

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Determinación del modelo cinético de reacción para la producción  
de polihidroxiclcanoatos a partir de azúcar comercial

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Sebastiane Fernando Guillén Alvarez  
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala,

2021



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería




Determinación del modelo cinético de reacción para la producción  
de polihidroxialcanoatos a partir de azúcar comercial

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Sebastiane Fernando Guillén Alvarez  
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala,

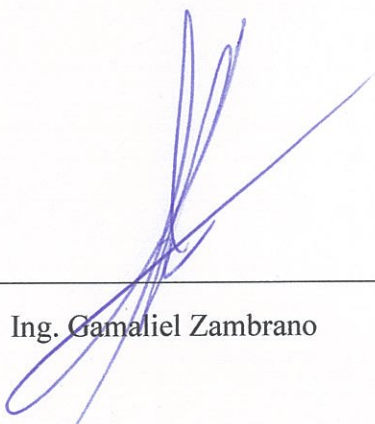
2021

Vo. Bo. :

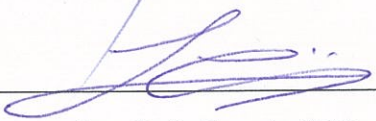
(f)   
\_\_\_\_\_

Ing. Luis Ernesto Núñez

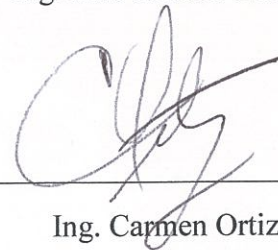
Tribunal examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_

Ing. Gamaliel Zambrano

f)   
\_\_\_\_\_

Ing. Luis Ernesto Núñez

f)   
\_\_\_\_\_

Ing. Carmen Ortiz

Fecha de aprobación: Guatemala, 17 de diciembre de 2021

## **PREFACIO**

La elaboración de la presente tesis surgió del interés personal de profundizar en la necesidad de determinar un modelo cinético para la producción de un bioplástico. Durante el transcurso de mi licenciatura, me ha interesado investigar soluciones para retos ambientales como la contaminación del plástico y del poder escalar procesos. Por lo que, mi principal reto en esta investigación consistió en producir polihidroxicanoatos, el cual es un bioplástico, y determinar un modelo matemático que explicara su síntesis.

Cabe puntualizar que este proyecto ha sido realizado dentro las instalaciones del departamento de ingeniería química de la Universidad del Valle de Guatemala bajo la dirección del ingeniero Zambrano. Agradezco al ingeniero Núñez por sus asesorías de la presente tesis, así como la confianza que me otorgó. Me parece importante constatar que este proyecto constituye un gran esfuerzo, por lo que no hubiera sido posible sin la ayuda de mis familiares y amigos.

## ÍNDICE

PREFACIO .....	V
LISTA DE CUADROS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE ECUACIONES .....	XIV
RESUMEN .....	XV
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS .....	2
A. OBJETIVO GENERAL .....	2
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
III. JUSTIFICACIÓN .....	3
IV. MARCO TEÓRICO .....	4
A. <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	4
B. POLÍMEROS .....	11
C. AZÚCAR .....	14
D. MODELO CINÉTICO .....	17
E. ANÁLISIS QUÍMICO Y MICROBIANO .....	20
V. ANTECEDENTES .....	23
VI. METODOLOGÍA .....	25
A. INVERSIÓN DE SACAROSA .....	25
B. PREPARACIÓN CAJA PETRI E INÓCULO INICIAL .....	26
C. PRODUCCIÓN PHA EN ERLLENMEYERS .....	28
D. PRODUCCIÓN PHA EN REACTOR SARTORIUS .....	30
E. PRODUCCIÓN PHA EN REACTOR BIOFLO 415 .....	32

F. PURIFICACIÓN PHA .....	33
G. ANÁLISIS HACH NITRÓGENO .....	34
H. ANÁLISIS HACH CARBONO.....	35
I. ANÁLISIS HPLC.....	36
J. ANÁLISIS IR.....	36
K. CONTEO MICROBIANO.....	37
L. MODELO CINÉTICO .....	38
VII. RESULTADOS.....	39
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	50
IX. CONCLUSIONES .....	56
X. RECOMENDACIONES.....	57
XI. BIBLIOGRAFÍA .....	58
XII. ANEXOS .....	61
A. DATOS ORIGINALES .....	61
B. DATOS CALCULADOS .....	69
C. DATOS DE REACTIVOS .....	76
D. DATOS DE EQUIPO .....	78
E. MUESTRA DE CÁLCULOS .....	82
F. ANÁLISIS DE ERROR.....	86
G. CURVAS DE CALIBRACIÓN HPLC.....	88
H. ESPECTROS IR DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS.....	90
I. COMPORTAMIENTO DE VARIABLES EN REACTOR BIostat Aplus.....	97

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Constantes de cinética para la producción de polihidroxialcanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> obtenidos de Berkeley Madonna .....	24
<b>Cuadro 2.</b> Rendimientos de la fermentación de dos fuentes de carbono para la producción de polihidroxialcanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> .....	39
<b>Cuadro 3.</b> Rendimientos de la fermentación para la producción de polihidroxialcanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> variando la relación de carbono y nitrógeno.....	41
<b>Cuadro 4.</b> Constantes de cinética para la producción de polihidroxialcanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> obtenidos de Berkeley Madonna. ....	47
<b>Cuadro 5.</b> Picos de absorbancia característicos de una molécula de PHA obtenidos por análisis FT-IR. ....	49
<b>Cuadro 6.</b> Concentración de azúcares iniciales y finales de fermentación en Erlenmeyers de 250 mL para la determinación de producción de polihidroxialcanoatos variando la fuente de sustrato .....	61
<b>Cuadro 7.</b> Pesos de beakers para la determinación de peso seco de biomasa y de peso de polihidroxialcanoatos para la fermentación en Erlenmeyers de 250 mL.....	62
<b>Cuadro 8.</b> Concentración de pH de fermentación en Erlenmeyer de 250 mL para la determinación de producción de polihidroxialcanoatos variando la fuente de sustrato.....	62
<b>Cuadro 9.</b> Concentración de nitrógeno y carbono iniciales y finales de fermentación en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus para la determinación de producción de polihidroxialcanoatos variando la relación carbono nitrógeno.....	63
<b>Cuadro 10.</b> Pesos de beakers para la determinación de peso seco de biomasa y de peso de polihidroxialcanoatos para la fermentación en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.....	64
<b>Cuadro 11.</b> Concentración de pH de fermentación en reactor Sartorius BIOSTAT Aplus para la determinación de producción de polihidroxialcanoatos variando la relación carbono nitrógeno..	65
<b>Cuadro 12.</b> Concentración de nitrógeno y azúcares suavizados de fermentación en reactor BioFlo 415 para la propuesta del modelo cinético de la producción de polihidroxialcanoatos utilizando <i>Bacillus subtilis</i> .....	65

<b>Cuadro 13.</b> Pesos de beakers para la determinación de peso seco de biomasa y de peso de polihidroxicanoatos para la corrida 1 de la fermentación en reactor BioFlo 415. ....	67
<b>Cuadro 14.</b> Pesos de beakers para la determinación de peso seco de biomasa y de peso de polihidroxicanoatos para la corrida 2 de la fermentación en reactor BioFlo 415. ....	68
<b>Cuadro 15.</b> Concentración de pH de fermentación en reactor BioFlo para la determinación de producción de polihidroxicanoatos .....	69
<b>Cuadro 16.</b> Concentración de sustrato, biomasa y polihidroxicanoatos en fermentaciones realizadas en Erlenmeyers de 250 mL y los rendimientos de producción de PHA y biomasa. ....	69
<b>Cuadro 17.</b> Concentración de sustrato, biomasa y polihidroxicanoatos en fermentaciones realizadas en reactor SARTORIUS BIostat A plus y los rendimientos de producción de PHA y biomasa respecto a carbono y nitrógeno. ....	71
<b>Cuadro 18.</b> Concentración de biomasa y polihidroxicanoatos en fermentaciones realizadas en reactor BioFlo 415. ....	72
<b>Cuadro 19.</b> Concentración biomasa, nitrógeno, azúcares y polihidroxicanoatos promedio en las fermentaciones realizadas en BioFlo 415. ....	73
<b>Cuadro 20.</b> Coeficientes calculados utilizando Berkeley Madonna para la determinación del modelo matemático. ....	75
<b>Cuadro 21.</b> Información del ácido sulfúrico empleado para inversión de sacarosa. ....	76
<b>Cuadro 22.</b> Información de hidróxido de sodio empleado para neutralizar los medios. ....	76
<b>Cuadro 23.</b> Información de cloruro de sodio usado para preparar los medios. ....	76
<b>Cuadro 24.</b> Información de extracto de levadura usado para preparar los medios. ....	77
<b>Cuadro 25.</b> Información de caldo nutritivo usado para el inóculo inicial. ....	77
<b>Cuadro 26.</b> Información de agar nutritivo empleado para realizar cultivos de <i>Bacillus subtilis</i> . .	77
<b>Cuadro 27.</b> Información de cloroformo empleado para la purificación de polihidroxicanoatos. ....	77
<b>Cuadro 28.</b> Información de hipoclorito de sodio empleado para la extracción de polihidroxicanoatos. ....	78
<b>Cuadro 29.</b> Información de balanza analítica para realizar los pesos secos. ....	78
<b>Cuadro 30.</b> Información de balanza para pesaje de reactivos. ....	78

<b>Cuadro 31.</b> Información de centrifuga de capacidad de un 1L para extracción de PHA.....	79
<b>Cuadro 32.</b> Información de centrifuga para tubos Falcon de 50 mL para purificación de PHA. .	79
<b>Cuadro 33.</b> Información de horno de convección para determinar peso seco. ....	79
<b>Cuadro 34.</b> Información de agitador para realizar la fermentación en Erlenmeyers de 250 mL. .	79
<b>Cuadro 35.</b> Información de incubadora para cultivo en cajas Petri de Bacillus subtilis.....	80
<b>Cuadro 36.</b> Información de biorreactor BioFlo 415 para fermentación de Bacillus subtilis. ....	80
<b>Cuadro 37.</b> Información de biorreactor BIOSTAT A Plus para fermentación de Bacillus subtilis. .....	80
<b>Cuadro 38.</b> Información de estufa para preparación de medios. ....	80
<b>Cuadro 39.</b> Información de Vortex para homogenizar solución para conteo microbiano. ....	81
<b>Cuadro 40.</b> Información de autoclave para la preparación de medios.....	81
<b>Cuadro 41.</b> Información de espectrofotómetro para análisis de IR de muestras de polihidroxicanoatos. ....	81
<b>Cuadro 42.</b> Información de reactor digital Hach para análisis de carbono y nitrógeno.....	81
<b>Cuadro 43.</b> Información de Calorímetro Hach para digestión de soluciones. ....	82
<b>Cuadro 44.</b> Información de equipo HPLC para análisis de concentración de azúcar. ....	82
<b>Cuadro 45.</b> Información de microscopio para conteos microbianos. ....	82

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Colonia macroscópica de <i>Bacillus subtilis</i> en medio líquido. ....	4
<b>Figura 2.</b> Ejemplo de un metabolosoma. ....	5
<b>Figura 3.</b> Ingreso de la glucosa a la célula por mecanismo PTS.....	5
<b>Figura 4.</b> Ingreso de la sacarosa a la célula por mecanismo PTS. ....	6
<b>Figura 5.</b> Incorporación de la molécula sacarosa-6-fosfato a glucolisis. ....	6
<b>Figura 6.</b> Ruta metabólica glucolisis.....	7
<b>Figura 7.</b> Producción de acetil-CoA mediado por el complejo piruvato deshidrogenasa. ....	7
<b>Figura 8.</b> Ruta metabólica de la síntesis de PHA a partir de Acetil-CoA. ....	8
<b>Figura 9.</b> Reactor discontinuo. ....	8
<b>Figura 10.</b> Reactor continuo.....	9
<b>Figura 11.</b> Reactor semicontinuo. ....	9
<b>Figura 12.</b> Fermentador BIOSTAT Aplus. ....	10
<b>Figura 13.</b> Fermentador BioFlo 415.....	11
<b>Figura 14.</b> Estructura de PHAs. ....	13
<b>Figura 15.</b> Molécula característica de PHA analizada por el método de FT-IR. ....	14
<b>Figura 16.</b> Estructura molecular del azúcar. ....	14
<b>Figura 17.</b> Ejemplo de la interfase de Berkeley Madonna. ....	19
<b>Figura 18.</b> Cámara de Neubauer. ....	22
<b>Figura 19.</b> Balance de masa del sistema 1 del Cuadro 1 para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> . ....	39
<b>Figura 20.</b> Balance de masa del sistema 2 del Cuadro 1 para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> . ....	40
<b>Figura 21.</b> Balance de masa del sistema 3 del Cuadro 1 para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> . ....	40
<b>Figura 22.</b> Balance de masa del sistema 4 del Cuadro 1 para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> . ....	41

<b>Figura 23.</b> Balance de masa del sistema 1 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> .....	42
<b>Figura 24.</b> Balance de masa del sistema 2 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> .....	43
<b>Figura 25.</b> Balance de masa del sistema 3 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> .....	43
<b>Figura 26.</b> Balance de masa del sistema 4 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> .....	44
<b>Figura 27.</b> Balance de masa del sistema 5 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> .....	44
<b>Figura 28.</b> Balance de masa del sistema 6 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> .....	45
<b>Figura 29.</b> Ajuste de modelo cinético con Berkeley Madonna a los resultados experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de nitrógeno y producción de PHA.....	48
<b>Figura 30.</b> Resultados experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de azúcares y producción de PHA.....	48
<b>Figura 31.</b> Ajuste de modelo cinético con Berkeley Madonna a los resultados experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de nitrógeno y producción de PHA con su desviación estándar. ....	75
<b>Figura 32.</b> Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de sacarosa. ....	88
<b>Figura 33.</b> Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de glucosa.....	88
<b>Figura 34.</b> Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de fructosa. ....	88
<b>Figura 35.</b> Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de etanol. ....	88
<b>Figura 36.</b> Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de ácido acético.....	89
<b>Figura 37.</b> Curva de calibración de HPLC para la cuantificación ácido láctico. ....	89
<b>Figura 38.</b> Muestra de PHA utilizando sacarosa como sustrato, con una relación 300:1 (m/m) carbono-nitrógeno.....	90
<b>Figura 39.</b> Muestra de PHA utilizando sacarosa como sustrato, con una relación 179:1 (m/m) carbono-nitrógeno.....	91

<b>Figura 40.</b> Muestra de PHA utilizando sacarosa como sustrato, con una relación 83:1 (m/m) carbono-nitrógeno.....	92
<b>Figura 41.</b> Muestra de PHA utilizando glucosa como sustrato, con una relación 263:1 (m/m) carbono-nitrógeno.....	93
<b>Figura 42.</b> Muestra de PHA utilizando glucosa como sustrato, con una relación 184:1 (m/m) carbono-nitrógeno.....	94
<b>Figura 43.</b> Muestra de PHA utilizando glucosa como sustrato, con una relación 113: 1 (m/m) carbono-nitrógeno.....	95
<b>Figura 44.</b> Muestra de PHA obtenida de la fermentación utilizando el reactor BioFlo 415.....	96
<b>Figura 45.</b> Fermentación de Bacillus subtilis utilizando 20 g/L de sacarosa para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.....	97
<b>Figura 46.</b> Fermentación de Bacillus subtilis utilizando 15 g/L de sacarosa para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.....	97
<b>Figura 47.</b> Fermentación de Bacillus subtilis utilizando 10 g/L de sacarosa para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.....	98
<b>Figura 48.</b> Fermentación de Bacillus subtilis utilizando 20 g/L de sacarosa invertida para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.....	98
<b>Figura 49.</b> Fermentación de Bacillus subtilis utilizando 15 g/L de sacarosa invertida para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.....	99
<b>Figura 50.</b> Fermentación de Bacillus subtilis utilizando 10 g/L de sacarosa invertida para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.....	99
<b>Figura 51.</b> Fermentación de Bacillus subtilis en Reactor BioFlo415.....	100
<b>Figura 52.</b> Fermentación de Bacillus subtilis en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.....	100
<b>Figura 53.</b> Purificación de polihidroxicanoatos utilizando cloroformo e hipoclorito de sodio.....	101

## LISTA DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Ecuación de Monod.....	18
<b>Ecuación 2.</b> Ecuación de Monod para el consumo de sustrato. ....	18
<b>Ecuación 3.</b> Cálculo coeficiente de rendimiento global $Y_p/x$ .....	19
<b>Ecuación 4.</b> Suspensión celular inicial.....	22
<b>Ecuación 5.</b> Ecuación cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> . ....	23
<b>Ecuación 6.</b> Ecuación cinética de consumo de glucosa en función del tiempo para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> . ....	23
<b>Ecuación 7.</b> Ecuación cinética de la formación de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
<b>Ecuación 8.</b> Ecuación de Monod para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> .....	46
<b>Ecuación 9.</b> Ecuación cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> . ....	46
<b>Ecuación 10.</b> Ecuación cinética de consumo de nitrógeno en función del tiempo para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> . ....	46
<b>Ecuación 11.</b> Ecuación cinética de la formación de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> .....	47
<b>Ecuación 12.</b> Cálculo coeficiente de rendimiento $Y_p/x$ .....	82
<b>Ecuación 13.</b> Cálculo coeficiente de rendimiento $Y_x/s$ .....	83
<b>Ecuación 14.</b> Promedio aritmético. ....	83
<b>Ecuación 15.</b> Propagación de error sumas y restas .....	86
<b>Ecuación 16.</b> Propagación de error para multiplicaciones y divisiones .....	86
<b>Ecuación 17.</b> Desviación estándar. ....	87

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo general realizar un modelo cinético de reacción para la producción de polihidroxialcanoatos a partir de azúcar comercial utilizando *Bacillus subtilis*. Para esto se determinó la fuente de carbono a emplear utilizando sacarosa y sacarosa invertida evaluando los rendimientos de producción de PHA. Las azúcares fueron cuantificadas utilizando HPLC y la experimentación fue realizada en Erlenmeyers de 250 mL. Luego varió la relación carbono y nitrógeno para obtener una mayor concentración de producto final. Se determinó la cantidad inicial y final por medio del colorímetro HACH y se realizó la experimentación en el reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus de un litro de capacidad. Con las mejores condiciones previamente establecidas se realizaron dos fermentaciones de 10 litros en el reactor BioFlo 415 para tener los datos experimentales para la realización del modelo.

Se obtuvo un mayor rendimiento de formación de polihidroxialcanoatos contra consumo de sustrato de 9.58% (m/m) al utilizar 22.5 g/L de sacarosa y un rendimiento de 6.9% (m/m) empleando una relación de 300:1 ( $\frac{g \text{ carbono}}{g \text{ nitrógeno}}$ ). Por otra parte, se obtuvo un mayor rendimiento de formación de biomasa con respecto al consumo de sustrato de 9.16% (m/m) al emplear 19.5 g/L de sacarosa invertida a las condiciones evaluadas. Se determinó que el sustrato limitante era el nitrógeno debido a que cuando había una escasez de este (concentración 0.10 g/L), disminuía el crecimiento celular y aumentaba la producción de polihidroxialcanoatos en la fase estacionaria. Finalmente, se obtuvo un modelo modificando el de Monod donde la ecuación de consumo de sustrato tiene un factor de aceleración para reflejar que al principio de la fermentación este va a ser más consumido por la bacteria y una ecuación modificada para la producción de PHA que contiene dos parámetros cinéticos para explicar la formación del producto en la fase exponencial y en la fase estacionaria.

# I. INTRODUCCIÓN

El azúcar es el principal producto agroindustrial de exportación de Guatemala. Actualmente, es el cuarto exportador de azúcar a nivel mundial, el segundo de Latinoamérica y el tercero con mayor productividad en el mundo. El proceso de fabricación de azúcar se puede resumir en ocho pasos: transporte de la caña de azúcar, molienda, clarificación, evaporación, cristalización, separación o centrifugación, refinado y secado. Del proceso se pueden obtener productos colaterales como bagazo, melaza, cachaza, cenizas de hornos, efluentes líquidos y gases de combustión (ASAZGUA, 2020).

La melaza o mieles se destinan a la producción de alcohol, levadura, lisina glutamato monosódico y para la alimentación animal. Las mieles finales de caña son el licor madre resultante de la cristalización final del azúcar. Sus principales componentes son agua y carbohidratos. Su perfil de hidratos de carbono la hace fácilmente degradable en el rumen dando lugar a una fermentación típicamente butírica. El almacenaje de las mieles finales resulta ser un costo importante para la industria azucarera (Ballat, Chavarrias, & Purroy, 2014)). Por lo que para esta investigación se propuso emular este subproducto para la producción de un biopolímero. El lector aprenderá de este trabajo como definir las condiciones necesarias para la producción de PHA utilizando mieles clarificadas como subproducto.

