca	OHAUS
Modelo	3000 Xtreme (V31XH2)
Número de serie	B652517672
Capacidad máxima (g)	2000
Legibilidad (g)	0.1
Requerimientos energéticos	9 V, 0.5A

Cuadro 73. Datos de incubadora con agitación orbital

Equipo	Incubadora con agitación orbital
Marca	New Brunswick Scientific
Modelo	Serie 25
Temperatura máxima (°C)	100
Legibilidad (°C)	0.5
Rango de agitación (rpm)	40-400
Legibilidad (rpm)	5
Requerimientos energéticos	120 V, 60 Hz, 10 A

Cuadro 74. Datos de centrífuga

Equipo	Centrífuga
Marca	Eppendorf
Modelo	5804 R
Número de serie	5805F0033302
Rango de temperatura (°C)	-9-40
Rango de agitación (rpm)	200-14000
Densidad máxima de líquido (kg * dm ⁻³)	1.2
Requerimientos energéticos	120 V, 60 Hz, 12 A

Cuadro 75. Datos de agitador vortex

Equipo	Agitador vortex
Marca	Fisher Scientific
Número de catálogo	02215365
Rango de agitación (rpm)	300-3200
Requerimientos energéticos	120 V, 1.2A

Cuadro 76. Datos de horno de convección por gravedad

Equipo	Horno de convección por gravedad
Marca	VWR
Modelo	Symphony (E191047)
Número de serie	041042611A1013
Temperatura (°C)	230
Legibilidad (°C)	5
Requerimientos energéticos	120 V, 60 Hz,

Cuadro 77. Datos de microscopio

Equipo	Microscopio
Marca	Fisher Scientific
Modelo	Micromaster
Requerimientos energéticos	110 V, 50/60 Hz

Cuadro 78. Datos de espectrofotómetro

Equipo	Espectrofotómetro
Marca	PerkinElmer
Modelo	Frontier IR-UATR
Número de serie	109473
Rango de detección (µm)	1.2-40
Requerimientos energéticos	100-230V, 50/60 Hz, 1.5A

Cuadro 79. Datos de detector de índice de refracción para HPLC

Equipo	Detector de índice de refracción
Marca	Agilent Technologies
Modelo	Series 1200
Número de serie	CN60557002
Requerimientos energéticos	100-120/220-240 V-160 VA, 50/60 Hz

Cuadro 80. Datos de columna de intercambio iónico para HPLC

Equipo	Columna de intercambio iónico
Marca	Agilent
Modelo	Hi-Plex H

Cuadro 81. Datos de automuestreador para HPLC

Equipo	Automuestreador
Marca	Agilent
Modelo	Series 1100
Número de serie	DE11107031
Requerimientos energéticos	100-120/220-240 V, 50/60 Hz

Cuadro 82. Datos de bioreactor Bioflo 415

Equipo	Bioreactor
Marca	New Brunswick Scientific
Modelo	Bioflo 415
Número de serie	3364M
Volumen máximo de trabajo (L)	15.6
Volumen total de trabajo (L)	19.5
Requerimientos energéticos	208-230V, 50/60Hz, 15A

D. Cálculos de muestra

Cálculo 1. Número de células promedio empleado en la determinación de la concentración celular final para la elaboración de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 1481

Utilizando la siguiente ecuación donde x representa los datos y N la cantidad de datos:

Ecuación 15. Promedio

$$\text{Promedio} = \frac{\sum x}{N}$$

Se obtiene a partir del Cuadro 21 :

$$\text{Promedio} = \frac{(19 + 21 + 15 + 19)\text{células}}{4} = 19 \text{ células}$$

Se empleó la misma manera de cálculo para los demás promedios calculados.

Cálculo 2. Concentración celular final empleada en la elaboración de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 145881

Utilizando la siguiente ecuación donde f representa el factor de dilución empleado:

Ecuación 16. Concentración celular final

$$\text{Concentración celular final} = (\text{Número de células promedio}) * \frac{10^4}{\text{mL}} * (f) * \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}\right)$$

Se obtiene a partir del Cuadro 37:

$$\begin{aligned} \text{Concentración celular final} &= (19 \text{ células}) * \frac{10^4}{\text{mL}} * (10) * \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}\right) \\ &= 1.9 * 10^9 \frac{\text{células}}{\text{L}} \end{aligned}$$

Se empleó la misma manera de cálculo para las demás concentraciones celulares.

Cálculo 3. Concentración de sales y elementos trazas sedimentables

Utilizando la siguiente ecuación donde Prss representa el peso del recipiente con sales y elementos trazas sedimentables, Pr representa el peso del recipiente y Vm el volumen de la muestra analizada:

Ecuación 17. Concentración de sales y elementos trazas sedimentables

$$\text{Concentración de sales y elementos trazas sedimentables} = \frac{\text{Prss} - \text{Pr}}{V_m} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}$$

Se obtiene a partir del Cuadro 24:

Concentración de sales y elementos trazas sedimentables

$$= \frac{(19.0487 - 19.0485) \text{g}}{45 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 0.0044 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Cálculo 4. Concentración final de microorganismos de las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina

Utilizando la siguiente ecuación donde Prc representa el peso del recipiente con microorganismos y Css la concentración de sales y elementos trazas sedimentables:

Ecuación 18. Concentración final de microorganismos

$$\text{Concentración final de microorganismos} = \left[\frac{(\text{Prm} - \text{Pr})}{V_m} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right] - C_{ss}$$

Se obtiene a partir del Cuadro 41:

Concentración final de microorganismos

$$= \left[\frac{(43.3577 - 43.2568) \text{g}}{45 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right] - 0.044 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 2.2422 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Se empleó la misma manera de cálculo para las demás concentraciones de microorganismos.

Cálculo 5. Conversión de glicerina alcanzada en las adaptaciones realizadas a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina

Utilizando la siguiente ecuación donde Cig representa la concentración inicial de glicerina y Cfg la concentración final de la misma:

Ecuación 19. Conversión de glicerina

$$\text{Conversión de glicerina} = \frac{Cig - Cfg}{Cig} * 100$$

Se obtiene a partir del Cuadro 27:

$$\text{Conversión de glicerina} = \frac{(10 - 7.300) \frac{\text{g}}{\text{L}}}{10 \frac{\text{g}}{\text{L}}} * 100 = 27.0\%$$

Se empleó la misma manera de cálculo para las demás conversiones de glicerina calculadas.

Cálculo 6. Conversión de nitrógeno alcanzada en la fermentación realizada a escala de 0.1 L a partir de una concentración inicial de 20 g/L de glicerina

Utilizando la siguiente ecuación donde Cin representa la concentración inicial de nitrógeno y Cfn la concentración final de la misma:

Ecuación 20. Conversión de nitrógeno

$$\text{Conversión de nitrógeno} = \frac{Cin - Cfn}{Cin} * 100$$

Se obtiene a partir del Cuadro 30:

$$\text{Conversión de nitrógeno} = \frac{(1.0 - 0.3100) \frac{\text{g}}{\text{L}}}{1.0 \frac{\text{g}}{\text{L}}} * 100 = 69\%$$

Se empleó la misma manera de cálculo para las demás conversiones de nitrógeno calculadas.