Los PHA (polihidroxicanoatos) son poliésteres lineales producidos por bacterias por fermentación del azúcar (Byrom, 1991). La bacteria *Bacillus subtilis* es capaz de producir este biopolímero en condiciones de estrés como por ejemplo cuando existe escasez de nitrógeno y altas concentraciones de carbono en el medio. Dependiendo de la fuente de sustrato empleado y la de la relación carbono y nitrógeno utilizado, va a hacer el rendimiento de producción de producto. Para comprender más el proceso se planteó la cinética de la reacción para correlacionar los datos experimentales y determinar los parámetros cinéticos utilizando el modelo de Monod como base.

El modelo de Monod describe una relación entre el crecimiento microbiano y el sustrato que limita el crecimiento. Los modelos matemáticos son importantes, ya que nos permiten correlacionar datos experimentales, hacer una predicción cuantitativa del proceso y reducir costos en diseño experimental y de proceso.

## **II. OBJETIVOS**

### **A. OBJETIVO GENERAL**

Realizar un modelo cinético de reacción para la producción de polihidroxicanoatos a partir de azúcar comercial utilizando *Bacillus subtilis*.

### **B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el rendimiento de la fermentación de dos fuentes de carbono para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.
2. Determinar el rendimiento de la fermentación para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis* variando la relación de carbono y nitrógeno.
3. Determinar el modelo matemático de la reacción de la fermentación para la producción de polihidroxicanoatos utilizando *Bacillus subtilis*.

### III. JUSTIFICACIÓN

En 2015, se produjeron 6,300 millares de toneladas de residuos plásticos en Guatemala y su lento proceso de degradación ha aumentado la contaminación en los suelos, ríos y mares ( (de Paz, 2021). Por lo que es de vital importancia buscar sustitutos como los polihidroxialcanoatos (PHA), los cuales son bioplásticos producidos intracelularmente por *Bacillus subtilis*, El mayor costo de producción del PHA es la fuente de sustrato para crecer las bacterias. En los últimos cinco años, Guatemala ha exportado más de 14 millones de toneladas métricas de azúcar y se puede utilizar como fuente de carbono (Sugarforgood, 2017).

En el país no se ha evaluado las condiciones necesarias para la producción de este bioplástico. Se ha reportado que la relación carbono y nitrógeno tiene un efecto en la producción de PHA. Por lo que para este trabajo de graduación se propone utilizar azúcar comercial como sustrato, variando su concentración inicial. Con el fin de estudiar las condiciones que permitan obtener mayores rendimientos de producción y aprovechar una fuente de carbono que se produce en Guatemala.

Para poder escalar el proceso, se requiere de un modelo cinético que exprese la producción de PHA. Actualmente no se cuentan con modelos empleando azúcar comercial de Guatemala para el estudio de la reacción. Por lo que también se propone en este trabajo de graduación determinar un modelo cinético utilizando *Bacillus subtilis* para la producción de PHA, el cual sirve para comprender mejor el proceso y poder predecir la formación del producto.

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. *BACILLUS SUBTILIS*

#### 1. Microorganismo

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva encontrada en el suelo. Posee la habilidad de formar una endospora protectora para tolerar condiciones extremas. Es considerada como un organismo seguro por la “Food and Drug Administration”. Generalmente es reconocida como un microorganismo estrictamente aeróbico, pero crece en condiciones anaeróbicas utilizando nitratos como aceptor de electrones para respiración celular, por lo que debe ser reconocido como anaerobio facultativo. Ha sido empleada altamente en la industria para la producción de proteínas recombinantes, aminoácidos y químicos. Además, se utiliza para la producción de metabolitos, biorremediación, generación de energía y la producción de polihidroxicanoatos (Hoffmann, Troup, Szabo, Hungerer, & Jahn, 1995).

**Figura 1.** Colonia macroscópica de *Bacillus subtilis* en medio líquido.



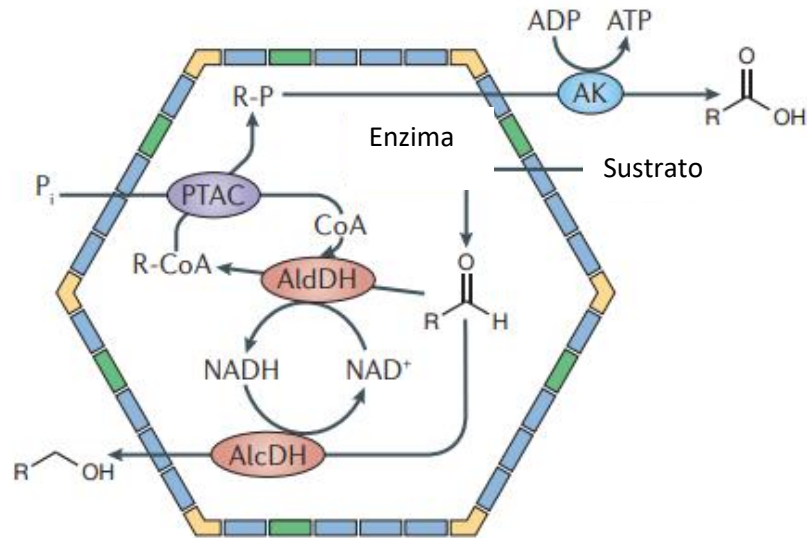
(Losick, 2020)

#### 2. Microcompartimiento microbiano

Los micro compartimientos bacterianos (BMCs por sus siglas en inglés) son organelos auto ensamblables que consisten en un núcleo enzimático que está encapsulado por una proteína permeable selectiva. Esta capa protege a la célula bacteriana de intermediarios metabólicos tóxicos y previene reacciones no esperadas. BMCs catabólicos, conocidos como metabolosomas, han sido identificados en diferentes géneros bacterianos. Están involucrados

en el metabolismo de varios compuestos orgánicos como etanolamina o polihidroxicanoatos. Estos son expresados únicamente cuando hay una carencia de sustrato, por lo que les da una ventaja metabólica para poder sobrevivir (Kerfeld, Aussignarques, & Zarzycki, 2018).

**Figura 2.** Ejemplo de un metabolosoma.

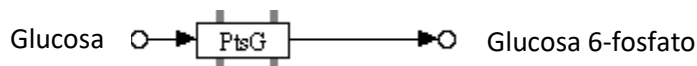


(Kerfeld, Aussignarques, & Zarzycki, 2018)

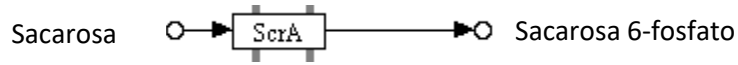
### 3. Fuentes de carbono

La glucosa ingresa a *Bacillus subtilis* por el sistema fosfoenolpiruvato: glucosa fosfotransferasa (glucosa PTS). Dos genes, *orfG* y *ptsX*, han sido relacionados en esta parte específica de este sistema, codificando a Enzima II y Enzima III. La primera enzima transfiere el grupo fosforilo a la histidina de la proteína fosfotransportadora (HPr). El HPr fosforilado dona su residuo fosforilo a Enzimas II, que son carbohidrato específicas. Para ciertos carbohidratos existe un tercer intermediario citoplasmático llamada Enzima III. Cada EII o el par EII-EIII transfiere su grupo fosforilo a un carbohidrato específico. En *Bacillus subtilis* por lo menos cinco carbohidratos son translocados por el mecanismo PTS como por ejemplo glucosa, manosa, fructosa, sacarosa y manitol (Gonzy, de Waard, Zagorec, & Postma, 1991).

**Figura 3.** Ingreso de la glucosa a la célula por mecanismo PTS.

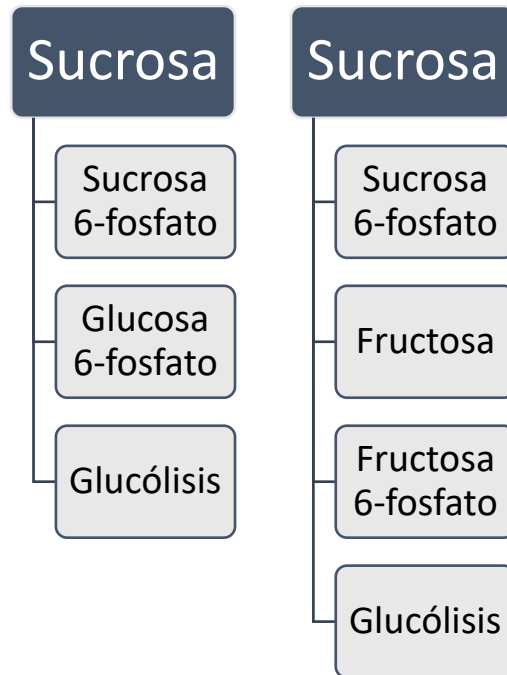


**Figura 4.** Ingreso de la sacarosa a la célula por mecanismo PTS.



A diferencia, de la glucosa 6-fosfato, la sacarosa 6-fosfato no se puede incorporar directamente a glucolisis, ver Figuras 3 y 4. Esta molécula es hidrolizada mediante la enzima sacarosa 6-fosfato hidrolasa para obtener los productos glucosa 6-fosfato y fructosa. A la fructosa se le incorpora un grupo fosfato desde el ATP, resultado en fructosa 6-fosfato (Verhaeghe, Aerts, Diricks, Soetaert, & Desmet, 2014).

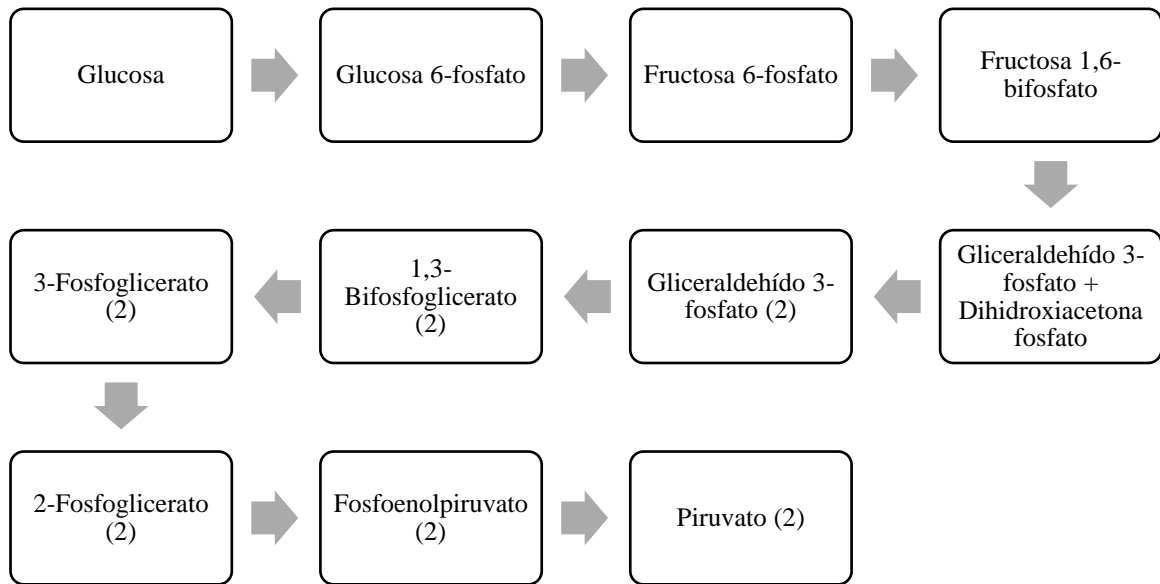
**Figura 5.** Incorporación de la molécula sacarosa-6-fosfato a glucolisis.



(Verhaeghe, Aerts, Diricks, Soetaert, & Desmet, 2014)

Tanto la glucosa 6-fosfato como la fructosa 6-fosfato, son moléculas utilizadas para la producción de piruvato en la ruta metabólica glucolisis. En esta ruta están involucradas 10 enzimas y se produce un total de 2 ATP netos.

**Figura 6.** Ruta metabólica glucolisis.



(The medical biochemistry page, 2021).

El piruvato obtenido de glucolisis es convertido a acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa. Esta molécula final es una molécula clave en el metabolismo ya que interviene en un gran número de reacciones. Puede ser destinada a gluconeogénesis, biosíntesis de ácidos grasos, de aminoácidos o beta oxidación entre otros

**Figura 7.** Producción de acetil-CoA mediado por el complejo piruvato deshidrogenasa.



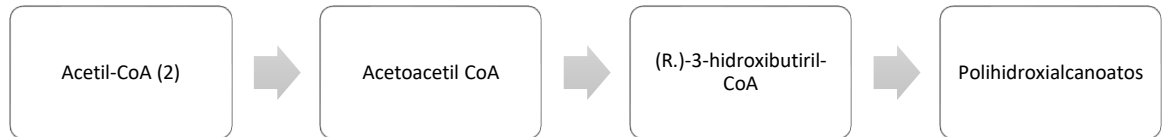
(The medical biochemistry page, 2021)

#### 4. Rutas metabólicas producción de PHA

Diferentes rutas metabólicas de PHA están asociadas de manera directa o indirecta con rutas metabólicas centrales como glucolisis, ruta pentosas fosfato, ciclo de Krebs, biosíntesis y degradación de aminoácidos y ácidos grasos. Acetil-CoA es el precursor de la biosíntesis de varios tipos de PHA. La ruta metabólica más representativa esta catalizada por tres enzimas: acetil-CoA acetiltransferasa (PhaA), acetoacetil-CoA reductasa (PhaB), y PHA

sintasa. PhaA cataliza la condensación de dos moléculas acetyl-CoA en acetoacetyl-CoA, la cual es convertida en (R.)-3-hydroxybutyryl-CoA por PhaB. Finalmente, PhaC polimeriza la molécula en una cadena creciente de PHA (Hye-Young, Hyeoncheol, So Young, & Sang Yup, 2018).

**Figura 8.** Ruta metabólica de la síntesis de PHA a partir de Acetyl-CoA.



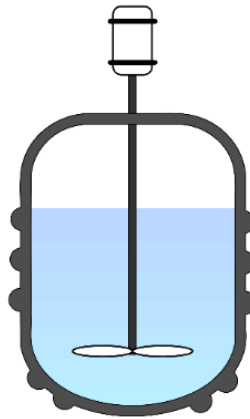
*(Hye-Young, Hyeoncheol, So Young, & Sang Yup, 2018)*

## 5. Reactores

Un reactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra sustancias químicas u organismos. Por lo general, son cilíndricos, de acero inoxidable y varían en tamaño. Este busca mantener condiciones ambientales propicias como pH, temperatura, presión, concentración de oxígeno, etc. Según su flujo de operación de entrada y salida, se pueden clasificar en: discontinuo, semicontinuo o continuo (Levenspiel, 1999).

En el reactor tipo discontinuo, los reactivos se cargan al recipiente, se mezclan y se dejan reaccionar por un tiempo conocido. No existe un flujo de entrada o de salida continuo. Esto produce una operación inestable donde la composición cambia con el tiempo. Sin embargo, en cualquier instante la composición a lo largo del reactor es uniforme (Levenspiel, 1999).

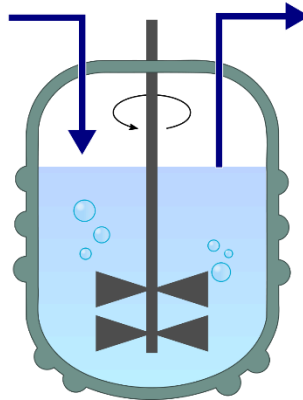
**Figura 9.** Reactor discontinuo.



*(Levenspiel, 1999)*

Por otra parte, en el reactor continuo existen flujos de entrada y salida permanentes. Consiste en un tanque agitado con un mecanismo de agitación que garantiza que toda la mezcla sea uniforme. Por lo tanto, el flujo de salida del reactor va a tener la misma composición que el fluido de adentro. En la industria biotecnológica se emplea para retirar nutrientes sobrantes y metabolitos secundarios constantemente (Levenspiel, 1999).

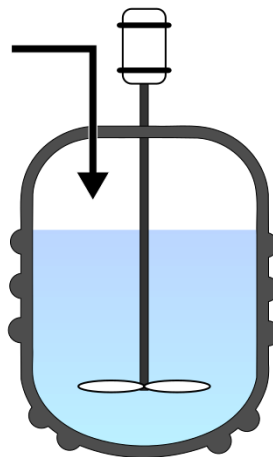
**Figura 10.** Reactor continuo.



(Levenspiel, 1999)

Finalmente, en un reactor semicontinuo se agregan reactivos durante la reacción mientras que los productos permanecen en el recipiente hasta que acabe la experimentación. Generalmente, si se desea controlar la expresión de un metabolito determinado es mejor utilizar este tipo de reactor para controlar la cantidad de nutrientes (Levenspiel, 1999).

**Figura 11.** Reactor semicontinuo.



(Levenspiel, 1999)

El BIOSTAT Aplus es un reactor adecuado para tareas de desarrollo y formación de células. Puede ser empleado para expresión a pequeña escala de proteínas, transmisión de matraces de vibración o cultivo de bacterias, levaduras, hongos, células de animales y plantas. Posee un control automático de pH, pO<sub>2</sub>, mezcla de gas y espuma; por lo que ofrece varias ventajas para mantener controladas las condiciones de fermentación. Para mantener el medio homogéneo, cuenta con un agitador de paletas, al cual se le puede variar la velocidad de agitación para fomentar el intercambio de oxígeno en el medio. También cuenta con una chaqueta térmica para elevar la temperatura y un termómetro para controlar la temperatura. Tiene una capacidad de 1 litro, 2 litros y de 5 litros (dependiendo del envase empleado) (SARTORIUS AG, 2022).

**Figura 12.** Fermentador BIOSTAT Aplus.



(SARTORIUS AG, 2022)

El fermentador BioFlo 415 es un reactor con agitación para procesos de fermentación de bacterias anaeróbicas y aeróbicas, levaduras y hongos. Puede ser utilizado para procesos de lotes y semi lote. Además, el volumen de trabajo de este es de 2 a 15.5 litros. El recipiente es de acero inoxidable y cuenta con diferentes controles como de temperatura, agitación, aeración, pH, DO, pO<sub>2</sub> y de nivel. Se puede agitar en un rango de 50 a 1000 rpm y se puede operar a un rango de 2 a 14 pH (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, 2008).

**Figura 13.** Fermentador BioFlo 415.



(NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, 2008)

## **B. POLÍMEROS**

### **1. Características**

Los polímeros son moléculas de tamaño significativo, constituidas por moléculas orgánicas denominadas monómeros, unidos mediante enlaces covalentes. Las moléculas están formadas por átomos de carbono y algunos poseen grupos laterales o radicales con uno o más átomos. Estas moléculas orgánicas son las que constituyen los tejidos de los seres vivos y los materiales plásticos que conocemos.

Los polímeros sintéticos se producen mediante un proceso denominado polimerización. En este proceso se produce la reacción de miles de monómeros que pasan a formar parte de una larga cadena macromolecular. Existen dos tipos de polimerización: de adición y de condensación (Hermida, 2011).

Hay diferentes maneras de clasificar a los polímeros. Se puede subdividir según su origen, la estructura de las macromoléculas o según su uso, como se observa a continuación:

A. Naturales: Son sustancias producidas por organismos vivos. Ejemplos de estos polímeros son: caucho natural, polisacáridos, o polihidroxicanoatos (Hermida, 2011).

B. Sintéticos: Son moléculas creados por el hombre y se dividen en dos categorías según su comportamiento al ser calentados: termoplásticos y termorrígidos. Los primeros son solubles en disolventes adecuados y al calentarse se ablandan o funden. Están formados por moléculas de cadenas largas. Por el contrario, los termorrígidos se descomponen al ser calentados y no pueden solubilizarse (Hermida, 2011).

## 2. Usos y medio ambiente

Entre los beneficios de los plásticos se puede destacar que son materiales livianos, con variadas propiedades mecánicas, no son frágiles y se los puede moldear en piezas complejas con buena terminación mediante procesos industriales que no requieren temperaturas altas. Uno de los mayores puntos en contra es que estos materiales son derivados de los hidrocarburos. Estos son recursos naturales no renovables, y además no son biodegradables. Permanecen en los suelos o el agua generando contaminación blanca. Las buenas propiedades de los plásticos condicionan la posibilidad de reemplazarlos por otros materiales. Por ejemplo, las bolsas que cotidianamente empleamos para llevar los productos que compramos en los supermercados. Por mes se producen 600 millones de bolsas solo para este fin (Hermida, 2011).