Cálculo 7. Concentración final de biomasa obtenida de la fermentación realizadas a escala de 0.1 L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina

Utilizando la siguiente ecuación donde Prb es el peso del recipiente con biomasa:

Ecuación 21. Concentración final de biomasa

$$\text{Concentración final de biomasa} = \left[\frac{(\text{Prb} - \text{Pr})}{V_m} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right]$$

Se obtiene a partir del Cuadro 28:

$$\text{Concentración final de biomasa} = \left[\frac{(62.4763 - 62.4113)\text{g}}{45 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right] = 1.4444 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Se empleó la misma manera de cálculo para las demás concentraciones finales de biomasa.

Cálculo 8. Concentración final de PHA obtenida de la fermentación realizadas a escala de 0.1 L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina

Utilizando la siguiente ecuación donde Prp es el peso del recipiente con PHA:

Ecuación 22. Concentración final de PHA

$$\text{Concentración final de PHA} = \left[\frac{(\text{Prp} - \text{Pr})}{V_m} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right]$$

Se obtiene a partir del Cuadro 28:

$$\text{Concentración final de PHA} = \left[\frac{(60.7001 - 60.6887)\text{g}}{45 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right] = 0.2533 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Se empleó la misma manera de cálculo para las demás concentraciones finales de PHA.

Cálculo 9. Rendimiento específico de PHA con respecto a glicerina de las fermentaciones realizadas a escala de 0.1 L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina

Utilizando la ecuación 7 (Referir al apartado de marco teórico):

Se obtiene a partir de los cuadros 9 y 28:

$$Y_{ps} = \frac{(0.2533 - 0) \frac{\text{g}}{\text{L}}}{(10 - 2.099) \frac{\text{g}}{\text{L}}} = 0.0321 \left(\frac{\text{m}}{\text{m}} \right)$$

Se empleó la misma manera de cálculo para los demás rendimientos específicos de PHA con respecto a glicerina.

Cálculo 10. Rendimiento específico de biomasa con respecto a glicerina de las fermentaciones realizadas a escala de 0.1 L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina

Utilizando la ecuación 8 (Referir al apartado de marco teórico):

Se obtiene a partir de los cuadros 9, 28 y 41:

$$Y_{xs} = \frac{(1.4444 - 0.6178) \frac{\text{g}}{\text{L}}}{(10 - 2.099) \frac{\text{g}}{\text{L}}} = 0.1046 \left(\frac{\text{m}}{\text{m}} \right)$$

Se empleó la misma manera de cálculo para los demás rendimientos específicos de biomasa con respecto a glicerina.

Cálculo 11. Rendimiento específico de PHA con respecto a biomasa de las fermentaciones realizadas a escala de 0.1 L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina

Utilizando la ecuación 9 (Referir al apartado de marco teórico):

Se obtiene a partir de los cuadros 9, 28 y 41:

$$Y_{px} = \frac{(0.2533 - 0) \frac{\text{g}}{\text{L}}}{(1.4444 - 0.6178) \frac{\text{g}}{\text{L}}} = 0.1754 \left(\frac{\text{m}}{\text{m}} \right)$$

Se empleó la misma manera de cálculo para los demás rendimientos específicos de PHA con respecto a biomasa.

E. Análisis de error

Cálculo 12. Desviación estándar del número de células promedio empleadas en la determinación de la concentración celular final para la elaboración de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 14581

Utilizando la siguiente ecuación donde X' representa el dato promedio, X el dato empleado en el promedio y n el número de datos con el que se efectuó el promedio:

Ecuación 23. Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X' - X)^2}{n - 1}}$$

Se obtiene a partir del Cuadro 21:

$$S = \sqrt{\frac{[(19 - 19)^2 + (19 - 21)^2 + (19 - 15)^2 + (19 - 19)^2] \text{células}}{3}} = \pm 2.2 \text{ células}$$

Se empleó la misma manera de cálculo para las demás desviaciones estándar calculadas.

Cálculo 13. Propagación de error de la concentración celular final empleada para la elaboración de la curva de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* ATCC 1481

Utilizando la siguiente ecuación donde A es una constante y Δb la incertidumbre de un dato de la operación:

Ecuación 24. Propagación de error de una multiplicación por una constante

$$\Delta y = A * \Delta b$$

Se obtiene a partir del Cuadro 37:

$$\Delta y = (10 * 10^4 * 1000) * (\pm 2.2 \text{ células}) = \pm 2.2 * 10^8 \text{ células}$$

Se empleó la misma manera de cálculo para las demás propagaciones de error compuestas por una multiplicación por una constante.

Cálculo 14. Propagación de error de la velocidad de crecimiento celular global

Utilizando la siguientes ecuaciones donde Δa es la incertidumbre de un dato de la operación:

Ecuación 25. Propagación de error de sumas y restas

$$\Delta y = \sqrt{(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Ecuación 26. Propagación de error de una división por una constante

$$\Delta y = \frac{\Delta b}{A}$$

Se obtiene a partir del Cuadro 37:

$$\Delta y = \sqrt{(\pm 2.2 * 10^8)^2 + (\pm 1.5 * 10^8)^2} \frac{\text{células}}{\text{L}} = \pm 2.6 * 10^8 \frac{\text{células}}{\text{L}}$$

$$\Delta y = \frac{\pm 2.6 * 10^8 \frac{\text{células}}{\text{L}}}{(60 - 12)\text{h}} = \pm 5.5 * 10^6 \frac{\text{células}}{\text{L} * \text{h}}$$

Se empleó la misma manera de cálculo para las demás propagaciones de error compuestas por sumas y restas y por la división entre una constante.

Cálculo 15. Propagación de error del rendimiento específico de PHA con respecto a biomasa de las fermentaciones realizadas a escala de 0.1 L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina

Utilizando la siguiente ecuación donde a y b son datos empleados en la operación y Y el resultado de la misma:

Ecuación 27. Propagación de error de multiplicaciones y divisiones

$$\Delta y = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2} * Y$$

Se obtiene a partir del Cuadro 9:

$$\Delta y = \sqrt{\left(\frac{\pm 0.0031 \text{ g}}{0.2533 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{\pm 0.0031 \text{ g}}{1.4444 \text{ g}}\right)^2} * 0.1754 \left(\frac{\text{m}}{\text{m}}\right) = \pm 0.0022 \left(\frac{\text{m}}{\text{m}}\right)$$

Se empleó la misma manera de cálculo para las demás propagaciones de error compuestas por multiplicaciones y divisiones.

F. Cromatogramas

Figura 24. Ejemplo de resultado de cromatograma de HPLC para la cuantificación de glicerina correspondiente a la medición tomada a la hora 24 de la fermentación a escala de 0.1 L para una concentración inicial de 20 g/L de glicerina de la primera corrida

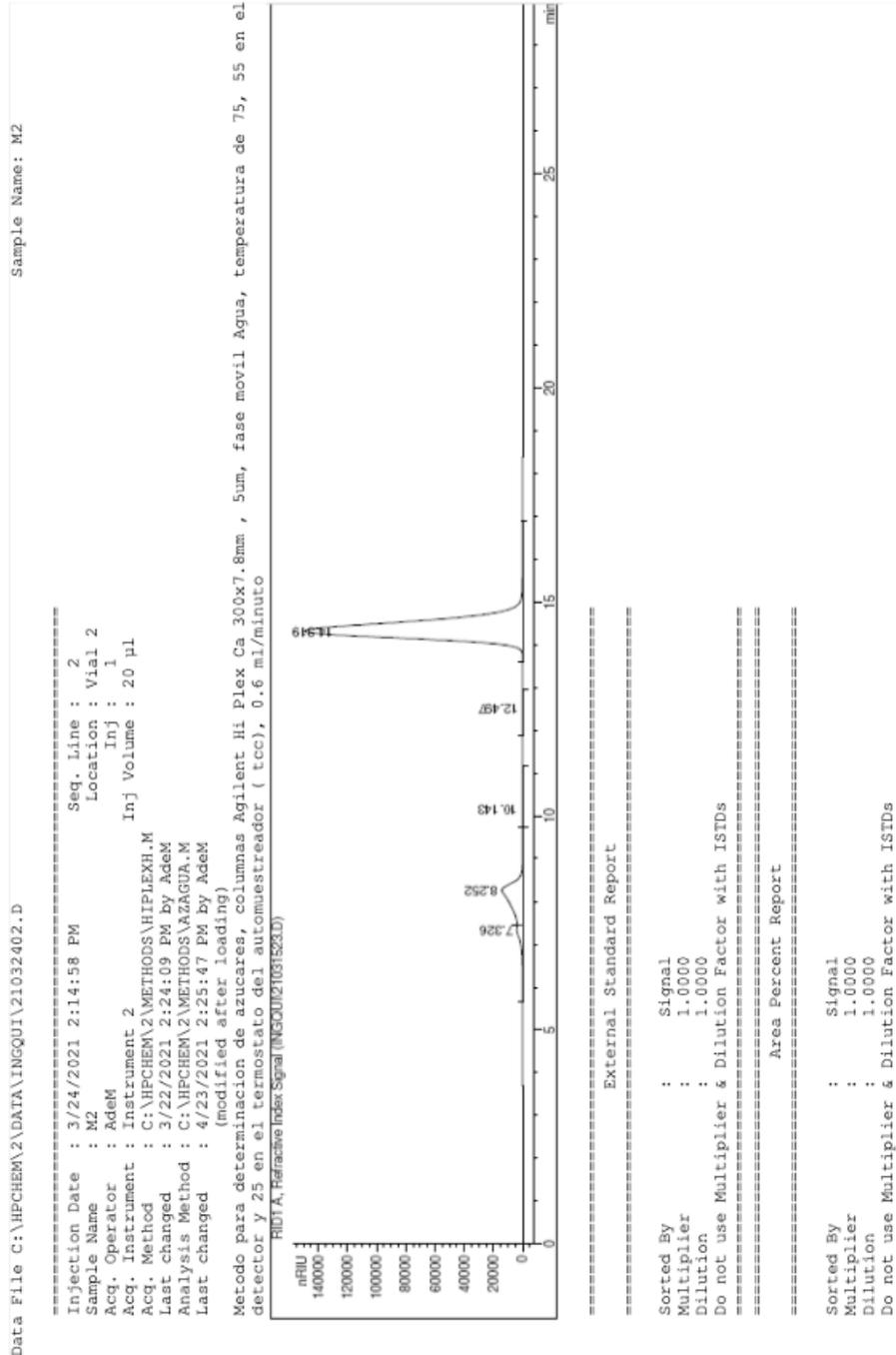


Figura 25. Ejemplo de resultado de cromatograma de HPLC para la cuantificación de glicerina correspondiente a la muestra tomada a la hora 26 de la fermentación a escala de 10 L del sistema 1

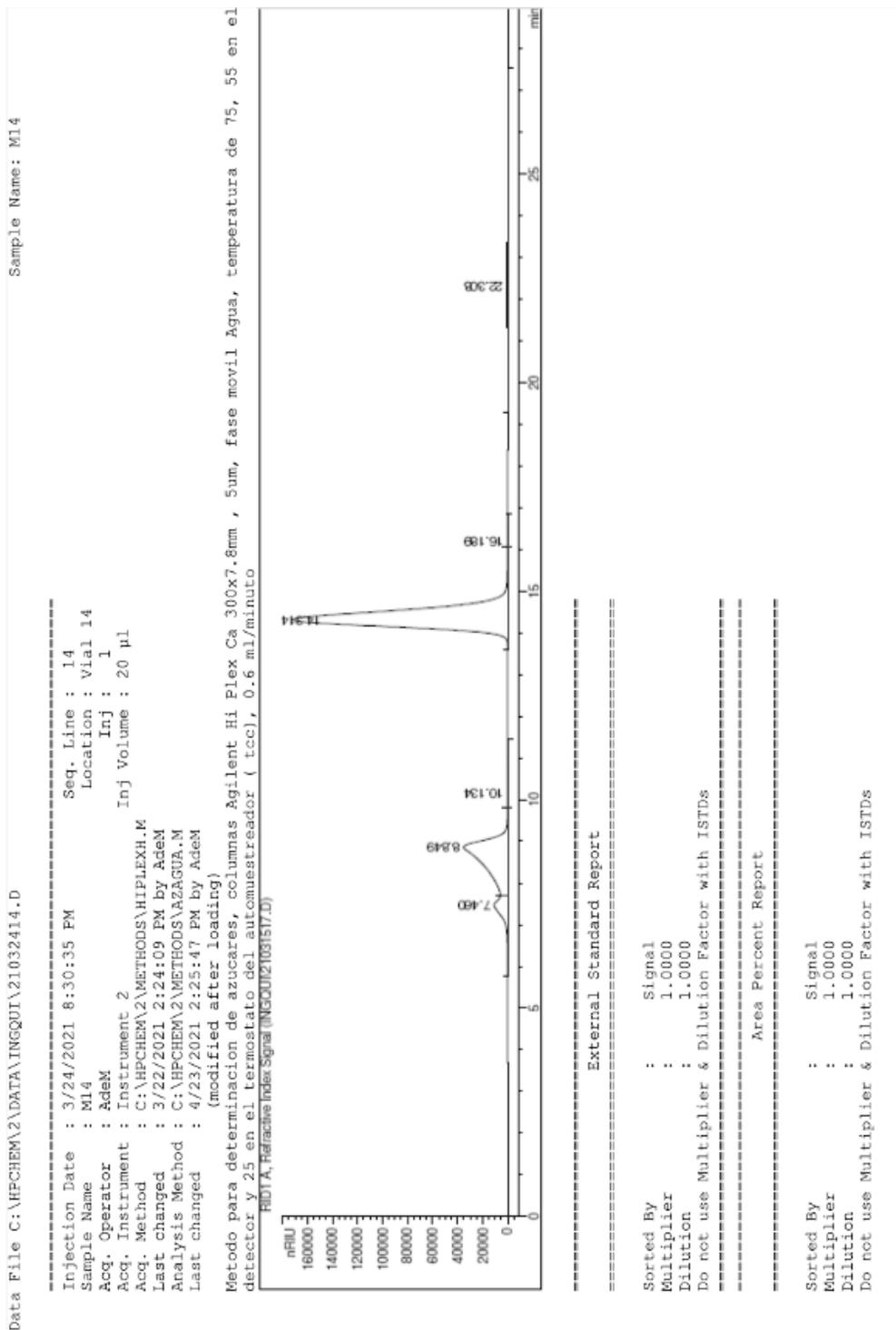
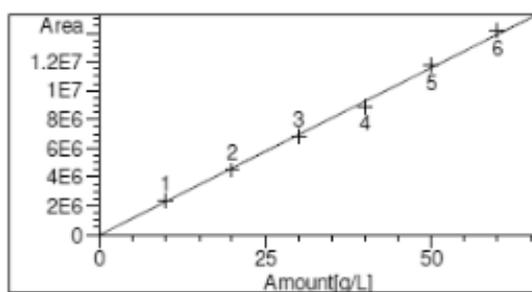