## 3. Bioplásticos

Un bioplástico es un plástico de origen natural producido por un organismo vivo, con carácter biodegradable y sintetizado a partir de fuentes de energía renovables. La ISO define la biodegradación como la degradación en pequeñas moléculas que formen parte del ciclo de la vida por acción de microorganismos (bacterias, algas y hongos). Entre los bioplásticos se hallan los polihidroxialcanoatos (PHAs) cuyo descubrimiento se remonta a 1926 (Hermida, 2011).

Estos son bioplásticos producidos por microorganismos mediante fermentaciones a partir de fuentes naturales como la glucosa o sacarosa. También se puede producir a partir de desechos de la industria alimenticia como mosto de olivo, melaza de caña de azúcar, etc. Si durante su crecimiento la bacteria detecta falta o reducción de algún nutriente como nitrógeno, fósforo, magnesio, sodio o fósforo entonces acumula PHAs en forma de gránulos en el citoplasma, lo que representa para el microorganismo una reserva de carbono para poder sobrevivir. Hay más de 250 microorganismos diferentes capaces de sintetizar PHAs, pero solo algunos de ellos producen PHAs de cadena larga, los cuales son los empleados en la industria (Hermida, 2011).

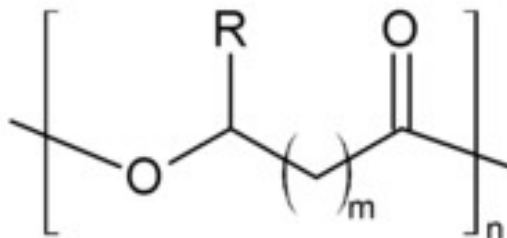
Dependiendo de la longitud de la cadena lateral, tres tipos de PHAs se pueden diferenciar:

- A. Si R contiene de 1-2 átomos de carbono se llaman PHAs de cadena lateral corta, denominados scl-PHA (short chain length-PHA)
- B. Si R contiene de 3-13 átomos de carbono se llaman PHAs de cadena lateral media, denominados mcl-PHA (medium chain length-PHA)

- C. Si R comprende más de 14 átomos de carbono se llaman PHAs de cadena lateral larga, denominados lcl-PHA (long chain length-PHA)

(Hermida, 2011)

**Figura 14.** Estructura de PHAs.

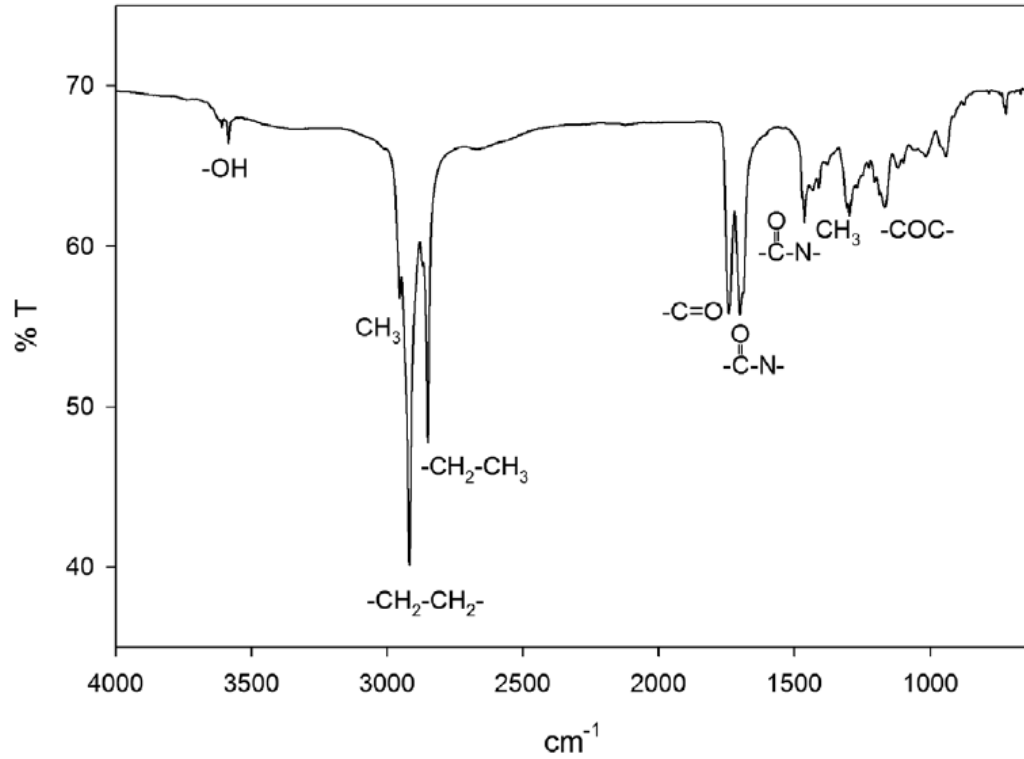


(Hermida, 2011)

Las aplicaciones de los poliésteres biodegradables desarrolladas han dado lugar a varios productos de importancia comercial tanto en la industria como en el área médica. Entre las aplicaciones industriales se destacan los envases biodegradables, fertilizantes, recubrimiento de semillas para administración controlada de herbicidas, insecticidas, fungicidas y compuestos biodegradables reforzados con fibras naturales (Hermida, 2011). Los materiales a base de PHA son degradables a comparación de los plásticos fabricados a partir de petróleo. Los microorganismos del suelo pueden degradar PHAs en condiciones aeróbicas y anaeróbicas; los emplean como fuente de carbono y energía. Bajo condiciones aeróbicas, son convertidos en agua y dióxido de carbono. Bajo condiciones anaeróbicas se obtienen los productos agua y metano. Las enzimas depolimerasas catalizan la reacción química que rompe la larga cadena de PHAs en pequeños oligómeros. Algunos microorganismos producen más hidrolasas, las cuales rompen los oligómeros en monómeros (Suchitra, 2016).

Para identificar el PHA se puede realizar un análisis de FT-IR. La molécula tiene un pico de absorción del carbonilo en  $1728\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de infrarrojo como se observa en la figura 10. El PHA es extraído de células secas con cloroformo y su contenido es determinado por la banda de carbonilo. Otros métodos para identificar el PHA son: HPLC, GC-MS, espectroscopía NMR, citometría de flujo o espectroscopia de fluorescencia (Suchitra, 2016).

**Figura 15.** Molécula característica de PHA analizada por el método de FT-IR.

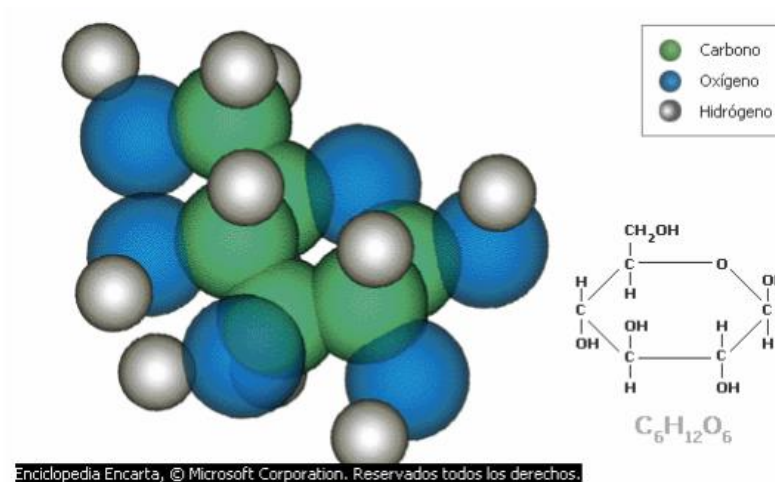


## C. AZÚCAR

### 1. Sacarosa

La sacarosa es un carbohidrato disacárido, compuesto de la síntesis de dos hexosas: D-glucosa y D-fructosa, siendo su fórmula empírica C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> su peso molecular de 342.296 g/mol. Y su estructura molecular es la siguiente:

**Figura 16.** Estructura molecular del azúcar.



Enciclopedia Encarta, © Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.

Las características químicas de la sacarosa:

- a) No forma anómeros
- b) Los ácidos minerales fuertes pueden provocar la descomposición a otros compuestos, por la eliminación de agua.
- c) No reduce el reactivo de Tollens ni el de Fehling
- d) No presenta mutarrotación en solución
- e) No contiene un grupo aldehído o cetona libre
- f) Sufre hidrólisis si se somete a la acción de invertasa o a ácidos diluidos.
- g) Exhibe un comportamiento ligeramente ácido en soluciones no neutras.
- h) La presencia de álcalis y calor descompone la sacarosa produciendo ácido láctico y posteriormente otros productos.

(Capuñay, Franco, Sánchez, & Gamboa, 2017)

## **2. Industria Azucarera en Guatemala**

La caña de azúcar se origina en el sureste de Asia y el registro más antiguo que existe data de 1000 años antes de Cristo, en la India. El azúcar empezó a cobrar importancia hasta que los indios descubrieron técnicas para transformar el jugo de la caña de azúcar en cristales granulados, los cuales eran más fáciles de almacenar y transportar. En Guatemala, se cultivó caña de azúcar desde el siglo XVI de forma artesanal. En 1587 existían varios trapiches en el Valle de Guatemala (ASAZGUA, 2020).

El primer ingenio fue fundado en el año 1591. Durante siglos se cultivó y procesó de manera artesanal la caña. Con el crecimiento e importancia de la Agroindustria, empezaron los intentos de asociarse. El 19 de diciembre de 1937 se conformó el “Consortio Azucarero”, en este tiempo se exportaba el 13% de la producción del edulcorante producido. Fue hasta el 17 de septiembre de 1957 que se creó la Asociación de Azucareros de Guatemala - ASAZGUA-, para fomentar el crecimiento de la Agroindustria Azucarera de Guatemala (ASAZGUA, 2020).

Después de cinco siglos se ha pasado de los modestos trapiches a las mega fábricas llenas de tecnología para la extracción del azúcar. Más de 60 años de trabajo han permitido al sector posicionarse a nivel mundial por su calidad, eficiencia e innovación. Actualmente, Guatemala es el segundo exportador de Latinoamérica, el cuarto exportador de azúcar a nivel mundial, y el tercero con mayor productividad en el mundo. Por último, genera 56 mil empleos de manera directa y 280 mil indirectos; es el segundo producto más exportado del

país y genera divisas que han superado los mil millones de dólares anuales (ASAZGUA, 2020).

### **3. Producción de mieles clarificadas**

La caña es cortada en el campo y luego trasladada al ingenio por medio de camiones con jaulas, los cuales trasladan la caña a granel. También puede ser transportada, atando la caña con cadenas formando paquetes, en plataformas. Toda la caña se lava con agua para eliminar el polvo. Luego es descargada de los camiones hacia las mesas alimentadoras, de manera manual o por medio de descargadores móviles. En las mesas alimentadoras se les vuelve a aplicar agua para dejarla más limpia. En las mesas se dosifica la caña a los conductores de caña. Ahí la caña es preparada para la molienda colocándola en las picadoras, las cuales cortan la caña en pedazos pequeños a través de cuchillas giratorias (Peñalongo, 2004).

Los pedazos de caña son alimentados a un tándem de molinos, donde se extrae el jugo de la caña de azúcar. Se extrae el jugo mediante la compresión de la caña entre los cilindros rotativos llamados mazas encontradas en el molino. El jugo obtenido del primer molino es el que contiene la más alta pureza y la mayor cantidad de sólidos disueltos. El jugo que se extrae en los demás molinos, la pureza disminuye ya que se obtienen otros componentes no deseados como azúcares no cristalizables, ceras, gomas, etc (Peñalongo, 2004).

Seguidamente, el jugo recolectado de la molienda se bombeada para su posterior preparación de cristales de azúcar (Peñalongo, 2004). El jugo procedente de los molinos es de color verde oscuro y ácido. Para su purificación de primero se aplica SO<sub>2</sub> gaseoso, el cual reacciona con los principales colorantes del jugo. Después se neutraliza utilizando una suspensión de cal. Luego, el jugo alcalizado se calienta hasta 105°C, por lo que coagula la albúmina y algunas grasas, ceras y gomas. Se agrega un polímero poli electrolítico para formar un precipitado que atrapa los sólidos en suspensión. Finalmente sale un jugo claro de forma cristalina, sin partículas sólidas (Peñalongo, 2004).

El jugo clarificado tiene una composición similar a la del jugo crudo extraído, a excepción que ya no posee las impurezas extraídas en la clarificación por el tratamiento con cal, y contiene alrededor del 85% de agua. El agua se evapora para obtener un jarabe que lleva una concentración aproximada de 60 a 65% de sólidos en peso. Del proceso de evaporación se obtienen los siguientes productos: jugo clarificado; vapor vegetal, y vapor de escape (Peñalongo, 2004).

#### **4. Azúcar comercial como sustrato**

El azúcar comercial es el azúcar producido a partir de la caña de azúcar, luego de los siguientes pasos: molienda, clarificación, evaporación, cristalización, centrifugación, refinado, secado y envasado. Esta se puede utilizar para consumo directo o como materia prima para su uso en los sectores industriales como el de alimentos y farmacéuticos. En Guatemala se emplea azúcar, jugo de caña, biomasa de la caña y mieles clarificadas para la producción de etanol, el cual es un poderoso biocombustible. Las emisiones a la atmósfera del etanol son menores que las de los combustibles de petróleo. El etanol es el biocombustible más ampliamente utilizado en Estados Unidos (Hernández, 2015).

Con la producción de edulcorantes a nivel mundial, la industria azucarera se ha visto afectada. Por lo que para aprovechar el azúcar producido se emplea como sustrato para la producción de biocombustibles o bioplásticos. Su precio en el mercado es de aproximadamente GTQ 4.40 la libra de azúcar comercial, lo cual es una fuente de carbono barata para fermentaciones (Gamarro, 2021).

#### **D. MODELO CINÉTICO**

Los modelos matemáticos son hipótesis existentes entre las relaciones matemáticas de las variables medibles y no medibles de un sistema, procesos o experimentación. Para el estudio de los procesos de fermentación los modelos para poder correlacionar datos experimentales y poder tener una visión más acertada acerca del proceso. Esto nos permite hacer una predicción cuantitativa del proceso, reducir costos del proceso experimental. Para el desarrollo de un modelo matemático se realizan suposiciones como por ejemplo que la estructura celular interna es la misma para todas las bacterias y no se toma en cuenta el estado de estas. Actualmente la microbiología predictiva es un campo de estudio de gran interés. Por medio de esta, es posible predecir, optimizar, describir, evaluar y desarrollar procesos biológicos sin la necesidad de realizar experimentación y gastar en reactivos y cristalería. Para ello, son necesarias correlaciones y parámetros que puedan asociarse a los procesos; es donde los modelos cinéticos de crecimiento juegan un papel fundamental en las investigaciones (Calderón, 2017).

## 1. Modelo de Monod

El modelo fue desarrollado en 1942, que describe una relación entre el crecimiento microbiano y el sustrato que limita el crecimiento sin ningún tipo de proceso de inhibición durante la fermentación. Este modelo toma solamente en consideración las fases positivas de crecimiento y se asume la población microbiana como homogénea. Este modelo en general se caracteriza por alcanzar un grado de ajuste cercano a los datos experimentales, a pesar de ser un modelo sencillo. El parámetro  $\mu$  es la velocidad de crecimiento celular y es la relación de crecimiento de la célula en función de los nutrientes del medio (Calderón, 2017). Esta variable la podemos obtener por medio de la ecuación de Monod:

**Ecuación 1.** Ecuación de Monod.

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

Donde:

$\mu_{max}$  = *tasa de crecimiento específica máxima de los microorganismos*

$C_s$  = *Concentración de nitrógeno*

$K_s$  = *Constante de afinidad*

**Ecuación 2.** Ecuación de Monod para el consumo de sustrato.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} * \frac{dX}{dt}$$

Donde:

$\frac{dS}{dt}$  = *Cambio de sustrato con el tiempo*

$\frac{dX}{dt}$  = *Cambio de biomasa con el tiempo*

$Y_{xs}$  = *Factor de rendimiento biomasa contra consumo de nitrógeno*

**Ecuación 3.** Cálculo coeficiente de rendimiento global  $Y_{p/x}$ .

$$Y_{p/x} = \frac{Cp_f - Cp_i}{Cx_f - Cx_i}$$

Donde:

$Y_{p/x}$  = rendimiento de formación de polihidroxicanoatos contra crecimiento bacteriano.

$Cp_f$  = Concentración final polihidroxicanoatos

$Cp_i$  = Concentración inicial polihidroxicanoatos

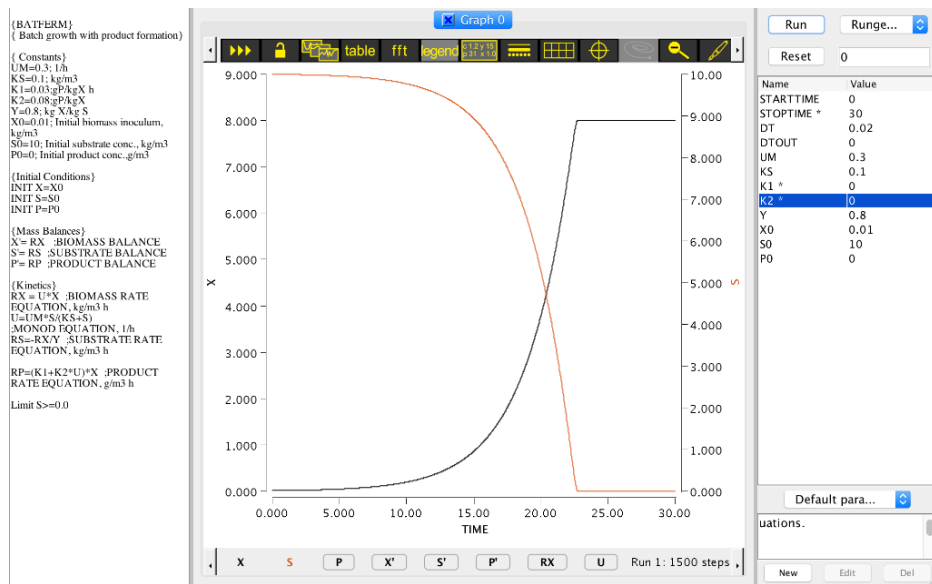
$Cx_f$  = Concentración final de biomasa

$Cx_i$  = Concentración inicial de biomasa

**2. Berkeley Madonna**

Es un programa rápido para resolver ecuaciones diferenciales. Su interfase gráfica provee una plataforma para construir complejos modelos matemáticos de manera intuitiva. El software provee varias herramientas gráficas para presentar los resultados. El usuario puede crear sliders para evaluar la influencia de los diferentes parámetros. Estos se pueden extraer de manera fácil de los valores experimentales mediante la interfase de ajuste de curva (Berkeley Madonna, 2021).

**Figura 17.** Ejemplo de la interfase de Berkeley Madonna.



(Berkeley Madonna, 2021)

## **E. ANÁLISIS QUÍMICO Y MICROBIANO**

### **1. HPLC**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) se utiliza en química analítica y en bioquímica para separar componentes de una mezcla. Esta consiste en una fase móvil y de una fase estacionaria no polar (columna). La solución se inyecta en la fase móvil, donde los componentes se trasladan de acuerdo con las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. A diferencia de la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra.

Campos de aplicación de HPLC:

- a. Fármacos
- b. Bioquímica
- c. Productos de alimentación
- d. Productos de la industria química
- e. Contaminantes
- f. Química forense
- g. Medicina clínica

(Universidad Nacional Autónoma de México, 2021)

### **2. COLORÍMETRO**

Un colorímetro es cualquier herramienta que identifica el espacio de color y el matiz para medir el color de manera objetiva, basado en el paso de luz a través de filtros que simulan la sensibilidad del ojo humano ante la luz. Es un instrumento que mide la absorbancia de una solución en una específica frecuencia de luz determinada. Relaciona la absorbancia con una concentración de soluto conocido (Hach, 2021).

Diferentes sustancias químicas absorben frecuencias de luz reflejada. Los colorímetros se basan en el principio de que la absorbancia de una sustancia es proporcional a su concentración. Es por eso que para maximizar la precisión de la lectura se usa un filtro en el colorímetro para elegir el color de la fuente de luz que más absorberá el soluto (Hach, 2021).

### **3. FT-IR**

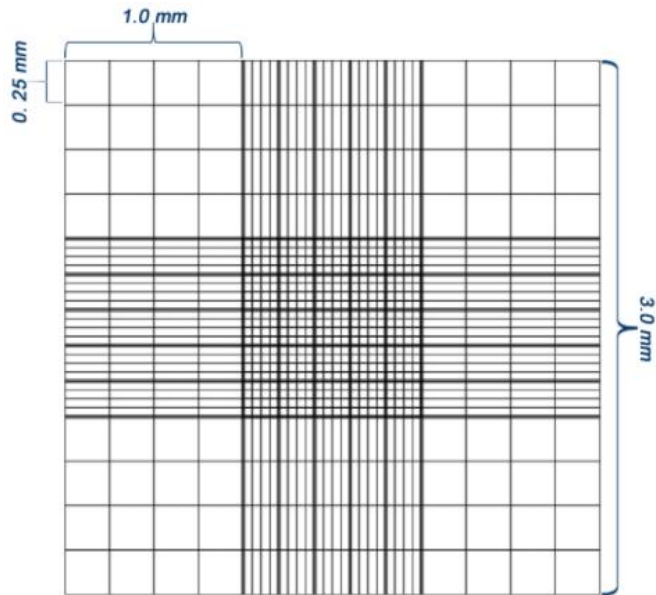
FT-IR significa transformación infrarroja de Fourier, el método más empleado de espectroscopia infrarroja. Cuando la radiación IR pasa a través de una muestra, parte de la radiación es absorbida por la muestra y otra parte pasa a través. El espectro de luz absorbida representa una “huella” de la estructura molecular de la muestra. Cada tipo de molécula produce una diferente huella espectral lo que permite que sea identificada (Thermo Fisher Scientific , 2021).

El FT-IR utiliza la interferometría para codificar información sobre un material desconocido ubicado en el haz de infrarrojos. La Transformación de Fourier decodifica la señal, lo que da lugar a espectros. Los analistas pueden interpretar estos espectros para identificar o cuantificar el material. Los patrones en los espectros ayudan a identificar la muestra, ya que las estructuras específicas en las moléculas muestran huellas IR específicas (Thermo Fisher Scientific , 2021).

### **4. CONTEO CAMARA NEUBAUER**

La cámara de recuento, Neubauer, es un dispositivo de precisión hecho de vidrio óptico especial. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. Las cámaras de recuento se utilizan principalmente para el análisis de sangre y para contar bacterias, espermatozoides y esporas de hongo. La cámara de Neubauer es un grueso portaobjetos de cristal, dividido en tres secciones, la sección media a su vez cuenta con un rayado fino formando una cuadrícula de 3 mm \* 3 mm identificable en el microscopio. Esta sección está exactamente 0.1 mm más abajo que las secciones laterales, estableciendo un volumen fijo una vez colocado el cubreobjetos especial. A observar al microscopio la sección central, podremos identificar un cuadrado de tres por tres, que en conjunto mide 9 mm<sup>2</sup> (CETA, 2018).

**Figura 18.** Cámara de Neubauer.



(CETA, 2018)

Para hacer el recuento hemos tenido que concentrar la muestra inicial hemos de tener en cuenta el factor de concentración-dilución:

**Ecuación 4.** Suspensión celular inicial.

$$\frac{UFC}{mL} = N * 10^4 \frac{UFC}{mL} * f$$

Donde:

*UFC = Unidades formadoras de colonia*

*N = Número de células promedio*

*f = Factor de dilución*

## V. ANTECEDENTES

En el laboratorio del departamento de biotecnología e ingeniería médica del Instituto de Tecnología de la India, se propuso un modelo cinético para explicar la producción de polihidroxicanoatos a partir de una fermentación microbiana de *Bacillus subtilis*. Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de glucosa (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 g/L) como fuente de carbono y se utilizó 5 g/L de extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Esta experimentación fue realizada en Erlenmeyers por 24 horas. Para el análisis de modelo cinético se realizó en el biorreactor BIOSTAT B plus utilizando medio LB y 10 g/L de glucosa (Panda, Balabantaray, Kumar, & Patra, 2017).

Se plantearon las siguientes ecuaciones cinéticas para explicar el comportamiento de producción de biomasa y PHA y el consumo de sustrato. Utilizaron el programa Rosenbrock para obtener los valores de los 7 parámetros establecidos.

**Ecuación 5.** Ecuación cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.

$$\mu = \left(\frac{1}{x}\right) * \left(\frac{dx}{dt}\right) = \mu_m * \left(\frac{S}{S + K_s}\right) * \left(\frac{K_I}{K_I + S}\right)$$

Donde:

$\mu$  = velocidad de crecimiento

$\mu_m$  = velocidad de crecimiento máxima

$x$  = biomasa

$S$  = sustrato (glucosa)

$K_s$  = Constante de saturación de sustrato

**Ecuación 6.** Ecuación cinética de consumo de glucosa en función del tiempo para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.

$$q_s = \left(\frac{1}{x}\right) * \frac{dS}{dt} = -\left(\left(\frac{1}{Y}\right) * \mu + m\right)$$

Donde:

$\mu$  = velocidad de crecimiento

$q_s$  = velocidad específica de consumo de sustrato

$x$  = biomasa

$S$  = sustrato (glucosa)

$Y = \text{rendimiento de biomasa}$   
 $m = \text{coeficiente de mantenimiento}$

**Ecuación 7.** Ecuación cinética de la formación de polihidroxialcanoatos empleando *Bacillus subtilis*

$$q_p = \left(\frac{1}{x}\right) * \frac{dp}{dt} = \mu * k_1 + k_2$$

Donde:

$\mu = \text{velocidad de crecimiento}$   
 $q_p = \text{velocidad específica de formación de producto}$   
 $x = \text{biomasa}$   
 $P = \text{producto}$   
 $k_1 = \text{producción de PHA asociada a crecimiento}$   
 $k_2 = \text{producción de PHA no asociada a crecimiento}$

Se obtuvo una concentración de 5.25 g/L de biomasa utilizando 60 g/L de glucosa en el medio. A partir de 80 g/L de glucosa existía una inhibición en el crecimiento del microorganismo. Se obtuvo un rendimiento de producción de producto contra crecimiento bacteriano de 0.29 (m/m) (Panda, Balabantaray, Kumar, & Patra, 2017). Obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos;

**Cuadro 1.** Constantes de cinética para la producción de polihidroxialcanoatos empleando *Bacillus subtilis* obtenidos de Berkeley Madonna

Coeficiente	Valor	Dimensional
$\mu_{max}$	0.325	$h^{-1}$
$K_s$	10.53	g/L
$Y$	0.183	g/g
$K_I$	105	g/L
$m$	0.12	g/(g*h)
$k_1$	0.36	g/g
$k_2$	0.12	g/(g*h)

(Panda, Balabantaray, Kumar, & Patra, 2017)

## **VI. METODOLOGÍA**

Los datos de placa de los equipos y la información de los reactivos se encuentran en el apartado de anexos.

### **A. INVERSIÓN DE SACAROSA**

Materiales y equipo

- Erlenmeyer 1 L
- Beaker 50 mL
- 2 Pipetas graduada de 10 mL
- Probeta 1 L
- Pipeteador
- Varilla de vidrio
- Agitador magnético
- Potenciómetro
- Estufa
- Termómetro de mercurio
- Cronómetro
- Papel aluminio
- Papel encerado
- Espátula analítica
- Balanza
- Balanza analítica
- Campana de extracción
- Guantes de calor
- Ácido sulfúrico
- Hidróxido de sodio
- Agua destilada
- Azúcar
- Tubo de ensayo

## Procedimiento

1. Pesar 10 g de azúcar utilizando papel encerado sobre una balanza.
2. Introducir en Erlenmeyer de 1 L el azúcar pesado.
3. Medir 1 L de agua destilada utilizando la probeta y agregarlo al Erlenmeyer.
4. Introducir agitador magnético, colocar sobre la estufa y calentar a 60 °C y agitar a 250 rpm hasta que se disuelva el azúcar.
5. Trasladar el Erlenmeyer a la campana de extracción, encender la extracción de gases y colocar sobre la estufa.
6. Encender la agitación a 250 rpm y la temperatura a 80°C.
7. Agregar poco a poco ácido sulfúrico utilizando la pipeta graduada de 10 mL y medir el pH utilizando un potenciómetro hasta alcanzar un pH de 1.
8. Tapar con aluminio la entrada y dejar calentar por 1 hora, manteniendo las condiciones de temperatura y agitación.
9. Alcanzar temperatura ambiente y neutralizar con hidróxido de sodio, pesado en balanza analítica, hasta alcanzar un pH de 7.
10. Guardar 2 mL de solución en un tubo de ensayo para análisis de HPLC.
11. Repetir el procedimiento utilizando 15 y 20 g de azúcar.

## **B. PREPARACIÓN CAJA PETRI E INÓCULO INICIAL**

### Materiales y equipo

- Caja Petri con *Bacillus subtilis*
- Caja Petri
- Tijeras
- Parafilm
- Mechero
- Encendedor
- Cloro
- Etanol al 70% v/v
- Aza
- Incubadora
- Erlenmeyer de 250 mL
- Papel encerado
- Papel aluminio

- Cinta testigo
- Espátula analítica
- Agar nutritivo
- Caldo nutritivo
- Autoclave
- Guantes de calor
- Planta de asbesto
- Shaker
- Probeta de 100 mL
- Agitador magnético

#### Procedimiento

1. Limpiar la superficie de la mesa con cloro y luego con etanol.
2. Encender los mecheros y esterilizar el aza.
3. Abrir caja Petri con cultivo y tomar una azada.
4. Distribuir uniformemente el cultivo en la caja Petri e invertir al terminar.
5. Tapar caja Petri con Parafilm y dejar en incubadora a 37°C por un día.
6. Pesar 8 g/L de caldo nutritivo para preparar una solución de 0.1 L utilizando una espátula analítica, papel encerado y una balanza.
7. Introducir lo pesado en un Erlenmeyer de 250 mL, agregar 100 mL de agua destilada y el agitador magnético.
8. Colocar el Erlenmeyer sobre una estufa, agitar a 200 rpm y calentar a 60°C hasta disolver.
9. Tapar el Erlenmeyer con papel aluminio, colocar cinta testigo e introducir en la autoclave.
10. Introducir en autoclave, dejar esterilizar por 15 minutos al alcanzar una temperatura de 121°C
11. Retirar el medio con guantes de calor, colocar en plancha de asbesto y dejar enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente.
12. Encender los mecheros y esterilizar el aza.
13. Agregar una colonia de la caja Petri de la incubadora al caldo nutritivo.
14. Cerrar caja Petri y cerrar Erlenmeyer con Parafilm.
15. Introducir el Erlenmeyer en shaker a una temperatura de 37°C y 150 rpm.

## C. PRODUCCIÓN PHA EN ERLENMEYERS

### Materiales y equipo

- 4 Erlenmeyers de 250 mL
- 1 Erlenmeyers de 1L
- Azúcar comercial
- Extracto de levadura
- Cloruro de sodio
- Agua destilada
- Balanza
- Espátula analítica
- Papel encerado
- Agitador magnético
- Estufa
- Autoclave
- Plancha de asbesto
- Guantes de calor
- Inóculo *Bacillus subtilis*
- Mecheros
- Cloro
- Etanol al 70%
- Encendedor
- Parafilm
- Cinta testigo
- Shaker
- 2 tubos de ensayo
- Pipeta graduada de 10 mL
- Bureta de 500 mL
- Bureta de 10 mL
- 1 tubo Eppendorf
- Pipeta de 1 mL
- Punta para 1 mL
- Potenciómetro

## Procedimiento

1. Pesar 10 g/L de azúcar, 5 g/L de cloruro de sodio y 2 g/L para preparar una solución de 0.570 L utilizando la espátula analítica, papel encerado y una balanza.
2. Agregar los reactivos pesados a un Erlenmeyer de 1L, suministrar 0.600 L de agua destilada e introducir un agitador magnético.
3. Colocar el Erlenmeyer sobre una estufa, calentar a 60°C y agitar a 200 rpm hasta disolver los reactivos.
4. Tomar una muestra de 2 mL de la solución y guardar en tubo de ensayo para análisis de HPLC.
5. Tapar con aluminio el Erlenmeyer, poner cinta testigo e introducir en autoclave.
6. Poner a funcionar el equipo, al alcanzar la temperatura de 121°C, dejar funcionar por 15 minutos.
7. Retirar el medio con guantes de calor y colocarlo sobre una plancha de asbesto hasta alcanzar temperatura ambiente.
8. Tapar con aluminio la bureta de 500 mL y la bureta de 10 mL y colocarles cinta testigo.
9. Introducir en autoclave, dejar esterilizar por 15 minutos al alcanzar una temperatura de 121°C.
10. Retirar la cristalería con guantes de calor y colocarlo sobre una plancha de asbesto hasta alcanzar temperatura ambiente.
11. Lavar la superficie con cloro y luego con etanol al 70% v/v.
12. Encender mecheros y aplicar etanol a la cristalería por la parte externa.
13. Medir 190 mL de solución de azúcar preparada e introducir en Erlenmeyers de 250 mL.
14. Tomar un 1 mL de muestra del inóculo inicial utilizando la pipeta para conteo con Cámara de Neubauer.
15. Medir 10 mL de inóculo inicial y agregar a la solución de azúcar.
16. Medir el pH inicial con un potenciómetro.
17. Cerrar los tres Erlenmeyers y colocarlos en shaker a una temperatura de 37°C y 150 rpm por 48 horas.
18. Al terminar, tomar una muestra de 2 mL para análisis de HPLC y medir pH.
19. Proseguir con extracción y purificación de PHA.
20. Repetir procedimiento anterior utilizando 15 y 20 gramos de azúcar. Para azúcares invertidas continuar desde el paso 4.

## D. PRODUCCIÓN PHA EN REACTOR SARTORIUS

### Materiales y equipo

- Reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus
- Computadora
- 1 Erlenmeyer de 1L
- Azúcar comercial
- Extracto de levadura
- Cloruro de sodio
- Hidróxido de sodio
- Agua destilada
- Balanza
- Espátula analítica
- Papel encerado
- Agitador magnético
- Estufa
- Autoclave
- Plancha de asbesto
- Guantes de calor
- Inóculo *Bacillus subtilis*
- Parafilm
- Cinta testigo
- 2 tubos de ensayo
- Pipeta graduada de 10 mL
- Bureta de 100 mL
- 1 tubo eppendorf
- Pipeta de 1 mL
- Punta para 1 mL

## Procedimiento

1. Pesar 10 g de azúcar, 5 g de cloruro de sodio y 2 g utilizando la espátula analítica, papel encerado y una balanza.
2. Agregar los reactivos pesados a un Erlenmeyer de 1 L, suministrar 950 mL de agua destilada e introducir un agitador magnético.
3. Colocar el Erlenmeyer sobre una estufa, calentar a 60°C y agitar a 200 rpm hasta disolver los reactivos.
4. Tomar una muestra de 4 mL de la solución y guardar en tubo de ensayo para análisis HATCH.
5. Tapar con aluminio el Erlenmeyer, poner cinta testigo e introducir en autoclave.
6. Poner a funcionar el equipo, al alcanzar la temperatura de 121°C, dejar funcionar por 15 minutos.
7. Retirar el medio con guantes de calor y colocarlo sobre una plancha de asbesto hasta alcanzar temperatura ambiente.
8. Tapar con aluminio la bureta de 100 mL y colocar cinta testigo.
9. Introducir en autoclave, dejar esterilizar por 15 minutos al alcanzar una temperatura de 121°C.
10. Retirar la cristalería con guantes de calor y colocarlo sobre una plancha de asbesto hasta alcanzar temperatura ambiente.
11. Introducir la solución en reactor Sartorius y ajustar pH con solución de hidróxido de sodio 1.5 M.
12. Calentar solución a 37°C y agitar a 150 rpm.
13. Tomar un 1 mL de muestra del inóculo inicial utilizando la pipeta para conteo con Cámara de Neubauer.
14. Medir 50 mL de inóculo inicial con la bureta y agregar al reactor.
15. Colocar el termómetro, el potenciómetro, el rotor, y la salida de gas del reactor.
16. Apuntar el pH inicial desplegada en la pantalla del reactor en la computadora.
17. Fermentar por 48 horas a 37°C y 150 rpm.
18. Al terminar, tomar una muestra de 4 mL para análisis HATCH y anotar pH final.
19. Proseguir con extracción y purificación de PHA.
20. Repetir procedimiento anterior utilizando 15 y 20 gramos de azúcar. Para azúcares invertidas continuar desde el paso 4.

## **E. PRODUCCIÓN PHA EN REACTOR BIOFLO 415**

### Materiales y equipo

- Reactor BioFlo 415
- 1 Erlenmeyer de 2L
- Azúcar comercial
- Extracto de levadura
- Cloruro de sodio
- Hidróxido de sodio
- Agua destilada
- Balanza
- Espátula analítica
- Papel encerado
- Agitador magnético
- Estufa
- Inóculo *Bacillus subtilis*
- 24 tubos Falcon de 50 mL
- 24 tubos de ensayo
- Pipeta graduada de 10 mL
- Pipeteador
- 1 tubo eppendorf
- Pipeta de 1 mL
- Punta para 1 mL
- 1 cubeta de 20 litros
- 2 envases de 5 litros
- Bureta de 2 Litros

## Procedimiento

1. Pesar 20 g/L de azúcar, 5 g/L de cloruro de sodio y 2 g/L para preparar una solución de 10 L utilizando la espátula analítica, papel encerado y una balanza.
2. Agregar los reactivos pesados a un Erlenmeyer de 2 L, suministrar 2 L de agua destilada e introducir un agitador magnético.
3. Colocar el Erlenmeyer sobre una estufa, calentar a 60°C y agitar a 200 rpm hasta disolver los reactivos.
4. Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 1.5 M e introducir la solución en reactor BioFlo 415.
5. Agregar 7.5 litros de agua tratada al reactor para alcanzar un volumen de 9.5 L.
6. Iniciar protocolo de esterilización del reactor BioFlo.
7. Tomar un 1 mL de muestra del inóculo inicial utilizando la pipeta para conteo con Cámara de Neubauer.
8. Agregar 500 mL de inóculo inicial al reactor.
9. Apuntar el pH inicial desplegada en la pantalla del reactor en la computadora.
10. Fermentar por 48 horas a 37°C y 150 rpm.
11. Tomar muestras cada dos horas utilizando los tubos Falcon de 50 mL.
12. Al terminar, vaciar el reactor y colocar la solución en los envases de 5 L.
13. Proseguir con extracción y purificación de PHA.

## F. PURIFICACIÓN PHA

### Materiales y equipo

- Cloroformo
- Hipoclorito de sodio
- Agua destilada
- Centrifuga de 1 L
- Centrifuga tubos Falcon
- 8 tubos Falcon
- Tubos de ensayo
- Horno
- Vortex
- Beakers
- Shaker

- Jeringa
- Campana de extracción

#### Procedimiento

1. Luego de la fermentación, centrifugar la solución a 4000 rpm por 15 minutos.
2. Tomar 2 mL de sobrenadante y guardar en tubo de ensayo para análisis HATCH o HPLC.
3. Pesar beakers de 50 mL en balanza analítica.
4. Lavar el pellet con agua destilada y colocar solución en beaker.
5. Introducir en horno a 60°C por tres días.
6. Determinar el peso seco, agregar por cada gramo de biomasa, 10 ml de hipoclorito de sodio y 10 ml de cloroformo en campana.
7. Colocar en un agitador por 3 horas a 37°C y 300 rpm.
8. Verter la solución en tubos Falcon de 50 mL en una centrifuga a 5000 rpm y 4°C por 15 minutos.
9. Lavar y secar nuevamente los beakers.
10. Sacar los tubos de la centrifuga; con una jeringa extraer la fase inferior y colocar en el beaker.
11. Evaporar el cloroformo en una campana de extracción y nuevamente secar en el horno hasta llegar a peso seco.
12. Pesar muestra en balanza analítica.
13. Finalmente, llevar la muestra de PHA seca a análisis IR.

## **G. ANÁLISIS HACH NITRÓGENO**

#### Materiales y equipo

- Reactor DRB 200
- Colorímetro
- Reactivo persulfato
- Reactivo hidróxido
- Reactivo A (polvo de bisulfato)
- Reactivo B (polvo indicador)
- Reactivo C (solución ácida)
- Agua destilada

- Micropipeta de 1 mL
- Puntas de micropipeta de 1 mL
- Guantes

#### Procedimiento

1. Hacer diluciones de las muestras 1:10 utilizando agua destilada.
2. Encender el reactor DRB 200 y calentar a 105°C.
3. Agregar el reactivo total de persulfato al reactivo de hidróxido.
4. Añadir 2 mL de muestra y 2 mL de agua para el blanco.
5. Tapar los tubos, agitar vigorosamente y colocar en el reactor por 30 minutos.
6. Luego, en el calorímetro introducir el código 58.
7. Agregar a los tubos el reactivo A, agitar y dejar reaccionar por 3 minutos.
8. Después agregar el reactivo B, agitar y dejar reaccionar por 2 minutos.
9. Trasladar 2 mL de los tubos al tubo con el reactivo C.
10. Invertir 10 veces los tubos y esperar 5 minutos.
11. Introducir en el calorímetro el blanco y seleccionar el botón “zero”.
12. Colocar muestra en el calorímetro y realizar la lectura.