Figura 26. Curva de calibración de glicerina en HPLC utilizada en la cuantificación de glicerina

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [g/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
14.401	1	10.00000	2.37427e6	4.21182e-6	Glicerina 1
	2	20.00000	4.49233e6	4.45203e-6	
	3	30.00000	6.78590e6	4.42093e-6	
	4	40.00000	8.93399e6	4.47728e-6	
	5	50.00000	1.17764e7	4.24579e-6	
	6	60.00000	1.42012e7	4.22499e-6	



Glicerina 1 at exp. RT: 14.401
 RID1 A, Refractive Index Signal
 Correlation: 0.99971
 Residual Std. Dev.: 237913.71912
 Formula: $y = mx$
 m: 232463.46703
 x: Amount [g/L]
 y: Area

G. Espectros IR

Figura 27. Espectro IR del producto de la fermentación del sistema 0

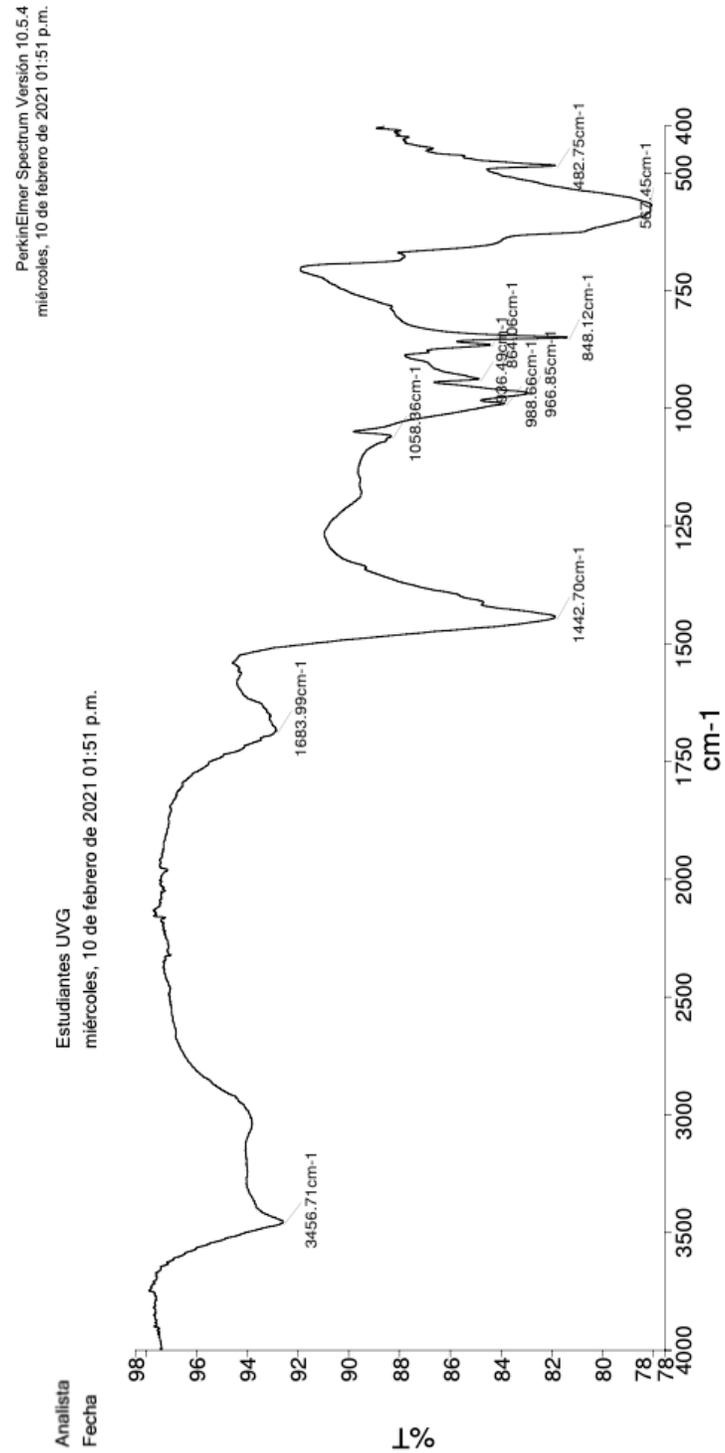


Figura 28. Espectro IR del producto de la fermentación del sistema 1

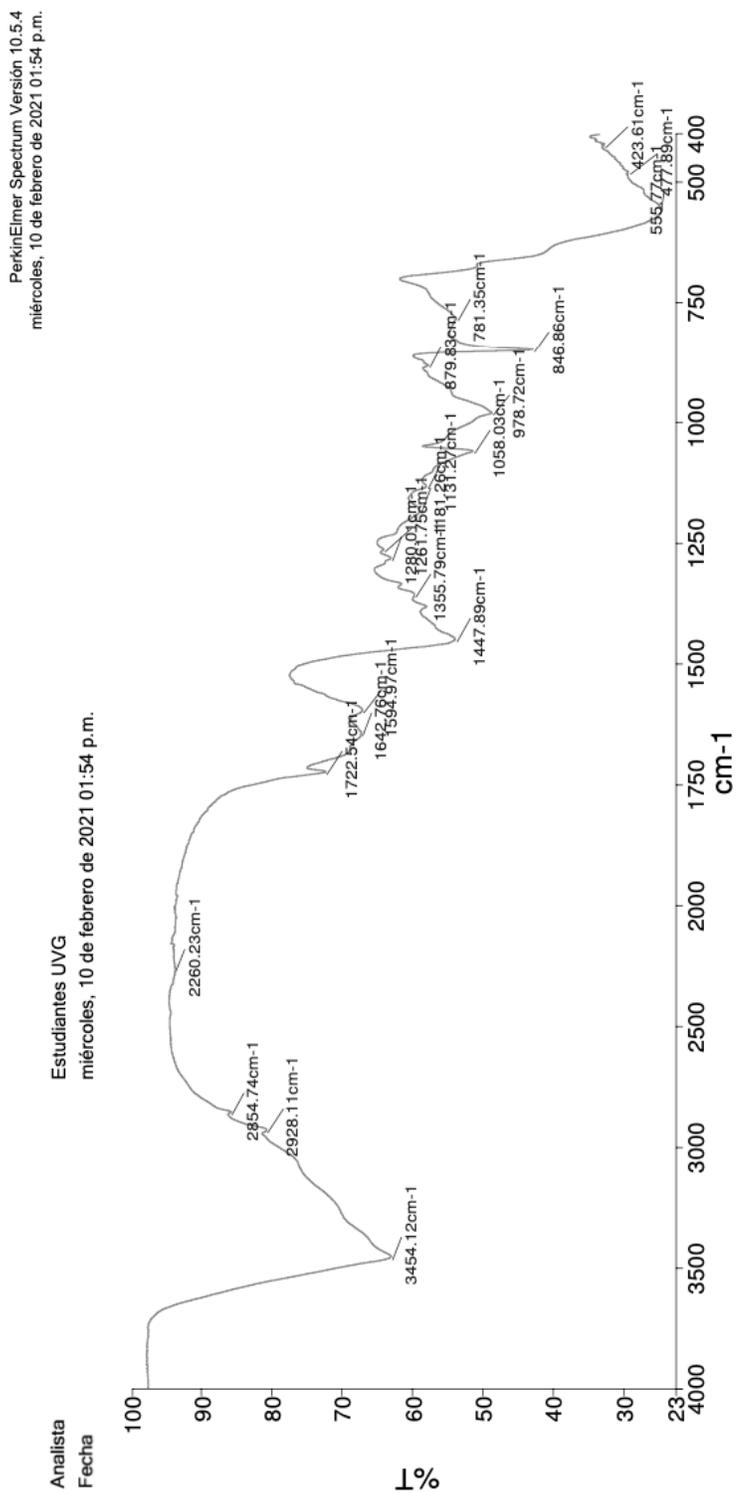