## H. ANÁLISIS HACH CARBONO

#### Materiales y equipo

- Reactor DRB 200
- Colorímetro
- Reactivo de digestión
- Agua destilada
- Micropipeta de 1 mL
- Puntas micropipeta
- Guantes

#### Procedimiento

1. Hacer diluciones de las muestras 1:1000 utilizando agua destilada
2. Encender el reactor DRB 200 y precalentar a 150°C.
3. Al reactivo de digestión agregar 2 mL de la muestra y para el blanco 2 mL de agua destilada.

4. Agitar vigorosamente y calentar los tubos por 2 horas el reactor DRB 200
5. Retirar tubos de ensayo y esperar que alcancen temperatura ambiente.
6. Invertir los tubos varias veces.
7. En el calorímetro Hatch, introducir el código 16.
8. Introducir en el calorímetro el blanco y seleccionar el botón “zero”.
9. Colocar muestra en el calorímetro y realizar la lectura.

## **I. ANÁLISIS HPLC**

### Materiales y equipo

- Filtros  $0.22 \mu_m$
- Filtros  $0.45 \mu_m$
- Diales de cromatografía
- Agua destilada
- Columna Hi-plex H
- Detector de índice de refracción P-1200

### Procedimiento

1. Filtrar las muestras con filtros  $0.22 \mu_m$  hacia los viales de cromatografía.
2. Inyectar  $20 \mu L$  de muestra e introducir en el muestreador
3. Configurar bomba para tener un flujo de  $0.6 \mu L/min$ .
4. Establecer la temperatura de la columna a  $20^\circ C$  al igual que el detector.
5. Establecer la temperatura del inyector a  $30^\circ C$ .
6. Filtrar el agua con filtros  $0.45 \mu_m$  que ingresa a la columna.
7. Configurar archivo para exportar los datos obtenidos del detector del índice de refracción a  $40^\circ C$ .

## **J. ANÁLISIS IR**

### Materiales y equipo

- Toma muestra
- Computadora
- Espectrofotómetro FT-IR

### Procedimiento

1. Colocar muestra en el cristal en el equipo
2. Hacer presión en la muestra
3. Correr el espectro de fondo en la computadora
4. Correr la muestra la en la computadora.

## **K. CONTEO MICROBIANO**

### Materiales y equipo

- Guantes
- Micropipeta de 10  $\mu$ L
- Puntas micropipeta de 10  $\mu$ L
- Cámara de Neubauer
- Cubreobjetos
- Azul de tripano
- Agua destilada
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Vortex
- Microscopio

### Procedimiento

1. Hacer diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 con agua destilada en tubos Eppendorf utilizando la micropipeta.
2. Homogenizar entre cada paso utilizando el vortex.
3. Agregar dos gotas de azul de tripano al tubo Eppendorf con dilución 1:1000 y homogenizar utilizando el vortex.
4. Utilizar guantes y colocar el cubreobjetos sobre cámara de Neubauer.
5. Tomar 20  $\mu$ L de muestra con la micropipeta, e introducirlos en la cámara de Neubauer.
6. Poner la cámara en el microscopio y enfocar utilizando el aumento x10.
7. Contar bacterias en los cuadros de las esquinas y dividir para saber número total de bacterias.

## L. MODELO CINÉTICO

### Equipo

- Computadora
- Programa Berkeley Madonna.Ink
- Excel

### Procedimiento

1. Tabular los resultados obtenidos de nitrógeno y de peso seco de biomasa y de producto en Excel.
2. Guardar el archivo como “Comma Separated Values” (.csv)
3. Iniciar el programa de Berkeley Madonna.
4. Escribir el código base de Monod y cargar los archivos de sustrato, producto y biomasa.
5. Realizar un ajuste múltiple iterando los diferentes parámetros empleados.
6. Ajustar los parámetros utilizando “sliders” y modificar el modelo de Monod si es necesario.

## VII. RESULTADOS

**Cuadro 2.** Rendimientos de la fermentación de dos fuentes de carbono para la producción de polihidroxiclcanoatos empleando *Bacillus subtilis*.

Sistema	Sustrato principal	Concentración		
		inicial sustrato (g/L)	$Y_{x/s}$ % (m/m)	$Y_{p/x}$ % (m/m)
1	Sacarosa*	19.5	9.16	6.55
		$\pm 0.1732$	$\pm 0.184$	$\pm 0.095$
2	Sacarosa*	14.5	12.8	3.36
		$\pm 0.1732$	$\pm 0.389$	$\pm 0.043$
3	Sacarosa	22.5	8.56	9.58
		$\pm 0.1732$	$\pm 0.148$	$\pm 0.298$
4	Sacarosa	14.6	8.31	4.80
		$\pm 0.1732$	$\pm 0.137$	$\pm 0.161$

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en shaker (Ver cuadro 33, en datos de equipo en el apartado de apéndice). El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología. Notación:  $Y_{x/s}$  rendimiento global de formación de biomasa con respecto al consumo de sustrato;  $Y_{p/x}$  rendimiento global de formación de polihidroxiclcanoatos con respecto al crecimiento bacteriano; Sacarosa\*, representa que fue hidrolizada.

**Figura 19.** Balance de masa del sistema 1 del Cuadro 1 para la producción de polihidroxiclcanoatos empleando *Bacillus subtilis*.



Datos obtenidos de acuerdo con los análisis fisicoquímicos y los cálculos mostrados en la sección datos calculados en el apartado de anexos.

**Figura 20.** Balance de masa del sistema 2 del Cuadro 1 para la producción de polihidroxialcanoatos empleando *Bacillus subtilis*.



Datos obtenidos de acuerdo con los análisis fisicoquímicos y los cálculos mostrados en la sección datos calculados en el apartado de anexos.

**Figura 21.** Balance de masa del sistema 3 del Cuadro 1 para la producción de polihidroxialcanoatos empleando *Bacillus subtilis*.



Datos obtenidos de acuerdo con los análisis fisicoquímicos y los cálculos mostrados en la sección datos calculados en el apartado de anexos.

**Figura 22.** Balance de masa del sistema 4 del Cuadro 1 para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.



Datos obtenidos de acuerdo con los análisis fisicoquímicos y los cálculos mostrados en la sección datos calculados en el apartado de anexos.

**Cuadro 3.** Rendimientos de la fermentación para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis* variando la relación de carbono y nitrógeno.

Sistema	Sustrato	Relación	$Y_{x/sc}$	$Y_{x/sn}$	$Y_{p/x}$
		Carbono- Nitrógeno (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	(m/m)
1	Sacarosa*	263 : 1 $\pm 0.1102$	2.09 $\pm 8.7 * 10^{-5}$	542.54 $\pm 4.3 * 10^{-1}$	7.92 $\pm 4.2 * 10^{-3}$
2	Sacarosa*	184 : 1 $\pm 0.0736$	3.01 $\pm 1.3 * 10^{-4}$	459.53 $\pm 3.3 * 10^{-1}$	5.25 $\pm 4.3 * 10^{-3}$
3	Sacarosa*	113 : 1 $\pm 0.0446$	2.33 $\pm 1.6 * 10^{-4}$	311.93 $\pm 2.3 * 10^{-1}$	16.49 $\pm 6.9 * 10^{-3}$
4	Sacarosa	300 : 1 $\pm 0.1304$	2.05 $\pm 6.6 * 10^{-5}$	829.11 $\pm 6.9 * 10^{-1}$	6.50 $\pm 3.2 * 10^{-3}$
5	Sacarosa	179 : 1 $\pm 0.0733$	1.74 $\pm 1.1 * 10^{-4}$	308.03 $\pm 2.1 * 10^{-1}$	10.11 $\pm 6.4 * 10^{-3}$
6	Sacarosa	83 : 1 $\pm 0.0304$	4.82 $\pm 2.5 * 10^{-4}$	367.43 $\pm 2.5 * 10^{-1}$	3.08 $\pm 5.2 * 10^{-3}$

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus. La fuente de nitrógeno fue extracto de levadura y el detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología. La relación carbono-nitrógeno se obtuvo mediante el colorímetro Hach. Notación:  $Y_{x/sc}$  rendimiento global de formación de biomasa contra consumo de carbono;  $Y_{x/sn}$  rendimiento global de formación de biomasa contra consumo de nitrógeno total;  $Y_{p/x}$  rendimiento global de formación de polihidroxicanoatos contra crecimiento bacteriano; Sacarosa\*, representa que fue hidrolizada; m/m, relación másica molecular.

**Figura 23.** Balance de masa del sistema 1 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.



Datos obtenidos de acuerdo con los análisis fisicoquímicos y los cálculos mostrados en la sección datos calculados en el apartado de anexos. Se determinó la concentración de carbono y nitrógeno molecular utilizando el Hach como se describe en el apartado de metodología. Se utilizó 20 gramos de sacarosa invertida como fuente de carbono y 2 gramos de extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Observar Figura 40 del apartado de anexos para observar compartimiento de temperatura, pH y agitación.

**Figura 24.** Balance de masa del sistema 2 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxialcanoatos empleando *Bacillus subtilis*.



Datos obtenidos de acuerdo con los análisis fisicoquímicos y los cálculos mostrados en la sección datos calculados en el apartado de anexos. Se determinó la concentración de carbono y nitrógeno molecular utilizando el Hach como se describe en el apartado de metodología. Se utilizó 15 gramos de sacarosa invertida como fuente de carbono y 2 gramos de extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Observar Figura 41 del apartado de anexos para observar compartimiento de temperatura, pH y agitación.

**Figura 25.** Balance de masa del sistema 3 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxialcanoatos empleando *Bacillus subtilis*.



Datos obtenidos de acuerdo con los análisis fisicoquímicos y los cálculos mostrados en la sección datos calculados en el apartado de anexos. Se determinó la concentración de carbono y nitrógeno molecular utilizando el Hach como se describe en el apartado de metodología. Se utilizó 10 gramos de sacarosa invertida como fuente de carbono y 2 gramos de extracto de levadura como

fuentes de nitrógeno. Observar Figura 42 del apartado de anexos para observar compartimiento de temperatura, pH y agitación.

**Figura 26.** Balance de masa del sistema 4 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.



Datos obtenidos de acuerdo con los análisis fisicoquímicos y los cálculos mostrados en la sección datos calculados en el apartado de anexos. Se determinó la concentración de carbono y nitrógeno molecular utilizando el Hach como se describe en el apartado de metodología. Se utilizó 20 gramos de sacarosa como fuente de carbono y 2 gramos de extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Observar Figura 37 del apartado de anexos para observar compartimiento de temperatura, pH y agitación.

**Figura 27.** Balance de masa del sistema 5 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.



Datos obtenidos de acuerdo con los análisis fisicoquímicos y los cálculos mostrados en la sección datos calculados en el apartado de anexos. Se determinó la concentración de carbono y nitrógeno molecular utilizando el Hach como se describe en el apartado de metodología. Se utilizó 15 gramos de sacarosa como fuente de carbono y 2 gramos de extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Observar Figura 38 del apartado de anexos para observar compartimiento de temperatura, pH y agitación.

**Figura 28.** Balance de masa del sistema 6 del Cuadro 2 para la producción de polihidroxialcanoatos empleando *Bacillus subtilis*.



Datos obtenidos de acuerdo con los análisis fisicoquímicos y los cálculos mostrados en la sección datos calculados en el apartado de anexos. Se determinó la concentración de carbono y nitrógeno molecular utilizando el Hach como se describe en el apartado de metodología. Se utilizó 20 gramos de sacarosa como fuente de carbono y 2 gramos de extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Observar Figura 39 del apartado de anexos para observar compartimiento de temperatura, pH y agitación.

**Ecuación 8.** Ecuación de Monod para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.

$$\mu = \mu_{max} * \frac{C_s - b}{(C_s - b) + K_s}$$

Donde:

$\mu_{max}$  = tasa de crecimiento específica máxima de los microorganismos

$C_s$  = Concentración de nitrógeno

$b$  = Concentración de nitrógeno final

$K_s$  = Constante de afinidad

**Ecuación 9.** Ecuación cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.

$$\frac{dC_n}{dt} = \mu * C_n$$

Donde:

$\mu$  = velocidad de crecimiento

$C_n$  = Concentración de células

**Ecuación 10.** Ecuación cinética de consumo de nitrógeno en función del tiempo para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.

$$\frac{dC_s}{dt} = -\mu * \frac{C_n}{Y_{xs}} + a * (e^{k*TIME})$$

Donde:

$\mu$  = velocidad de crecimiento

$C_n$  = Concentración de células

$Y_{xs}$  = Factor de rendimiento biomasa contra consumo de nitrógeno

$a$  = Constante asociada a consumo de nitrógeno

$k$  = Constante asociada a consumo de nitrógeno

*TIME = Tiempo*

**Ecuación 11.** Ecuación cinética de la formación de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis*.

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

Donde:

$\mu$  = velocidad de crecimiento

$C_n$  = Concentración de células

$Y_{px}$  = Factor de rendimiento polihidroxicanoatos

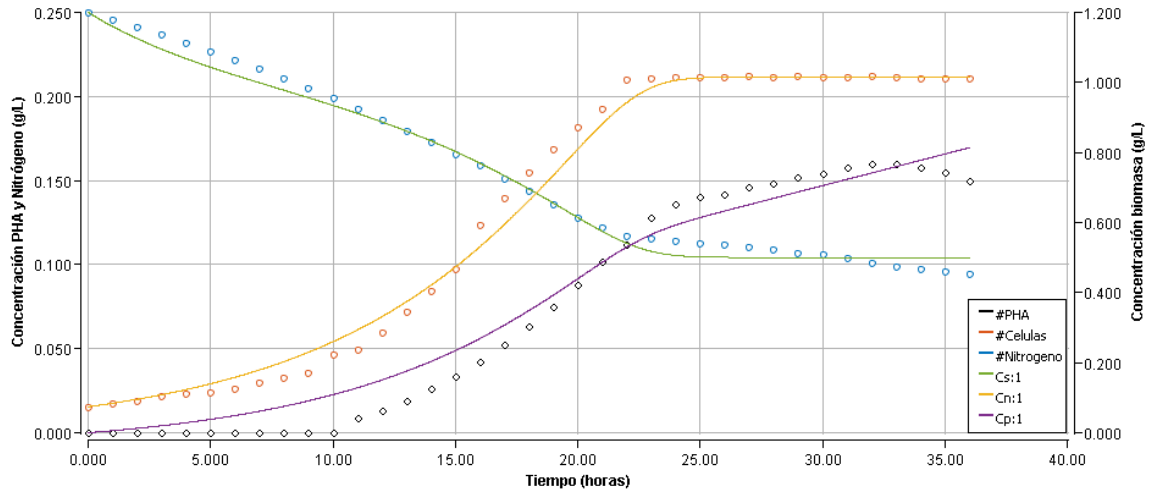
$i$  = Constante asociada a formación de PHAs

**Cuadro 4.** Constantes de cinética para la producción de polihidroxicanoatos empleando *Bacillus subtilis* obtenidos de Berkeley Madonna.

<b>Coefficiente</b>	<b>Valor</b>	<b>Dimensional</b>
$\mu_{max}$	0.13967	$h^{-1}$
$K_s$	0.01256	g/L
$Y_{xs}$	8.84591	m/m
$Y_{px}$	0.09198	m/m
$b$	0.10424	g/L
$e$	2.71828	-
$a$	-0.008	g/(L*h)
$k$	-0.20273	$h^{-1}$
$i$	0.00372	g/(L*h)

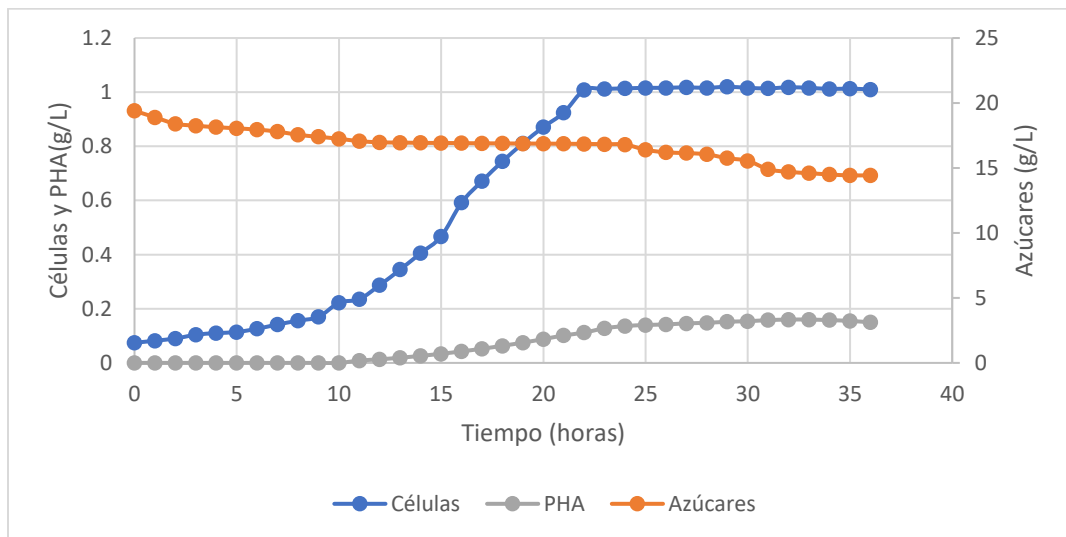
Los resultados obtenidos corresponden a la experimentación realizada en el reactor BioFlo 415.

**Figura 29.** Ajuste de modelo cinético con Berkeley Madonna a los resultados experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de nitrógeno y producción de PHA.



Los resultados obtenidos corresponden a la experimentación realizada en el reactor BioFlo 415. Notación: #PHA, producción de polihidroxialcanoatos en el tiempo experimental; #Celulas, producción de *Bacillus subtilis* en el tiempo experimental; #Nitrogeno, consumo de nitrógeno en el tiempo experimental; Cs:1, ajuste de consumo de nitrógeno; Cn:1, ajuste de producción de *Bacillus subtilis*; Cp:1, ajuste de producción de polihidroxialcanoatos.

**Figura 30.** Resultados experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de azúcares y producción de PHA.



Los resultados obtenidos corresponden a la experimentación realizada en el reactor BioFlo 415. Se operó a una temperatura de 37°C y 150 rpm durante 36 horas.

**Cuadro 5.** Picos de absorbancia característicos de una molécula de PHA obtenidos por análisis FT-IR.

Sistema	Sustrato	Vibración C=O 1725-1705	Absorciones	
			Tensión CH2-CH3 Intervalo ( $cm^{-1}$ ) 2962-2853	Tensión CH2-CH2 2962-2853
1	Sacarosa*	No	Sí	Sí
2	Sacarosa*	Sí	Sí	Sí
3	Sacarosa*	Sí	Sí	Sí
4	Sacarosa	Sí	Sí	Sí
5	Sacarosa	Sí	Sí	Sí
6	Sacarosa	No	Sí	Sí
Fermentación en reactor BioFlo 415	Sacarosa	Sí	Sí	Sí
Estándar 1	N.D.	Sí	Sí	Sí
Estándar 2	N.D.	Sí	Sí	Sí

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus. Los sistemas numerados corresponden a los del Cuadro 3 del área de resultados. Consultar cromatogramas en el apartado de anexos. Notación: Sacarosa\*, representa que fue hidrolizada; sí, representa que si se observó el pico en los cromatogramas; no, representa que no se observó el pico en los cromatogramas.

## VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El objetivo general del trabajo de graduación fue la determinación de un modelo cinético de reacción para la producción de polihidroxicanoatos a partir de azúcar comercial utilizando *Bacillus subtilis*. Esta cepa es capaz de utilizar sacarosa como sustrato, ya que posee el sistema fosfotransferasa fosfoenolpiruvato dependiente. Este mecanismo es empleado por algunas bacterias para el consumo de carbohidratos, especialmente disacáridos. La sacarosa ingresa a la célula como sacarosa-6-fostato y se incorpora a la vía glucolítica para producir piruvato y luego producir polihidroxicanoatos. Por lo que primero se evaluó la producción de PHA variando la fuente de sustrato.

La fermentación para la comparación de las distintas fuentes de sustrato se realizó en sistemas preparados con 2 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de cloruro de sodio y distintas concentraciones de carbohidratos en Erlenmeyers de 250 mL. El extracto de levadura se empleó como fuente de nitrógeno para el microorganismo; además, este contiene los micronutrientes necesarios para el crecimiento celular como magnesio, calcio y fósforo. El cloruro de sodio sirve para mantener el equilibrio osmótico en el medio. Para la preparación del medio con glucosa como fuente de sustrato, se realizó de primero una hidrólisis ácida de la sacarosa a un pH 1 y 80°C por 60 minutos para obtener una conversión mayor del 85% (m/m). Como se observa en el Cuadro 2 (ver apartado resultados), hubo un mayor rendimiento de formación de biomasa con respecto al consumo de glucosa y un menor rendimiento de formación de polihidroxicanoatos contra consumo de glucosa. Esto nos indica que el Acetil-CoenzimaA formado por la bacteria a partir de la glucosa, fue parcialmente empleado para la producción de PHA. La mayoría fue utilizada en ciclo de Krebs, ya que los cofactores resultantes de esta ruta son oxidados en la cadena transportadora de electrones generando más ATP resultando en un mayor crecimiento celular.