Figura 29. Espectro IR del producto de la fermentación del sistema 2

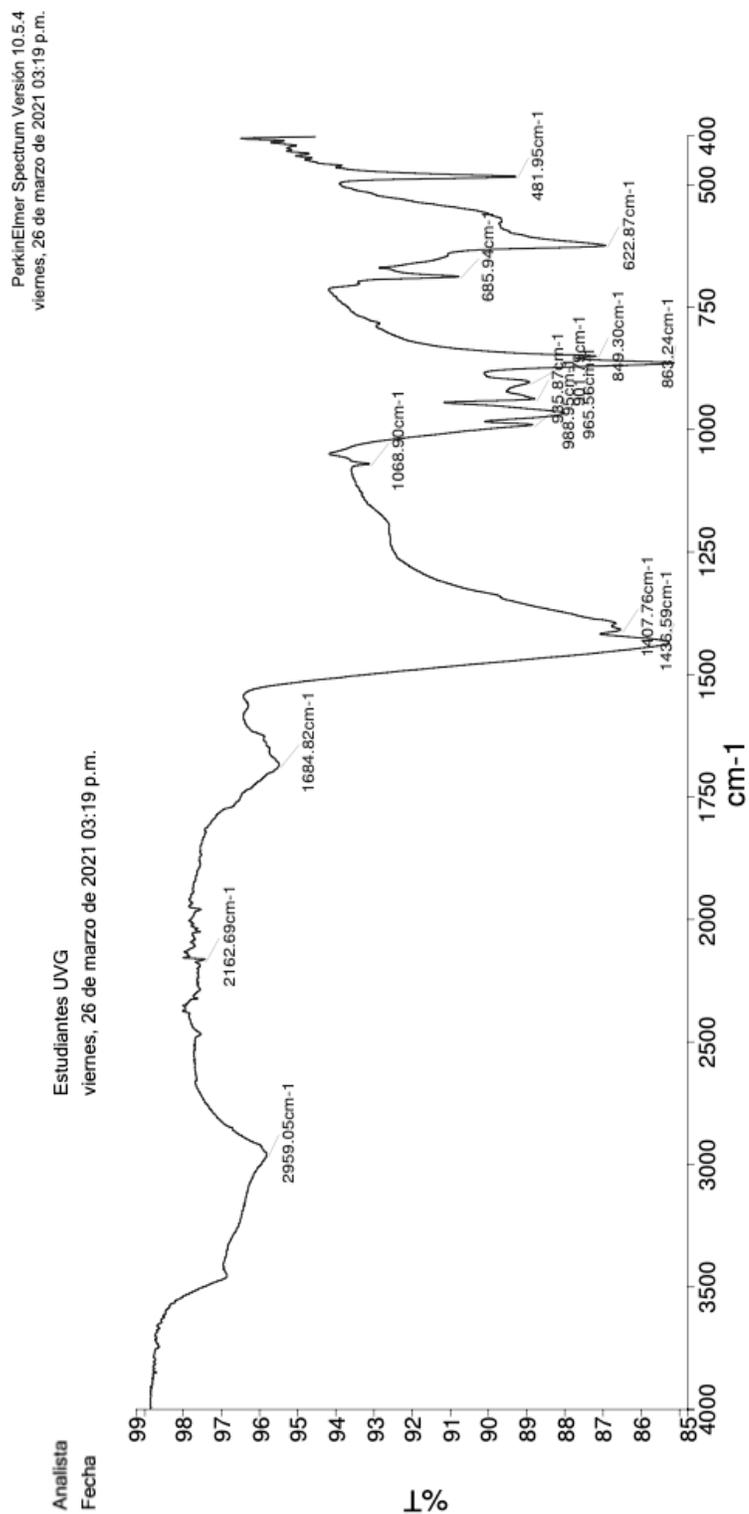


Figura 30. Espectro IR del producto de la fermentación del sistema 3

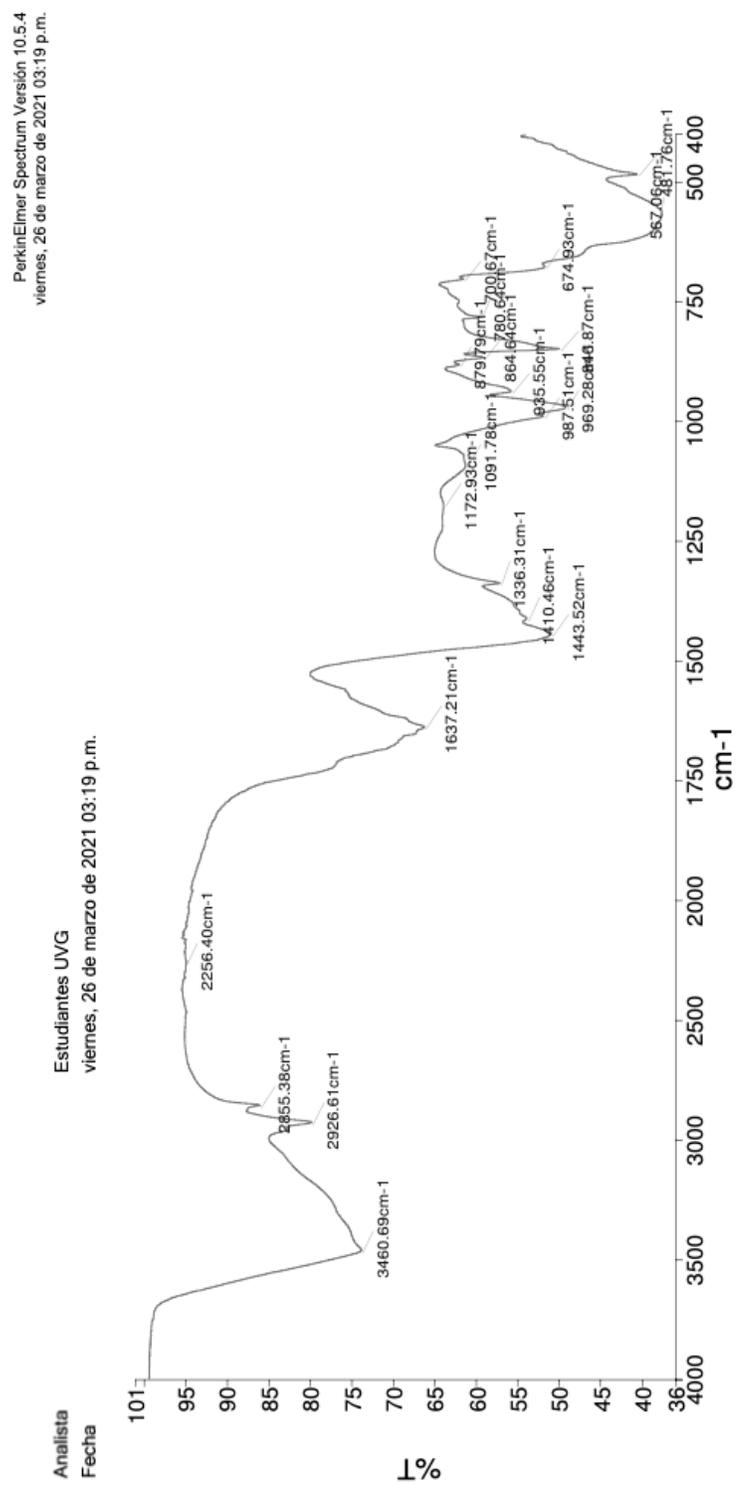


Figura 31. Espectro IR del producto de la fermentación de glicerina del proceso de biodiésel

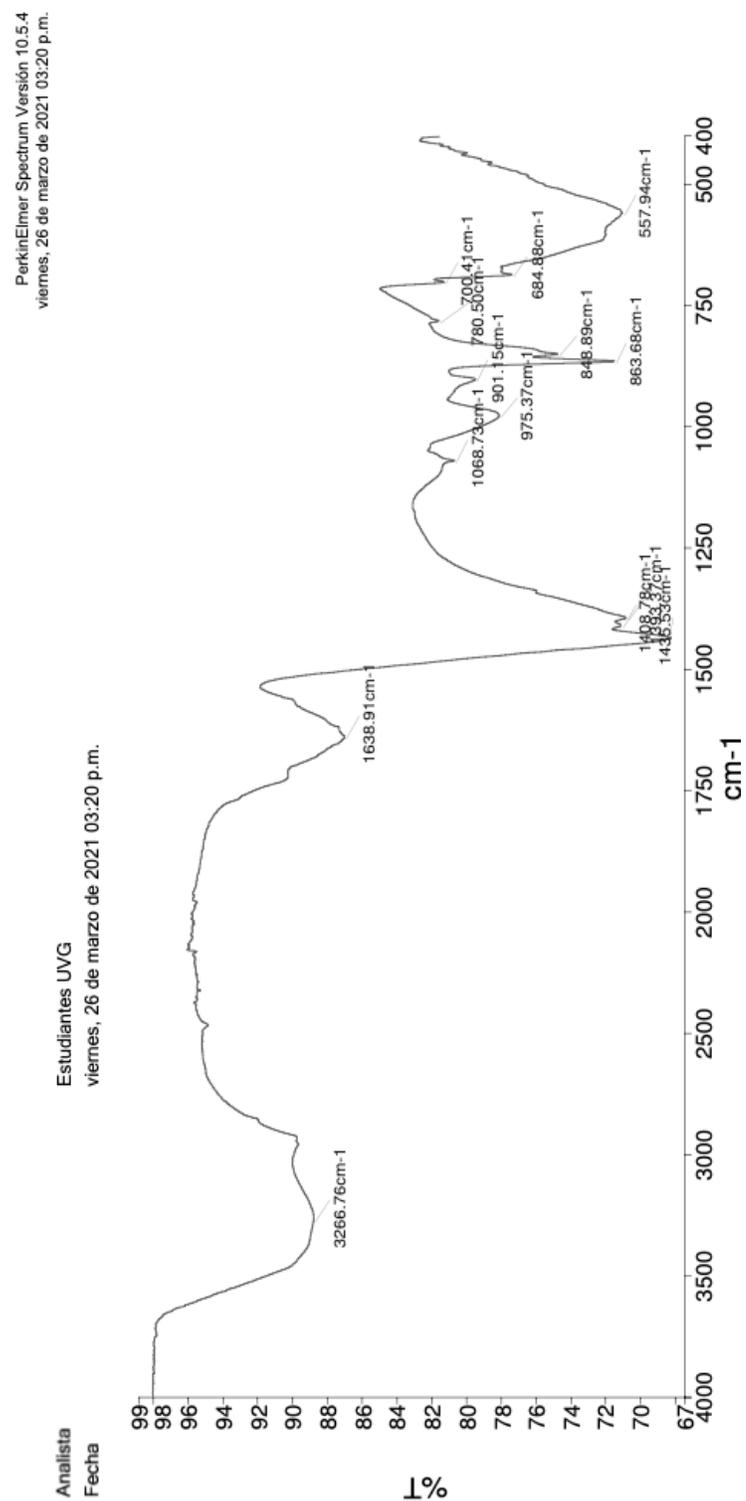
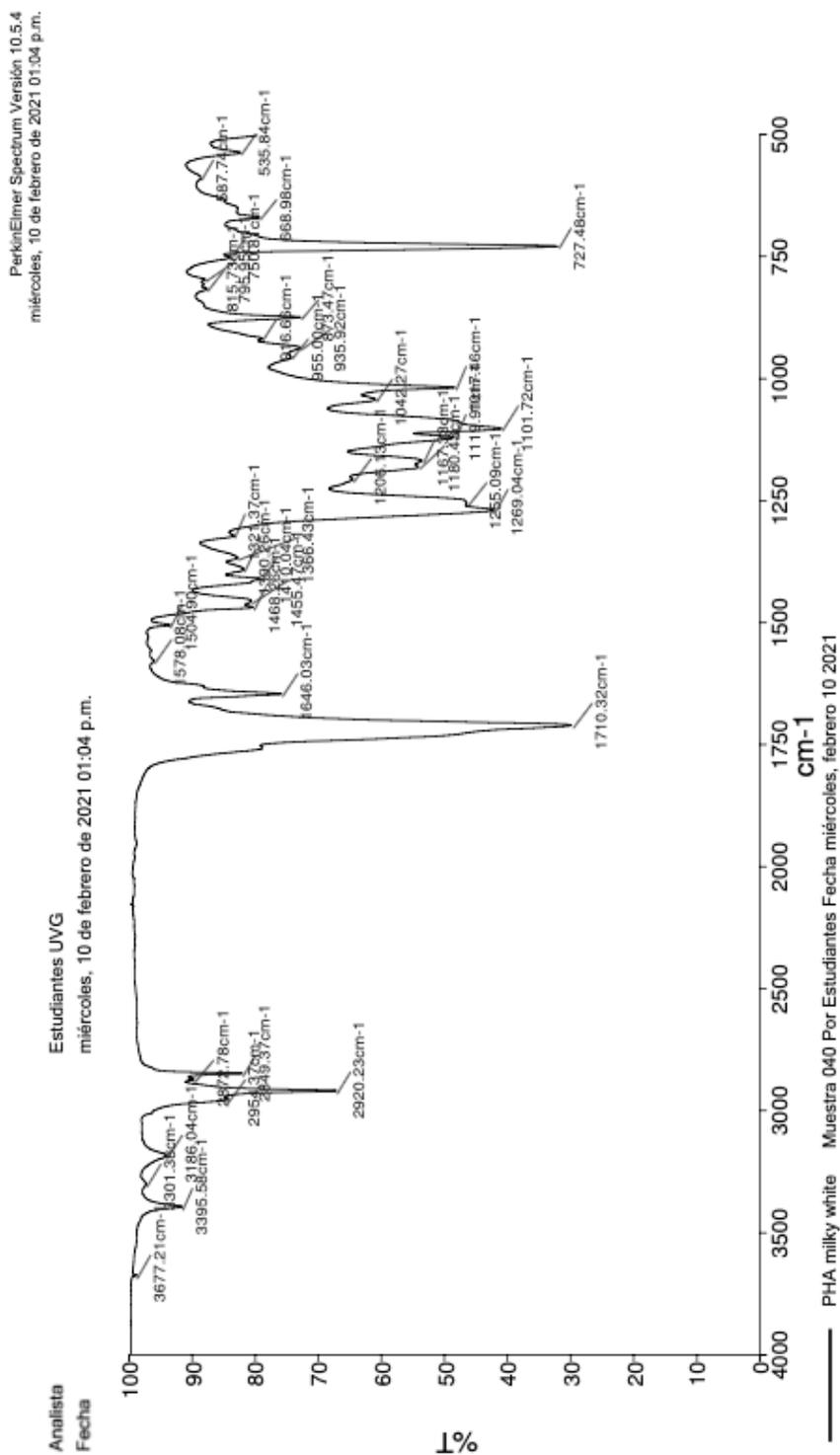