Por otro lado, hubo mayor rendimiento de formación de PHA utilizando sacarosa como sustrato. Como se observa en la Figuras 18 y 19 (ver apartado resultados), hubo un mayor mantenimiento celular y producción de subproductos no identificados al utilizar sacarosa. Este sustrato es más difícil de metabolizar debido a que requiere de un paso más para ser incorporado a glucólisis. Este paso requiere de un ATP, por lo que se gasta más energía. Al necesitar producir más energía es necesario consumir más sacarosa, lo que resulta en la acumulación de Acetil-CoenzimaA. Esto produce que esta molécula sea destinada no solo a ciclo de Krebs, si no que a otras rutas como la

de producción de polihidroxicarboxilatos. Es por eso, se observa un mayor rendimiento de formación de PHA utilizando sacarosa como sustrato

Los PHA se acumulan en condiciones de desequilibrio nutricional, generalmente dónde existe un exceso de la fuente de carbono con respecto a un nutriente limitante como el nitrógeno. Para evaluar la relación que existe entre el carbono y el nitrógeno en la producción de PHA se variaron las concentraciones de carbono manteniendo fijo la cantidad de nitrógeno. Los sistemas se prepararon con 2 g/L de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y se agregó tres diferentes cantidades de sustrato para obtener relaciones de aproximadamente de 90, 180 y 300 (m/m). Se utilizó el reactor SARTORIUS BIostat Aplus con capacidad de un litro y se operó el reactor a 150 rpm, 37°C y sin flujo de aire. No se aplicó un flujo de aire para que hubiera escasez de oxígeno en el medio para propiciar la producción de PHA. El oxígeno es el aceptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones; al no haber esta molécula se inhibe la respiración celular resultando en la acumulación de Acetil-CoenzimaA.

Se puede observar, en general, que se obtiene una mayor producción de PHA al tener una mayor concentración de carbono en el medio según el Cuadro 3 (ver apartado de resultados). Al empezar a escasear el nitrógeno en el medio, la bacteria empieza la producción de los polihidroxicarboxilatos. El excedente de carbono lo utiliza para la producción de PHA, para tener una reserva de energía cuando la bacteria se quede sin sustrato limitante. Por lo que, al haber más carbono en el medio, mayor cantidad de polihidroxicarboxilatos puede producir.

En el medio con un excedente de sacarosa invertida se puede observar que se obtuvo un mayor rendimiento de producción de PHA al tener una relación 113:1 (m/m) carbono-nitrógeno. En el análisis IR, figura 40 (ver apartado anexos) se puede observar un pico pronunciado en  $3356.96 \text{ cm}^{-1}$  perteneciente al grupo -OH. Este último pico, no es característico de una molécula de PHA por lo que la muestra final todavía contenía otras moléculas. Tomando en cuenta este aspecto, se puede ver que se obtuvo una mayor producción con un total de 0.0761 g/L de PHA al tener una relación 263:1 (m/m) carbono-nitrógeno. Además, el rendimiento de formación de biomasa contra consumo de carbono se mantuvo similar entre las tres relaciones, por lo que al haber un incremento de sustrato resulta en un aumento proporcional de biomasa. Al haber un mayor aumento de biomasa, hubo un mayor rendimiento de formación de biomasa contra consumo de nitrógeno. Ya que como se observa en los balances de masa de las figuras 20, 21 y 22 (ver apartado resultados), el consumo de nitrógeno es similar, aproximadamente del 85% (p/v). Esto nos indica que, al llegar a ese consumo de nitrógeno, la bacteria va a dejar de crecer en el medio a pesar de que haya una fuente de carbono en exceso. Se puede visualizar en la Figura 27 (apartado resultados) que el consumo de

azúcares se comporta de igual manera en las distintas fases de crecimiento de bacteria. La disminución de concentración de azúcares no resulta en la producción de PHA y la bacteria alcanza la fase estacionaria aun habiendo alrededor de 17 g/L de sacarosa.

Al igual que para el medio con sacarosa invertida, cuando se utilizó sacarosa como sustrato se obtuvo una mayor producción PHA con la relación de carbono-nitrógeno más alta a comparación de la más baja. Como se observa en la Figura 24 (ver apartado resultados), balance de masa para la relación 179:1 (m/m) carbono-nitrógeno, se obtuvo un menor crecimiento celular lo que resultó en un rendimiento más bajo de formación de biomasa contra consumo de carbono y de nitrógeno a comparación de los otros dos sistemas. Esto se puede deber a que hubo una menor cantidad de concentración bacteriana al inicio de la fermentación. Al haber una menor cantidad de biomasa g/L al inicio, la parte lag de la curva de crecimiento es mayor. Por lo que hubo menos tiempo para la fase exponencial, por ende, menos concentración celular.

Comparando las mejores condiciones variando la relación carbono-nitrógeno utilizando glucosa y sacarosa como sustrato, se obtuvo una mayor producción de PHA utilizando sacarosa. Con una relación de 263:1 (m/m) carbono-nitrógeno, se obtuvo una producción de 0.0761 g/L PHA utilizando glucosa. Mientras que con una relación de 300:1 (m/m) carbono-nitrógeno, se produjo 0.0905 g/L de PHA utilizando sacarosa. Esto sucede, por lo discutido previamente, debido al mantenimiento celular y la dificultad de metabolizar la sacarosa.

Todas las muestras de PHA del Cuadro 3 (ver apartado resultados), fueron analizadas con espectroscopia infrarroja (ver Cuadro 5). Se obtuvieron picos en alrededor 2900 y 2800  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden al enlace simple carbono-carbono y al enlace simple carbono-hidrógeno. Entre más grande los picos de este rango, más grande es la cadena de carbonos formada por la bacteria de PHA. Además, se puede observar el pico característico del doble enlace oxígeno en 1724  $\text{cm}^{-1}$ . Este ocurre debido a que los polihidroxicanoatos son un tipo de hidroxiaácidos. También se tienen lecturas en alrededor de 3330  $\text{cm}^{-1}$  que representan el enlace oxígeno-hidrógeno. Por las lecturas obtenidas, se puede afirmar que se obtuvo una molécula con los picos característicos de PHA a partir de *Bacillus subtilis* utilizando sacarosa/sacarosa invertida, extracto de levadura y cloruro de sodio como medio.

Para la propuesta del modelo de la cinética se utilizó sacarosa como sustrato en lugar de glucosa, debido a los mejores rendimientos obtenidos en la producción de PHA realizados en Erlenmeyers y en el reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus. El modelo de cinética es una herramienta importante para conocer las limitaciones del sistema en las condiciones evaluadas. Nos permite

comprender más el proceso de producción para poder mejorarlo e implementarlo a mayor escala. Para ello, es necesario tener un modelo que se ajusten a los datos experimentales. Se utilizó como modelo base el de Monod, donde la velocidad específica de crecimiento es directamente proporcional a la velocidad específica de crecimiento máxima e inversamente proporcional a la concentración saturación, definida como la concentración a la cual la velocidad específica de crecimiento de la levadura corresponde a la mitad de su valor máximo. Ambos parámetros dependen de la composición del medio, de condiciones externas como la temperatura y el pH, de condiciones de estrés y, del microorganismo. Debido a que el objetivo de la fermentación es la obtención de polihidroxialcanoatos, se analizó el crecimiento bacteriano, el consumo de sustrato limitante y la producción de PHA en el tiempo. Se realizaron únicamente dos experimentaciones en el reactor BioFlo 415. A pesar de que para todas las fermentaciones se van a obtener resultados de crecimiento de bacteria y producción de PHA diferentes, ya que se trata de un ser vivo, se logró determinar un comportamiento similar en los aspectos analizados en las dos corridas como se observa en la Figura 28 del apartado de anexos. Esta tendencia identificada, permitió la realización del modelo cinético.

Se inició con la propuesta del modelo de cinética correspondiente al sustrato. Se puede observar en la ecuación 8 (ver apartado resultados) que la generación de biomasa en el tiempo equivale a su concentración por la tasa de crecimiento específico en el tiempo. La tasa de crecimiento específico depende de los coeficientes  $\mu_{max}$  y  $K_s$ , la concentración de nitrógeno en instantes concretos y el tiempo de fermentación. Se obtuvo un valor de  $\mu_{max}$  de  $0.13967 h^{-1}$  y un  $K_s$  de  $0.01256 g/L$  por lo que *Bacillus subtilis*. Entre más cercano es el valor de  $K_s$  a 0, mayor es la afinidad por el sustrato. Como se observa en la Figura 26 (ver apartado resultados), a medida que se va consumiendo el nitrógeno, se observa un aumento de microorganismos en el tiempo. Después de 22 horas, se puede observar que el organismo alcanza la fase estacionaria a pesar de que todavía hay sustrato en el medio. Esto se debe a que durante la fermentación, el pH del medio va disminuyendo hasta alcanzar un valor de 4.92. *Bacillus subtilis* crece en un rango óptimo de pH entre 6 y 8, por lo que al estar en un medio ácido se inhibe su crecimiento. El medio se acidifica debido a la producción de ácidos orgánicos de la bacteria. Se demostró que el pH puede tener inferencia en el crecimiento de *Bacillus subtilis* por lo que se recomienda analizar esta variable a lo largo del tiempo para poder ser tomada en cuenta para la realización del modelo y que describa mejor el proceso.

La ecuación de cinética para el consumo de nitrógeno se observa en la ecuación 9 (ver apartado resultados), donde el consumo de este equivale al negativo de la velocidad específica por la concentración de células en un tiempo determinado dividido dentro el factor de rendimiento de

biomasa más un ajuste de aceleración de consumo de nitrógeno. Se obtuvo un factor de rendimiento de  $8.84591 \frac{g \text{ de Células}}{g \text{ de nitrógeno}}$ ; el organismo solo necesita trazas de esta molécula para poder reproducirse si se compara con el consumo de sacarosa. Para el ajuste de aceleración de consumo de nitrógeno, se obtuvo para la constante “a” un valor de  $-0.008 \frac{g}{L \cdot h}$  y para la constante “k” un dato de  $-0.20273 h^{-1}$ . Al ser “a” un valor cercano a cero, esta constante va a acelerar el consumo de nitrógeno al principio del modelo. Esta corrección es necesaria debido a que al principio de la fermentación hay una mayor cantidad de sustrato, por lo que va a haber un mayor consumo del mismo. Además, como se agrega un inóculo inicial de aproximadamente  $10^7 \text{ UFC/ml}$  para limitar la fase lag, ya se tiene una cantidad significativa de células por lo que el consumo de los nutrientes es alto desde el principio de la fermentación.

Finalmente, para la producción de polihidroxialcanoatos se planteó la ecuación 10 (ver apartado resultados). Los polihidroxialcanoatos se producen intracelularmente por las bacterias como mecanismo de almacenamiento de carbono y energía. Por lo que la producción de PHA equivale a la concentración de células en un determinado tiempo por el rendimiento de producción de PHA contra la concentración de células por la velocidad específica de crecimiento más una constante asociada en la formación de PHA por la concentración de células. Se obtuvo un rendimiento de  $0.09198 \frac{g \text{ PHA}}{g \text{ Biomasa}}$ . Este se puede considerar como bajo debido a que en la literatura se observan rendimientos mayores a  $0.4 \frac{g \text{ PHA}}{g \text{ Biomasa}}$ . La principal fuente de error era el método de purificación y extracción del producto, donde se perdió la mayor cantidad. Para la recuperación del PHA se utilizaba cloroformo e hipoclorito de sodio y se agitaba a 200 rpm por 3 horas. El tiempo no fue el necesario para que hubiera una mayor solubilización del PHA en el cloroformo por lo que se recomienda aumentar la velocidad de agitación o incrementar el tiempo de extracción.

Para la constante cinética asociada a la producción de PHA se obtuvo un valor de  $0.00372 \frac{g}{L \cdot h}$ . Esta constante representa la producción de PHA durante la fase estacionaria. El microorganismo comienza a producir el producto intracelular durante la fase exponencial, pero cuando llega a la fase estacionaria se produce un incremento en la producción. Esto se debe a que empiezan a escasear los nutrientes por lo que la bacteria se ve en la necesidad de producir cadenas largas de carbonos, para poder degradarlas en un futuro para usarlas como fuente de energía. Como se observa en la Figura 26 (ver apartado resultados), en la hora 33 de fermentación, en los datos experimentales se visualiza un decaimiento de la concentración del producto por lo que la bacteria empezó a consumirlo para su sobrevivencia. Para obtener una mayor cantidad de producto final, se

recomienda fermentar menos tiempo para evitar que la bacteria consuma el PHA si se trabaja a las mismas condiciones.

En general, se obtuvo rendimientos globales bajos de producción de PHA contra formación de biomasa. Para mejorar los mismos se recomienda realizar una fermentación previa donde el medio sea rico en nutrientes para que exista la mayor división celular posible. Esta biomasa puede ser utilizada como inóculo inicial de la fermentación de producción de PHA en el medio con limitante de nitrógeno. Este paso extra supondría una mayor cantidad de células, por lo que al entrar en condiciones de estrés habría una mayor acumulación de PHA por ende, un mayor rendimiento.

Para investigaciones futuras se pueden estudiar aspectos como el efecto del oxígeno disuelto como parte de un factor en la síntesis fermentativa de polihidroxicanoatos para ver si puede ser considerado dentro del modelo cinético. La literatura sugiere que la escasez de esta molécula resulta en una mayor de PHA debido a que se inhiben rutas metabólicas como el ciclo de Krebs. Se podrían variar diferentes flujos de aire para fomentar el crecimiento bacteriano sin afectar la producción de PHA. Además, se podría analizar el utilizar otra fuente de nitrógeno para observar si existe un mayor crecimiento celular. También se podría realizar la experimentación en otros tipos de reactores que no sean batch, como por ejemplo un Fed-batch, para evaluar diferentes escalas y el impacto en la transferencia de masa.

Los polihidroxicanoatos son biopolímeros biodegradables utilizados principalmente en el envasado de alimentos. Su principal costo de producción radica en el sustrato empleado en la fermentación. Como parte del proyecto, se utilizó azúcar comercial como sustrato como una opción más barata para la producción de este biopolímero. Se sugiere realizar más investigaciones utilizando otras fuentes de sustrato, rendimientos y realizar un análisis de costo-beneficio. Finalmente, se propone realizar una investigación relacionada a la purificación y extracción del PHA para obtener productos más puros y tener menos pérdidas. Se debe de verificar la estructura del producto obtenido no solo por medio de análisis FT-IR si no que también por otras técnicas como, por ejemplo: espectroscopía de resonancia magnética nuclear y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Al haber identificado el producto y su grado de pureza, se podría sugerir su uso para ser empleado a escala industrial.

## IX. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un mayor rendimiento de formación de polihidroxicanoatos contra consumo de sustrato de 0.0958 (m/m) al utilizar 22.5 g/L de sacarosa y se alcanzó un mayor rendimiento de formación de biomasa con respecto al consumo de sustrato de 0.0916 (m/m) al emplear 19.5 g/L de sacarosa invertida en las condiciones evaluadas.
2. Se alcanzó un mayor rendimiento de 0.0792 (m/m) para la producción de polihidroxicanoatos empleando una relación 263:1 ( $\frac{g \text{ carbono}}{g \text{ nitrógeno}}$ ) utilizando sacarosa invertida como sustrato y un mayor rendimiento de 0.0649 (m/m) con una relación de 300:1 ( $\frac{g \text{ carbono}}{g \text{ nitrógeno}}$ ) usando sacarosa como sustrato en las condiciones evaluadas.
3. Se determinó que el reactivo limitante de la fermentación a las condiciones evaluadas era la fuente de nitrógeno debido a que cuando escaseaba el nitrógeno total (alrededor de 0.1 g/L; Figura 24, apartado de resultados) se disminuía el crecimiento celular y aumentaba la producción de polihidroxicanoatos; mientras que el consumo de la fuente de carbono mantuvo la misma tendencia en las distintas fases de crecimiento de *Bacillus subtilis*.
4. Se determinó un modelo cinético de fermentación, en donde se definió el crecimiento bacteriano dependiente del tiempo de fermentación, el consumo de sustrato limitante en tiempo específico y la producción de polihidroxicanoatos en el tiempo (ecuaciones 8, 9, 10 y 11 de la sección de resultados); modificando el modelo de Monod con factores de aceleración de consumo de sustrato y factores de fase de crecimiento celular.

## X. RECOMENDACIONES

1. Evaluar diferentes flujos de aire en un rango de 0.1 L/min a 1 L/min. El oxígeno puede elevar el crecimiento bacteriano, pero puede llegar a afectar en el rendimiento de producción de polihidroxialcanoatos. La teoría sugiere que se puede producir más polihidroxialcanoatos utilizando bajos flujos de aire.
2. Realizar un estudio comparativo de fermentación para la producción de polihidroxialcanoatos utilizando otra fuente de nitrógeno. Utilizar extracto levadura es más simple, ya que incluye los micronutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, pero la composición puede llegar a variar. Como reemplazo se podría utilizar peptona de caseína o sulfato de amonio para determinar si se obtienen mayores concentraciones de producto.
3. Valorar el uso de otra fuente de carbono para la fermentación de la producción de polihidroxialcanoatos. En el presente trabajo se emuló las mieles clarificadas, por lo que se podría realizar la fermentación con otra fuente de azúcares como melaza o harina cruda hidrolizada. Con el fin de encontrar un subproducto donde se obtengan mayores rendimientos de producción de producto.
4. Utilizar una cepa de *Bacillus subtilis* genéticamente modificada que sobreviva a medios más ácidos y que esté especializada para que su metabolismo prefiera la producción de PHA respecto a otras rutas. El pH ácido es una de las razones por las que se inhibe el crecimiento bacteriano por lo que se obtiene una concentración final menor, por ende, una menor cantidad de polihidroxialcanoatos intracelular.
5. Evaluar diferentes metodologías de extracción y purificación de los polihidroxialcanoatos para obtener mayores rendimientos de producción. Se podrían realizar más lavados con agua o emplear alcoholes de alto peso molecular donde el PHA sea más soluble y específico para obtener rendimientos similares a los que se reportan en la literatura.
6. Se sugiere realizar un paso previo de fermentación con un medio rico en nutrientes para obtener una mayor cantidad de células. Luego utilizar estas bacterias como inóculo inicial en la fermentación con el medio con limitante de nitrógeno con el fin de tener una mayor cantidad de células con PHA intracelular.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- ASAZGUA. (2020). *Evolución de la agroindustria azucarera de Guatemala*. Obtenido de <https://www.azucar.com.gt/historia/>
- Ballat, M., Chavarrias, A., & Purroy, E. (2014). *Valorización de subproductos en la industria azucarera y análisis de ciclo de vida (Tesis de pregrado)*. Navarra: Universidad Pública de Navarra.
- Berkeley Madonna. (2021). *Berkeley Madonna Homepage*. Obtenido de <https://berkeley-madonna.myshopify.com/>
- Byrom, D. (1991). *Biomaterials Novel Materials from biological sources*. Londres: MacMillan Publishers LTD.
- Calderón, J. (2017). *Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de Lactobacillus acidophilus en la fermentación de un sustrato complejo (Tesis de pregrado)*. Bogotá: Fundación Universidad de América.
- Capuñay, G., Franco, L., Sánchez, S., & Gamboa, L. (2017). Rendimiento de polihidroxicanotaos producidos por bacterias aisladas de bagazo de *Saccharum officinarum*. (15-32, Ed.) *Revista Nacional Pedro Ruiz*, 2(14).
- CETA. (2018). *Cámara de Neubauer*. Obtenido de <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/>
- de Paz, V. (2021). *Guatemala y su contaminación con plásticos*. Obtenido de <https://www.prensalibre.com/opinion/columnasdiarias/guatemala-y-su-contaminacion-con-plasticos/>
- Gamarro, U. (2021). *Buenos precios se esperan para el azúcar de Guatemala en el 2022*. Obtenido de <https://www.prensalibre.com/economia/alta-produccion-y-buenos-precios-se-esperan-para-el-azucar-de-guatemala-en-el-2022/>
- Gonzy, G., de Waard, J., Zagorec, M., & Postma, P. (1991). The glucos permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: evidence for II and III domains. *Molecular Microbiology*, 5(5), 1241-1249. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01898.x>
- Hach. (2021). *Colorímetros Hach*. Obtenido de <https://co.hach.com/colorimetros>

- Hermida, É. (2011). *Polímeros*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Educación Tecnológica.
- Hernández, A. (2015). *Bioteología en caña de azúcar para producir más etanol*. Obtenido de <https://www.croplifela.org/es/actualidad/articulos/bioteologia-en-cana-de-azucar-para-producir-mas-etanol?highlight=WyJiaW90ZWNub2xvZ2lhII0=>
- Hoffmann, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C., & Jahn, D. (1995). The anerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *131*(2), 219-225. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07780.x>
- Hye-Young, S., Hyeoncheol, F., So Young, C., & Sang Yup, L. (2018). Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, *43*(10), 790-805. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.005>
- Kerfeld, D., Aussignarques, C., & Zarzycki, J. (2018). Bacterial microcompartments. *Nature Reviews Microbiology*, *16*, 277-290. doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.10>
- Levenspiel, O. (1999). *Chemical Reaction Engineering*. Nueva York: John Wiley & Sons.
- Losick, R. (2020). *Bacillus subtilis*: a bacterium for all seasons. *Current Biology Magazine*, *30*(19), 1146-1150. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.083>
- NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC. (2008). *Guide to Operations Bioflo 415*. Obtenido de [www.nbsc.com](http://www.nbsc.com)
- Panda, I., Balabantaray, S., Kumar, S., & Patra, N. (2017). Mathematical model of growth and poly-hydroxybutyrate production using microbial fermentation of *Bacillus subtilis*. *Chemical Engineering Communications*, *205*(2), 249-256. doi:<https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1384923>
- Peñalongo, J. (2004). *Evaluación comparativa de dos nuevos procesos de producción de azúcar blanco y crudo a la vez en un ingenio azucarero guatemalteco (Tesis de Pregrado)*. Ciudad de Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala.
- SARTORIUS AG. (2022). *Biostat A bioreactor*. Obtenido de <https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors/benchtop-bioreactors/biostat-a>
- Suchitra, S. (2016). Methods for identification, quantification and characterization of polyhydroxyalkanoates-a review. *International Journal of Bioassays*, *5*(4), 4977-4983.