Figura 32. Espectro IR del estándar de PHA empleado en la comparación con el producto obtenido



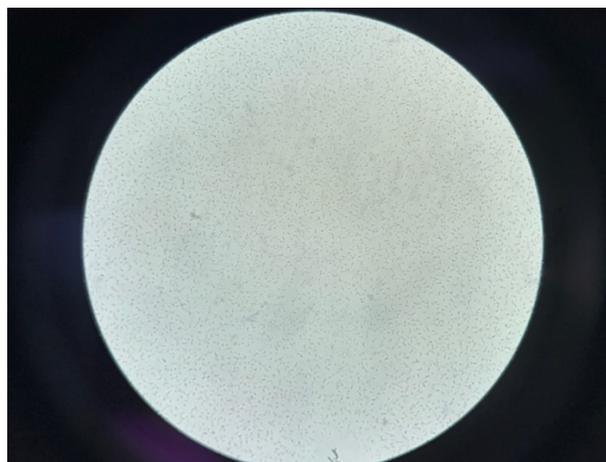
H. Fotografías

Figura 33. Propagación primaria y secundaria de *Bacillus megaterium* ATCC 14581



Fotografía tomada en el Laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 34. Verificación del crecimiento de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a partir de una concentración inicial de 20 g/L de glicerina de la tercera adaptación realizada por medio de su observación a través de un microscopio



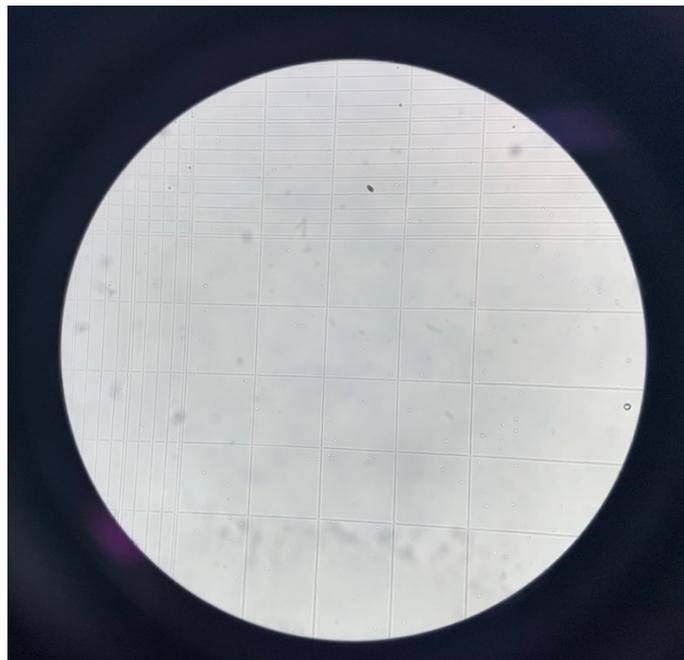
Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 35. Adaptaciones realizadas de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina



Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 36. Conteo celular de una de las cuatro secciones correspondientes a las esquinas de la cuadrícula de la cámara de Neubauer



Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 37. Sistema utilizado para la cuantificación de biomasa empleando la técnica de peso seco en un horno a 60 °C



Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 38. Fermentaciones realizadas a escala de 0.1 L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina



Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 39. Verificación cualitativa de la fermentación a partir de glicerina a escala de 0.1 L



Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 40. Preparación de inóculo realizando tres adaptaciones a glicerina como fuente de carbono a partir de una concentración inicial de 20 g/L para una fermentación a escala de 10 L



Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 41. Reactor *Bioflo* 415 utilizado en las fermentaciones a escala de 10 L



Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 42. Limpieza interior del reactor *Bioflo* 415 previo a la realización de una fermentación a escala de 10 L



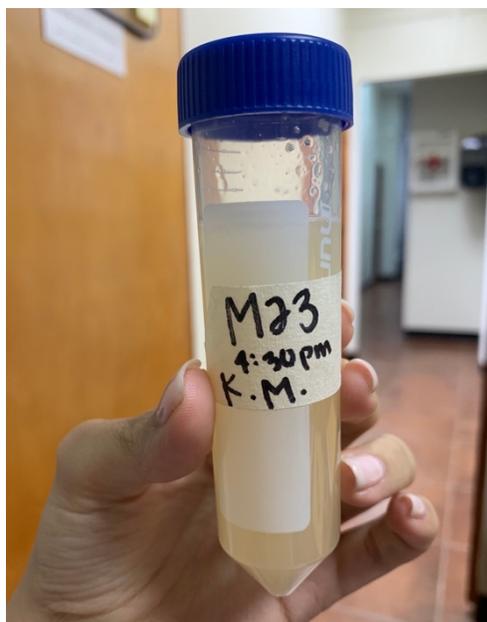
Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 43. Interior de una fermentación efectuada a escala de 10 L empleando el reactor *Bioflo* 415



Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 44. Sistema utilizado para la toma de muestras a lo largo del tiempo para las fermentaciones a escala de 10 L



Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 45. Volumen total de una fermentación a escala de 10 L extraído del reactor *Bioflo 415* para su posterior análisis químico



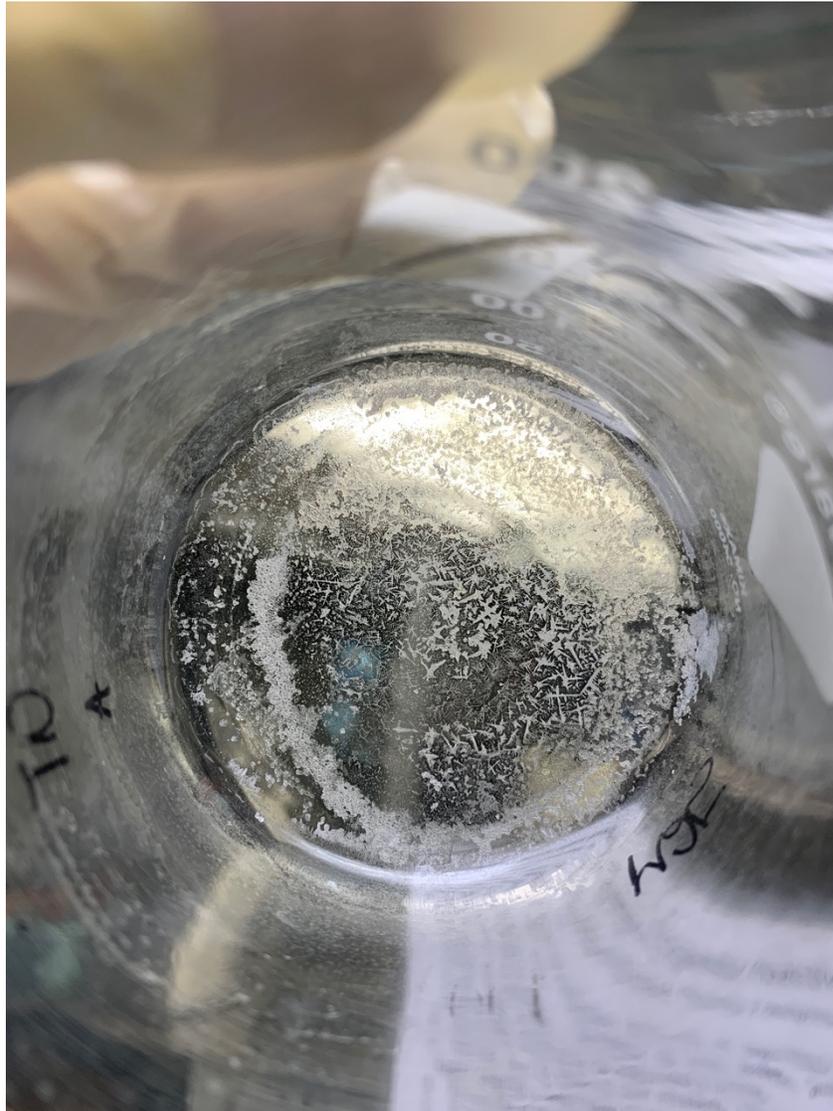
Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 46. Visualización de la separación de las fases de cloro y cloroformo para la extracción de PHA.



Fotografía tomada en el Laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 47. PHA extraído luego de ser secado en un horno a 60°C



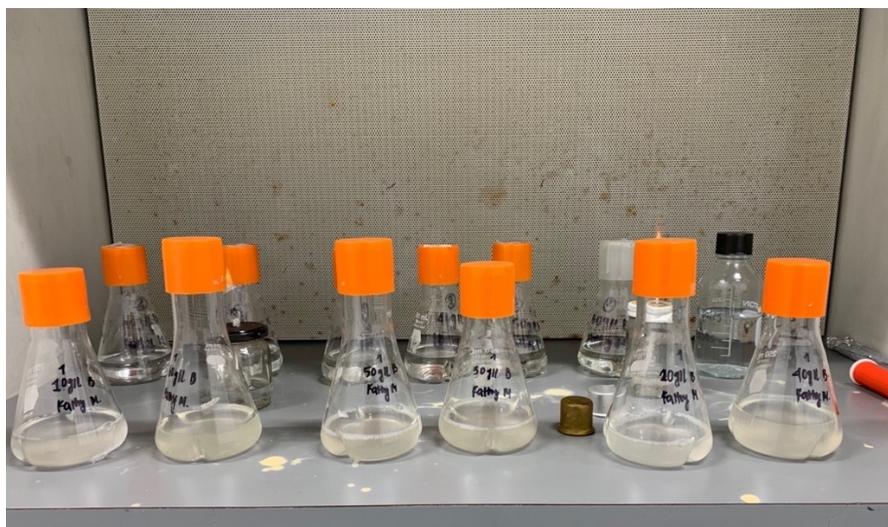
Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 48. Cuantificación de nitrógeno para el sistema 1 utilizando el método 10071 extraído del manual del equipo HACH DR 890



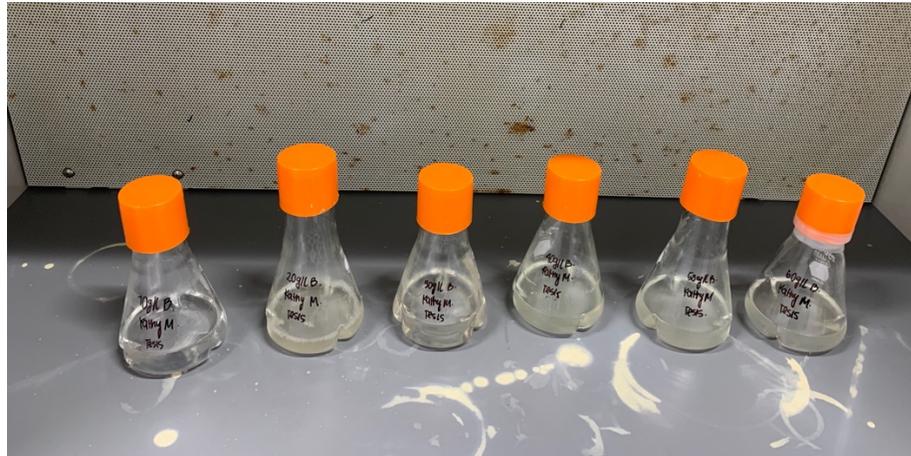
Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 49. Adaptaciones realizadas de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel



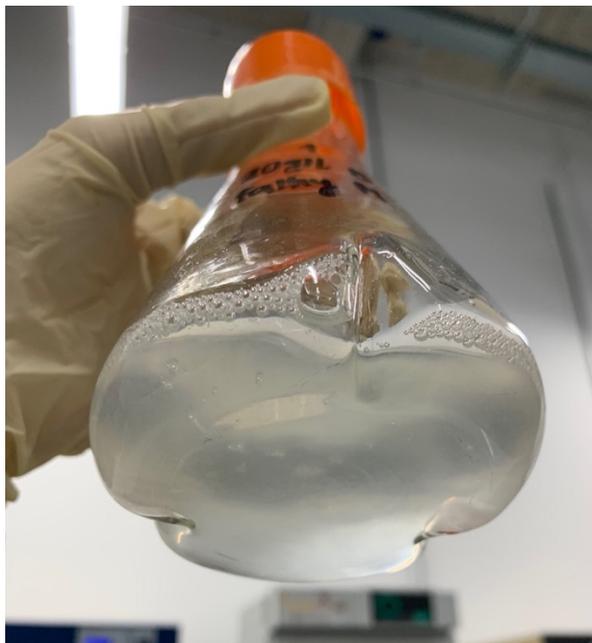
Fotografía tomada en el Laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 50. Fermentaciones realizadas a escala de 0.1 L a partir de distintas concentraciones iniciales de glicerina cruda del proceso de biodiésel



Fotografía tomada en el Laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 51. Verificación cualitativa de la fermentación a partir de glicerina cruda del proceso de biodiésel a escala de 0.1 L



Fotografía tomada en el Laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.

Figura 52. Glicerina cruda del proceso de biodiésel utilizada en las experimentaciones



Fotografía tomada en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Fuente: Propia.