- Sugarforgood. (2017). *Azúcar en Guatemala*. Obtenido de <http://sugarforgood.com/conocenos/?lang=es#historia>
- Themedicalbiochemistrypage. (2021). *Glucolysis and The Regulation of Blood Glucose*. Obtenido de <https://themedicalbiochemistrypage.org/glycolysis-and-the-regulation-of-blood-glucose/>
- Themedicalbiochemistrypage. (2021). *Pyruvate Dehydrogenase Complex Deficiencies*. Obtenido de <https://themedicalbiochemistrypage.org/pyruvate-dehydrogenase-complex-deficiencies/>
- Thermo Fisher Scientific . (2021). *FTIR: Herramienta valiosa en el análisis de plásticos*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/blog/cienciaacelerada/materiales/ftir-herramienta-valiosa-en-el-analisis-de-plasticos/>
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2021). *Identificación y cuantificación de sustancias por HPLC*. Obtenido de <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/identificacion-y-cuantificacion-de-sustancias-por-hplc/>
- Verhaeghe, T., Aerts, D., Diricks, M., Soetaert, W., & Desmet, T. (2014). The quest for a thermostable sucrose phosphorylase reveals sucrose 6'-phosphate phosphorylase as a novel specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 7027-7037. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5621-y>

## XII. ANEXOS

### A.DATOS ORIGINALES

**Cuadro 6.** Concentración de azúcares iniciales y finales de fermentación en Erlenmeyers de 250 mL para la determinación de producción de polihidroxicanoatos variando la fuente de sustrato

Sistema	Sacarosa g/L	Concentración inicial (±0.0001 %m/v)			Concentración final (±0.0001 % m/v)		
		Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
		1.1	15*	0.017	0.224	0.051	0.007
1.2	15*	0.017	0.224	0.051	0.009	0.178	0.041
1.3	15*	0.017	0.224	0.051	0.008	0.132	0.028
2.1	20*	0.018	0.309	0.066	0.016	0.24	0.021
2.2	20*	0.018	0.309	0.066	0.012	0.271	0.013
2.3	20*	0.018	0.309	0.066	0.011	0.246	0.015
3.1	15	0.247	0.021	0.025	0.165	0.01	0.014
3.2	15	0.247	0.021	0.025	0.144	0.021	0.025
3.3	15	0.247	0.021	0.025	0.117	0.015	0.028
4.1	20	0.405	0.027	0.019	0.204	0.011	0.016
4.2	20	0.405	0.027	0.019	0.216	0.015	0.022
4.3	20	0.405	0.027	0.019	0.228	0.023	0.021

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en Erlenmeyers. Los datos fueron obtenidos mediante cromatografía líquida. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología. Notación: \*Sacarosa invertida.

**Cuadro 7.** Pesos de beakers para la determinación de peso seco de biomasa y de peso de polihidroxicanoatos para la fermentación en Erlenmeyers de 250 mL.

<b>Sistema</b>	<b>Sacarosa (g/L)</b>	<b>Peso beaker (±0.00001 g)</b>	<b>Peso beaker con biomasa (±0.00001 g)</b>	<b>Peso beaker con PHA (±0.00001 g)</b>
1.1	15*	75.4655	75.6388	75.4722
1.2	15*	80.8104	80.9563	80.8125
1.3	15*	72.4682	72.6192	72.4736
2.1	20*	75.4655	75.5704	75.4742
2.2	20*	72.4682	72.5247	72.4696
2.3	20*	73.4706	73.6672	73.481
3.1	15	67.5744	67.686	67.5793
3.2	15	80.8104	80.9292	80.8149
3.3	15	ND	ND	ND
4.1	20	74.4205	74.6201	74.4388
4.2	20	73.4706	73.6533	73.488
4.3	20	75.2244	75.4258	75.2402

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en Erlenmeyers. Los datos fueron obtenidos mediante peso seco. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología. Notación: \*Sacarosa invertida.

**Cuadro 8.** Concentración de pH de fermentación en Erlenmeyer de 250 mL para la determinación de producción de polihidroxicanoatos variando la fuente de sustrato.

<b>Sistema</b>	<b>Sacarosa (g/L)</b>	<b>pH inicial (±0.001)</b>	<b>pH final (±0.001)</b>
1.1	15*	6.96	4.98
1.2	15*	6.96	4.92
1.3	15*	6.96	5.02
2.1	20*	6.98	5.02
2.2	20*	6.98	4.99
2.3	20*	6.98	4.95
3.1	15	6.98	5.12

3.2	15	6.98	5.02
3.3	15	6.98	5.04
4.1	20	7.01	4.98
4.2	20	7.01	5.01
4.3	20	7.01	5.03

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en Erlenmeyers. Los datos fueron obtenidos utilizando el potenciómetro del reactor SARTORIUS. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología. Notación: \*Sacarosa invertida.

**Cuadro 9.** Concentración de nitrógeno y carbono iniciales y finales de fermentación en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus para la determinación de producción de polihidroxicanoatos variando la relación carbono nitrógeno.

<b>Sistema</b>	<b>Sacarosa (g/L)</b>	<b>Carbono inicial (±0.0001 g/L)</b>	<b>Carbono final (±0.0001 g/L)</b>	<b>Nitrógeno inicial (±0.0001 g/L)</b>	<b>Nitrógeno final (±0.0001 g/L)</b>
1	10*	29	4	0.255	0.068
2	15*	46	15	0.25	0.051
3	20*	63	17	0.239	0.062
4	10	23	7	0.275	0.065
5	15	44	8	0.245	0.042
6	20	69	1.2	0.23	0.062

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus. Los datos fueron obtenidos utilizando el colorímetro Hach. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología. Notación: \*Sacarosa invertida.

**Cuadro 10.** Pesos de beakers para la determinación de peso seco de biomasa y de peso de polihidroxialcanoatos para la fermentación en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.

<b>Sistema</b>	<b>Sacarosa (g/L)</b>	<b>Peso beaker (±0.00001 g)</b>	<b>Peso beaker con biomasa (±0.00001 g)</b>	<b>Peso beaker con PHA (±0.00001 g)</b>
1	10*	72.6086	72.7668	72.6233
1	10*	75.3438	75.5041	75.3745
1	10*	67.6922	67.8608	67.7023
1	10*	73.6015	73.7697	73.6422
2	15*	72.6086	72.8753	72.6227
2	15*	75.3438	75.5921	75.3514
2	15*	67.6922	67.9481	67.7026
2	15*	73.6015	73.835	73.6185
3	20*	74.5064	74.749	74.5306
3	20*	75.2678	75.5318	75.2853
3	20*	67.6759	67.9349	67.6882
3	20*	73.5485	73.8232	73.5706
4	10	74.5064	74.7406	74.5167
4	10	75.2978	75.4501	75.2988
4	10	67.6759	67.9147	67.6843
4	10	73.5485	73.7728	73.5526
5	15	74.5064	74.6902	74.5123
5	15	75.2978	75.4627	75.3075
5	15	67.6759	67.8284	67.6964
5	15	73.5485	73.7446	73.5756
6	20	72.5791	72.8723	72.596
6	20	67.6459	67.9369	67.6649
6	20	74.5064	74.8247	74.5244
6	20	75.2978	75.6159	75.32
6	20	73.5385	73.7948	73.5529

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus. Los datos fueron obtenidos por medio de peso seco. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología. Notación: \*Sacarosa invertida.

**Cuadro 11.** Concentración de pH de fermentación en reactor Sartorius BIOSTAT Aplus para la determinación de producción de polihidroxicanoatos variando la relación carbono nitrógeno

<b>Sistema</b>	<b>Sacarosa (g/L)</b>	<b>pH inicial (±0.001)</b>	<b>pH final (±0.001)</b>
1	10*	7.08	7.05
2	15*	7.01	7.23
3	20*	7.02	6.97
4	10	6.96	7.15
5	15	6.98	7.20
6	20	6.94	7.28

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus. Los datos fueron obtenidos utilizando el potenciómetro del equipo. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología. Notación: \*Sacarosa invertida.

**Cuadro 12.** Concentración de nitrógeno y azúcares suavizados de fermentación en reactor BioFlo 415 para la propuesta del modelo cinético de la producción de polihidroxicanoatos utilizando *Bacillus subtilis*.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Corrida 1</b>		<b>Corrida 2</b>	
	<b>Concentración azúcares (±0.0001 %m/v)</b>	<b>Concentración nitrógeno (±0.0001 g/L)</b>	<b>Concentración azúcares (±0.0001 %m/v)</b>	<b>Concentración nitrógeno (±0.0001 g/L)</b>
0	0.388	0.250	0.460	0.250
1	0.378	0.245	0.455	0.238
2	0.368	0.241	0.449	0.232
3	0.365	0.236	0.445	0.225
4	0.362	0.232	0.434	0.218
5	0.361	0.227	0.427	0.212
6	0.359	0.221	0.422	0.206
7	0.356	0.216	0.411	0.200
8	0.351	0.210	0.403	0.194
9	0.348	0.205	0.388	0.188

10	0.345	0.199	0.385	0.182
11	0.3413	0.192	0.376	0.177
12	0.339	0.186	0.370	0.171
13	0.339	0.179	0.369	0.166
14	0.338	0.173	0.369	0.161
15	0.338	0.166	0.369	0.156
16	0.338	0.158	0.368	0.151
17	0.337	0.151	0.368	0.147
18	0.337	0.143	0.367	0.142
19	0.337	0.136	0.367	0.138
20	0.337	0.128	0.366	0.133
21	0.337	0.122	0.366	0.129
22	0.337	0.117	0.365	0.125
23	0.336	0.115	0.364	0.121
24	0.336	0.114	0.364	0.119
25	0.328	0.113	0.352	0.119
26	0.324	0.111	0.343	0.118
27	0.323	0.110	0.333	0.117
28	0.321	0.108	0.322	0.115
29	0.315	0.106	0.317	0.114
30	0.311	0.105	0.315	0.113
31	0.298	0.104	0.304	0.111
32	0.294	0.100	0.301	0.110
33	0.292	0.099	0.293	0.108
34	0.29	0.097	0.292	0.106
35	0.288	0.096	0.284	0.105
36	0.288	0.094	0.280	0.104

---

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 36h a 37°C y 150rpm en reactor BioFlo 415. Los datos de nitrógeno fueron obtenidos utilizando el colorímetro Hach y la concentración de azúcares se obtuvo por medio de HPLC. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología.

**Cuadro 13.** Pesos de beakers para la determinación de peso seco de biomasa y de peso de polihidroxialcanoatos para la corrida 1 de la fermentación en reactor BioFlo 415.

<b>Tiempo de fermentación</b>	<b>Peso beaker</b>	<b>Peso beaker con biomasa</b>	<b>Peso beaker con PHA</b>
<b>(h)</b>	<b>(±0.00001 g)</b>	<b>(±0.00001 g)</b>	<b>(±0.00001 g)</b>
0	65.8149	65.8186	65.8149
1	30.2735	30.2776	30.2735
2	31.0047	31.0092	31.0047
3	59.6942	59.6994	59.6942
4	32.2106	32.2161	32.2106
5	32.1485	32.1542	32.1485
6	32.6965	32.7028	32.6965
7	34.4842	34.4913	34.4842
8	32.5102	32.518	32.5102
9	33.4728	33.4813	33.4728
10	33.1823	33.1934	33.1823
22	34.5513	34.6017	34.5569
23	32.3216	32.3722	32.328
24	33.0168	33.0675	33.0236
25	32.8026	32.8534	32.8096
26	75.3443	75.3951	75.3514
27	73.6228	73.6737	73.6301
28	67.6791	67.7299	67.6865
29	72.5938	72.6448	72.6014
30	74.5565	74.6073	74.5642
31	49.4765	49.5272	49.4844
32	54.2145	54.2654	54.2225
33	49.565	49.6158	49.573
34	60.3788	60.4294	60.3867

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 34h a 37°C y 150rpm en reactor BioFlo 415. Los datos fueron obtenidos por peso seco. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología.

**Cuadro 14.** Pesos de beakers para la determinación de peso seco de biomasa y de peso de polihidroxialcanoatos para la corrida 2 de la fermentación en reactor BioFlo 415.

<b>Tiempo de fermentación</b>	<b>Peso beaker</b>	<b>Peso beaker con biomasa</b>	<b>Peso beaker con PHA</b>
<b>(h)</b>	<b>(±0.00001 g)</b>	<b>(±0.00001 g)</b>	<b>(±0.00001 g)</b>
0	34.3599	34.3641	34.3599
3	32.5874	32.5917	32.5874
6	30.9037	30.9111	30.9037
9	32.2224	32.232	32.2224
11	33.0623	33.0748	33.0625
12	32.6873	32.7038	32.6878
24	32.407	32.4494	32.4139
26	32.1111	32.1541	32.1184
28	32.0504	32.0939	32.0577
30	32.891	32.9349	32.8983
32	33.373	33.4172	33.3802
34	34.4377	34.4829	34.4448
36	75.2129	75.258	75.22

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 36h a 37°C y 150rpm en reactor BioFlo 415. Los datos fueron obtenidos por peso seco. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología.

**Cuadro 15.** Concentración de pH de fermentación en reactor BioFlo para la determinación de producción de polihidroxicanoatos

<b>Corrida</b>	<b>Sacarosa (g/L)</b>	<b>pH inicial (±0.001)</b>	<b>pH final (±0.001)</b>
1	20	7.28	4.84
2	20	7.08	5.13

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 36h a 37°C y 150rpm en reactor BioFlo 415. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología.

## B. DATOS CALCULADOS

**Cuadro 16.** Concentración de sustrato, biomasa y polihidroxicanoatos en fermentaciones realizadas en Erlenmeyers de 250 mL y los rendimientos de producción de PHA y biomasa.

<b>Sistema</b>	<b>Sustrato final (g/L)</b>	<b>Biomasa final (g/L)</b>	<b>PHA final (g/L)</b>	<b>Yx/s (m/m)</b>	<b>Yp/x (m/m)</b>
1.1*	7.95 ±1.41 * 10 <sup>-4</sup>	0.8252 ±1.41 * 10 <sup>-5</sup>	0.0319 ±1.41 * 10 <sup>-5</sup>	14.00 ±3.98 * 10 <sup>-4</sup>	4.26 ±1.89 * 10 <sup>-3</sup>
1.2*	11.4 ±1.41 * 10 <sup>-4</sup>	0.6948 ±1.41 * 10 <sup>-5</sup>	0.0100 ±1.41 * 10 <sup>-5</sup>	11.57 ±5.75 * 10 <sup>-4</sup>	1.62 ±2.29 * 10 <sup>-3</sup>
1.3*	8.4 ±1.41 * 10 <sup>-4</sup>	0.7190 ±1.41 * 10 <sup>-5</sup>	0.0257 ±1.41 * 10 <sup>-5</sup>	12.02 ±3.81 * 10 <sup>-4</sup>	4.00 ±2.20 * 10 <sup>-3</sup>
2.1*	13.85 ±1.41 * 10 <sup>-4</sup>	0.4995 ±1.41 * 10 <sup>-5</sup>	0.0414 ±1.41 * 10 <sup>-5</sup>	7.75 ±3.20 * 10 <sup>-4</sup>	9.69 ±3.32 * 10 <sup>-3</sup>
2.2*	14.8 ±1.41 * 10 <sup>-4</sup>	0.269 ±1.41 * 10 <sup>-5</sup>	0.0067 ±1.41 * 10 <sup>-5</sup>	3.57 ±2.77 * 10 <sup>-4</sup>	3.38 ±7.18 * 10 <sup>-3</sup>

2.3*	13.6	0.9362	0.0495	15.67	5.73
	$\pm 1.41 * 10^{-4}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 4.50$ $* 10^{-4}$	$\pm 1.64$ $* 10^{-3}$
3.1	9.45	0.5314	0.0233	8.00	5.19
	$\pm 1.41 * 10^{-4}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 3.36$ $* 10^{-4}$	$\pm 3.15$ $* 10^{-3}$
3.2	9.5	0.5657	0.0214	8.61	4.43
	$\pm 1.41 * 10^{-4}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 3.12$ $* 10^{-4}$	$\pm 2.93$ $* 10^{-3}$
3.3	8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	$\pm 1.41 * 10^{-4}$				
4.1	11.55	0.9505	0.0871	8.81	9.94
	$\pm 1.41 * 10^{-4}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 1.82$ $* 10^{-4}$	$\pm 1.62$ $* 10^{-3}$
4.2	12.65	0.87	0.0829	8.00	10.41
	$\pm 1.41 * 10^{-4}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 1.82$ $* 10^{-4}$	$\pm 1.79$ $* 10^{-3}$
4.3	13.6	0.959	0.0752	8.89	8.50
	$\pm 1.41 * 10^{-4}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 1.41$ $* 10^{-5}$	$\pm 2.00$ $* 10^{-4}$	$\pm 1.60$ $* 10^{-3}$

---

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en Erlenmeyers. Los datos fueron calculados utilizando los datos originales de los Cuadros 6 y 7. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología. Notación: \*Sacarosa invertida, Yx/s rendimiento global de formación de biomasa contra consumo de sustrato; Yp/x rendimiento global de formación de polihidroxicanoatos contra crecimiento bacteriano.

**Cuadro 17.** Concentración de sustrato, biomasa y polihidroxialcanoatos en fermentaciones realizadas en reactor SARTORIUS BIOSTAT A plus y los rendimientos de producción de PHA y biomasa respecto a carbono y nitrógeno.

Sistema	Relación					
	Carbono-nitrógeno (m/m)	Biomasa final (g/L)	PHA final (g/L)	Yx/sc % (m/m)	Yx/sn % (m/m)	Yp/x % (m/m)
1*	113:1 ±0.04	0.6553 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	0.0962 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	2.33 ±1.6 * 10 <sup>-4</sup>	311.93 ±2.3 * 10 <sup>-1</sup>	16.49 ±6.9 * 10 <sup>-3</sup>
2*	184:1 ±0.07	1.0044 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	0.0491 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	3.01 ±1.3 * 10 <sup>-4</sup>	469.55 ±3.3 * 10 <sup>-1</sup>	5.25 ±4.3 * 10 <sup>-3</sup>
3*	263:1 ±0.11	1.0403 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	0.0761 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	2.09 ±8.7 * 10 <sup>-5</sup>	542.54 ±4.3 * 10 <sup>-1</sup>	7.92 ±4.2 * 10 <sup>-3</sup>
4	83:1 ±0.03	0.8496 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	0.0238 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	4.82 ±2.5 * 10 <sup>-4</sup>	367.43 ±2.5 * 10 <sup>-1</sup>	3.08 ±5.2 * 10 <sup>-3</sup>
5	179:1 ±0.73	0.6973 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	0.0632 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	1.74 ±1.1 * 10 <sup>-4</sup>	308.03 ±2.1 * 10 <sup>-1</sup>	10.11 ±6.4 * 10 <sup>-3</sup>
6	300:1 ±0.13	1.4769 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	0.0905 ±4 * 10 <sup>-5</sup>	2.05 ±6.6 * 10 <sup>-5</sup>	829.11 ±6.9 * 10 <sup>-1</sup>	6.50 ±3.2 * 10 <sup>-3</sup>

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT A plus. Los datos fueron calculados utilizando los datos originales de los Cuadros 9 y 10. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología. Notación: \*Sacarosa invertida, Yx/sc rendimiento global de formación de biomasa contra consumo de carbono; Yx/sn rendimiento global de formación de biomasa contra consumo de nitrógeno total; Yp/x rendimiento global de formación de polihidroxialcanoatos contra crecimiento bacteriano; m/m, relación másica molecular.

**Cuadro 18.** Concentración de biomasa y polihidroxicanoatos en fermentaciones realizadas en reactor BioFlo 415.

<b>Tiempo</b> <b>(h)</b>	<b>Corrida 1</b>	<b>Corrida 2</b>	<b>Corrida 1</b>	<b>Corrida 2</b>	<b>Corrida 1</b>	<b>Corrida 2</b>
	<b>Biomasa</b>	<b>Biomasa</b>	<b>PHA</b>	<b>PHA</b>	<b>Azúcares</b>	<b>Azúcares</b>
	<b>(±1.41 * 10<sup>-5</sup>g/L)</b>	<b>(±1.41 * 10<sup>-5</sup>g/L)</b>	<b>(±1.41 * 10<sup>-5</sup>g/L)</b>	<b>(±1.41 * 10<sup>-5</sup>g/L)</b>	<b>(±0.1417g/L)</b>	<b>(±0.1417g/L)</b>
0	0.0740	0.0840	0	0	19.4000	23.0000
1	0.0820	0.0840	0	0	18.9000	22.7857
2	0.0900	0.0850	0	0	18.4000	22.4522
3	0.1040	0.0860	0	0	18.2500	22.275
4	0.1100	0.1088	0	0	18.1400	21.7426
5	0.1140	0.1300	0	0	18.0500	21.3665
6	0.1260	0.1486	0	0	17.9500	21.1000
7	0.1420	0.1650	0	0	17.8000	20.5717
8	0.1560	0.1792	0	0	17.5500	20.153
9	0.1700	0.1912	0	0	17.4000	19.4000
10	0.2220	0.1980	0	0.0010	17.2500	19.273
11	0.2357	0.2500	0.0085	0.0040	17.0650	18.8000
12	0.2875	0.3300	0.0133	0.0100	16.9753	18.5000
13	0.3449	0.4100	0.0191	0.0149	16.9552	18.4891
14	0.4055	0.5000	0.0259	0.0209	16.9322	18.4744
15	0.4669	0.5700	0.0337	0.0275	16.9251	18.4575
16	0.5922	0.6500	0.0425	0.0347	16.9110	18.4384
17	0.6715	0.7100	0.0523	0.0425	16.8996	18.4171
18	0.7444	0.7700	0.0631	0.0509	16.8903	18.3936
19	0.8109	0.8100	0.0749	0.0599	16.8809	18.3679
20	0.8710	0.8400	0.0877	0.0695	16.8752	18.3400
21	0.9247	0.8340	0.1015	0.0797	16.8634	18.3099
22	1.008	0.8352	0.1120	0.0905	16.8500	18.2776
23	1.012	0.8419	0.1280	0.1019	16.8300	18.2431
24	1.014	0.8483	0.1360	0.1380	16.8000	18.2000
25	1.016	0.8544	0.1400	0.1435	16.4000	17.6105

26	1.016	0.8601	0.1420	0.1460	16.2000	17.1500
27	1.018	0.8654	0.1460	0.1460	16.1500	16.6883
28	1.016	0.8702	0.1480	0.1460	16.0500	16.1000
29	1.020	0.8746	0.1520	0.1457	15.7500	15.8909
30	1.016	0.8784	0.1540	0.1455	15.5500	15.5750
31	1.014	0.8817	0.1580	0.1447	14.9000	15.2183
32	1.018	0.8843	0.1600	0.1440	14.7000	15.0500
33	1.016	0.9010	0.1600	0.1432	14.6000	14.6705
34	1.012	0.9040	0.1580	0.1425	14.5000	14.6000
35	1.013	0.9030	0.1550	0.1422	14.4300	14.2475
36	1.010	0.9020	0.1500	0.1420	14.4350	14.0000

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor BioFlo 415. Los datos fueron calculados utilizando los datos originales de los Cuadros 12, 13 y 14. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología.

**Cuadro 19.** Concentración biomasa, nitrógeno, azúcares y polihidroxialcanoatos promedio en las fermentaciones realizadas en BioFlo 415.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>PHA (g/L)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Nitrógeno (g/L)</b>	<b>Desviación estándar</b>
0	0.079	7.07E-03	0	0.00E+00	0.25	0.00E+00
1	0.083	1.41E-03	0	0.00E+00	0.242335	4.90E-03
2	0.0875	3.54E-03	0	0.00E+00	0.23674	6.59E-03
3	0.095	1.27E-02	0	0.00E+00	0.231115	8.04E-03
4	0.1094	8.49E-04	0	0.00E+00	0.22546	9.25E-03
5	0.122	1.13E-02	0	0.00E+00	0.219775	1.02E-02
6	0.1373	1.60E-02	0	0.00E+00	0.21406	1.09E-02
7	0.1535	1.63E-02	0	0.00E+00	0.208315	1.14E-02
8	0.1676	1.64E-02	0	0.00E+00	0.20254	1.17E-02
9	0.1806	1.50E-02	0	0.00E+00	0.196735	1.17E-02
10	0.21	1.70E-02	0.0005	7.07E-04	0.1909	1.15E-02
11	0.24285	1.01E-02	0.00625	3.18E-03	0.185035	1.10E-02
12	0.30875	3.01E-02	0.01165	2.33E-03	0.17914	1.03E-02
13	0.37745	4.60E-02	0.017	2.97E-03	0.173215	9.31E-03

14	0.45275	6.68E-02	0.0234	3.54E-03	0.16726	8.12E-03
15	0.51845	7.29E-02	0.0306	4.38E-03	0.161275	6.68E-03
16	0.6211	4.09E-02	0.0386	5.52E-03	0.15526	5.01E-03
17	0.69075	2.72E-02	0.0474	6.93E-03	0.149215	3.09E-03
18	0.7572	1.81E-02	0.057	8.63E-03	0.14314	9.33E-04
19	0.81045	6.36E-04	0.0674	1.06E-02	0.137035	1.46E-03
20	0.8555	2.19E-02	0.0786	1.29E-02	0.1309	4.10E-03
21	0.87935	6.41E-02	0.0906	1.54E-02	0.125835	5.42E-03
22	0.921609	1.22E-01	0.10125	1.52E-02	0.121395	6.06E-03
23	0.926968	1.20E-01	0.11495	1.85E-02	0.118795	4.29E-03
24	0.931175	1.17E-01	0.137	1.41E-03	0.1169	3.55E-03
25	0.935212	1.14E-01	0.14175	2.47E-03	0.11606	4.33E-03
26	0.938061	1.10E-01	0.144	2.83E-03	0.115015	4.84E-03
27	0.941704	1.08E-01	0.146	0.00E+00	0.113635	4.91E-03
28	0.943123	1.03E-01	0.147	1.41E-03	0.112235	4.99E-03
29	0.9473	1.03E-01	0.148875	4.42E-03	0.110445	5.58E-03
30	0.947217	9.73E-02	0.14975	6.01E-03	0.109375	5.13E-03
31	0.947856	9.35E-02	0.151375	9.37E-03	0.107915	5.20E-03
32	0.951199	9.45E-02	0.152	1.13E-02	0.105446	6.67E-03
33	0.9585	8.13E-02	0.151625	1.18E-02	0.1039435	6.74E-03
34	0.958	7.64E-02	0.15025	1.10E-02	0.102054	6.29E-03
35	0.958	7.78E-02	0.1486	9.05E-03	0.1008875	6.88E-03
36	0.956	7.64E-02	0.146	5.66E-03	0.099334	6.94E-03

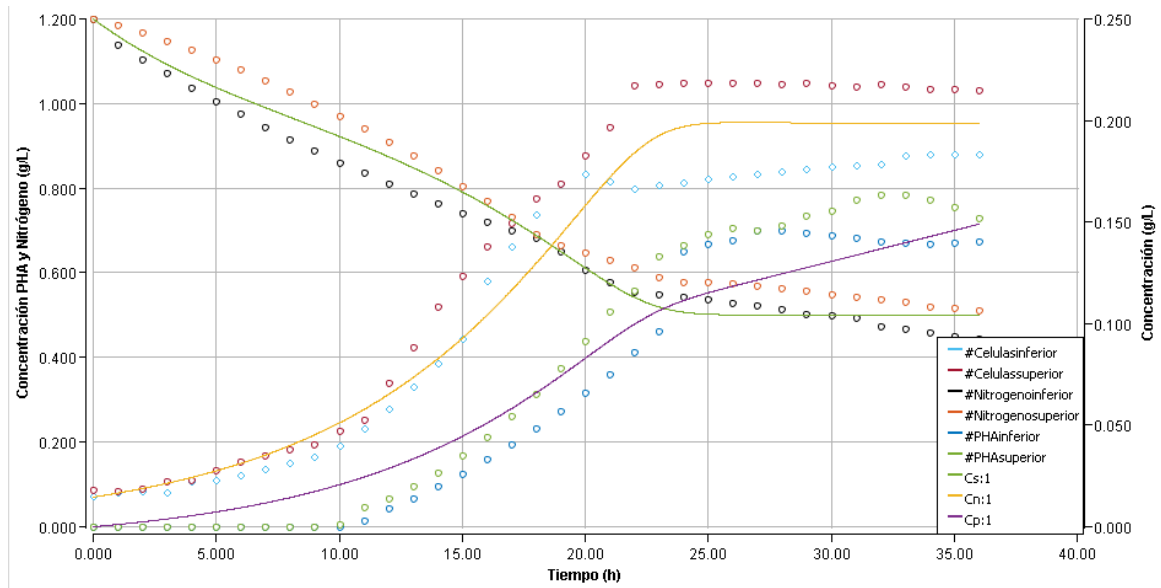
---

Datos obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT A plus. Los datos fueron calculados utilizando los datos calculados del Cuadro 19. El detalle de composición del medio utilizado se puede encontrar en metodología.

**Cuadro 20.** Coeficientes calculados utilizando Berkeley Madonna para la determinación del modelo matemático.

Coeficiente	Valor	Dimensional
$\mu_{max}$	0.13967	$h^{-1}$
$K_s$	0.01256	g/L
$Y_{x/s}$	8.84591	m/m
$Y_{p/x}$	0.09198	m/m
$a$	-0.008	$g/(L \cdot h)$
$k$	-0.20273	$h^{-1}$
$i$	0.00372	$g/(L \cdot h)$

**Figura 31.** Ajuste de modelo cinético con Berkeley Madonna a los resultados experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de nitrógeno y producción de PHA con su desviación estándar.



Los resultados obtenidos corresponden a la experimentación realizada en el reactor BioFlo 415. Notación: #PHA, producción de polihidroxicanoatos en el tiempo experimental; #Celulas, producción de *Bacillus subtilis* en el tiempo experimental; #Nitrogeno, consumo de nitrógeno en el tiempo experimental; Cs:1, ajuste de consumo de nitrógeno; Cn:1, ajuste de producción de *Bacillus subtilis*; Cp:1, ajuste de producción de polihidroxicanoatos.

## C. DATOS DE REACTIVOS

**Cuadro 21.** Información del ácido sulfúrico empleado para inversión de sacarosa.

Reactivo	Ácido sulfúrico
Marca	Merck
Temperatura almacenamiento (°C)	15-25
Peso molecular (g/mol)	36.46
Número de CAS	7647-01-0

**Cuadro 22.** Información de hidróxido de sodio empleado para neutralizar los medios.

Reactivo	Hidróxido de sodio
Marca	Merck
Temperatura almacenamiento (°C)	15 - 25
Peso molecular (g/mol)	40.00
Número de CAS	1310-73-2

**Cuadro 23.** Información de cloruro de sodio usado para preparar los medios.

Reactivo	Cloruro de sodio
Marca	Merck
Temperatura almacenamiento (°C)	15-25
Peso molecular (g/mol)	58.44
Número de CAS	7647-14-5

**Cuadro 24.** Información de extracto de levadura usado para preparar los medios.

Reactivo	Extracto de levadura granulado
Marca	Millipore
Temperatura almacenamiento (°C)	15-25
Solubilidad g/L	410
pH (10 g/L, H <sub>2</sub> O, 20°C)	7
Número de CAS	8013-01-2

**Cuadro 25.** Información de caldo nutritivo usado para el inóculo inicial.

Reactivo	Caldo nutritivo
Marca	Millipore
Temperatura almacenamiento (°C)	15-25
Solubilidad (g/L)	8
pH (8 g/L, H <sub>2</sub> O, 20°C)	7
Número de catálogo	105443

**Cuadro 26.** Información de agar nutritivo empleado para realizar cultivos de *Bacillus subtilis*.

Reactivo	Agar nutritivo
Marca	Millipore
Temperatura almacenamiento (°C)	15-25
Solubilidad (g/L)	40
pH (40 g/L, H <sub>2</sub> O, 37°C)	7.1 – 7.5
Número de CAS	111471

**Cuadro 27.** Información de cloroformo empleado para la purificación de polihidroxicanoatos.

Reactivo	Cloroformo
Marca	Millipore
Temperatura almacenamiento (°C)	15-25
Peso molecular (g/mol)	119.38
Número de CAS	67-66-3

**Cuadro 28.** Información de hipoclorito de sodio empleado para la extracción de polihidroxialcanoatos.

Reactivo	Hipoclorito de sodio
Marca	Magia Blanca
Temperatura almacenamiento (°C)	15-25
Solubilidad	100% soluble
pH	11.0 a 13.0
Número de CAS	7681-52-9

#### **D.DATOS DE EQUIPO**

**Cuadro 29.** Información de balanza analítica para realizar los pesos secos.

Equipo	Balanza analítica
Marca	OHAUS
Modelo	PA114
Capacidad máxima (g)	110
Legibilidad (g)	0.0001

**Cuadro 30.** Información de balanza para pesaje de reactivos.

Equipo	Balanza
Marca	OHAUS
Modelo	TS4KS
Capacidad máxima (g)	4000
Legibilidad (g)	0.1

**Cuadro 31.** Información de centrifuga de capacidad de un 1L para extracción de PHA.

Equipo	Centrifuga 1L
Marca	SORVALL
Modelo	RT-7
Clasificación	115 V - 60 Hz - 12 A
Velocidad máxima (rpm)	7000

**Cuadro 32.** Información de centrifuga para tubos Falcon de 50 mL para purificación de PHA.

Equipo	Centrifuga tubos Falcon
Marca	Eppendorf AG
Modelo	5804 R
Clasificación	120 V – 60 Hz – 12A
Número de serie	5805F0033302
Velocidad máxima (rpm)	14000

**Cuadro 33.** Información de horno de convección para determinar peso seco.

Equipo	Horno de convección
Marca	VMR
Modelo	E191047
Clasificación	120 V – 60 Hz – 1.4 kW
Número de serie	041042611A1013

**Cuadro 34.** Información de agitador para realizar la fermentación en Erlenmeyers de 250 mL.

Equipo	Agitador
Marca	New Brunswick Scientific
Modelo	Series 25
Velocidad máxima (rpm)	500
Temperatura máxima (°C)	100
Clasificación	120 V – 60 Hz – 12 kW

**Cuadro 35.** Información de incubadora para cultivo en cajas Petri de *Bacillus subtilis*.

---

Equipo	Incubadora
Marca	LAB-LINE INSTRUMENTS, INC
Modelo	Imperial II
Clasificación	120 V – 60 Hz – 600 W

---

**Cuadro 36.** Información de biorreactor BioFlo 415 para fermentación de *Bacillus subtilis*.

---

Equipo	Biorreactor
Marca	New Brunswick Scientific
Modelo	BioFlo 415
Clasificación	208-230V – 50/60Hz – 15A

---

**Cuadro 37.** Información de biorreactor BIOSTAT A Plus para fermentación de *Bacillus subtilis*.

---

Equipo	Biorreactor
Marca	SARTORIUS STEDIM BIOTECH
Modelo	BIOSTAT A Plus
Clasificación	120/230V – 50/60Hz – 15A

---

**Cuadro 38.** Información de estufa para preparación de medios.

---

Equipo	Estufa
Marca	BARNSTEAD/THERMOLYNE
Modelo	SP47235
Clasificación	120V – 60Hz – 13.7A

---

**Cuadro 39.** Información de Vortex para homogenizar solución para conteo microbiano.

Equipo	Vortex
Marca	Fisher Scientific
Número de catálogo	02-215-365
Clasificación	120V – 50/60 Hz – 1.2 A
Velocidad (rpm)	300 - 3200

**Cuadro 40.** Información de autoclave para la preparación de medios.

Equipo	Autoclave
Marca	Napco
Modelo	8000-DSE
Temperatura (°C)	121 - 132
Presión (Psi)	15 - 27

**Cuadro 41.** Información de espectrofotómetro para análisis de IR de muestras de polihidroxialcanoatos.

Equipo	Espectrofotómetro
Marca	Perkin Elmer
Modelo	Frontier IR/NIR systems
Clasificación	100-230 V – 50/60Hz – 1.5A

**Cuadro 42.** Información de reactor digital Hach para análisis de carbono y nitrógeno.

Equipo	Reactor digital
Marca	Hach
Modelo	DRB 200
Clasificación	115-230 V – 50/60Hz

**Cuadro 43.** Información de Calorímetro Hach para digestión de soluciones.

Equipo	Calorímetro portable
Marca	HACH
Modelo	DR/890
Bateria	4 Baterias AA

**Cuadro 44.** Información de equipo HPLC para análisis de concentración de azúcar.

Equipo	Detector de índice de refracción P-1200
Marca	Agilent
Modelo	P-1200
Clasificación	100-120/220-240 V – 50/60 Hz

**Cuadro 45.** Información de microscopio para conteos microbianos.

Equipo	Microscopio
Marca	Leica
Modelo	DM500
Clasificación	100-240 V – 50/60 Hz – 1A

## E. MUESTRA DE CÁLCULOS

**Ecuación 12.** Cálculo coeficiente de rendimiento  $Y_{p/x}$

$$Y_{p/x} = \frac{Cp_f - Cp_i}{Cx_f - Cx_i}$$

Donde:

$Y_{\frac{p}{x}}$  = rendimiento de formación de polihidroxicanoatos contra crecimiento bacteriano.

$Cp_f$  = Concentración final polihidroxicanoatos

$Cp_i$  = Concentración inicial polihidroxicanoatos

$Cx_f$  = Concentración final de biomasa

$Cx_i$  = Concentración inicial de biomasa

**Ecuación 13.** Cálculo coeficiente de rendimiento  $Y_{x/s}$

$$Y_{x/s} = \frac{Cx_f - Cx_i}{Cs_f - Cs_i}$$

Donde:

$Y_{\frac{x}{s}}$  = rendimiento de formación de polihidroxialcanoatos contra crecimiento bacteriano.

$Cs_f$  = Concentración final sustrato

$Cs_i$  = Concentración inicial sustrato

$Cx_f$  = Concentración final de biomasa

$Cx_i$  = Concentración inicial de biomasa

**Ecuación 14.** Promedio aritmético.

$$X = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{N}$$

Donde:

$X$  = Promedio

$x_n$  = Distintos valores

$N$  = Cantidad de valores

**Cálculo 1.** Coeficiente de rendimiento de producción de polihidroxicanoatos contra consumo crecimiento de biomasa.

$$Y_{p/x} = \frac{0.0761 \frac{g \text{ PHA}}{L} - 0 \frac{g \text{ PHA}}{L}}{1.0403 \frac{g \text{ Biomasa}}{L} - 0.08 \frac{g \text{ Biomasa}}{L}} = 0.079 \frac{g \text{ PHA}}{g \text{ Biomasa}}$$

Se utilizó la ecuación 11, se demostró el cálculo con datos obtenidos del Cuadro 16 (ver apartado anexos). De igual manera se calculó este coeficiente de rendimiento para los demás casos.

**Cálculo 2.** Coeficiente de rendimiento de crecimiento bacteriano contra consumo de sustrato.

$$Y_{x/s} = \frac{1.0403 \frac{g \text{ Biomasa}}{L} - 0.08 \frac{g \text{ Biomasa}}{L}}{0.062 \frac{g \text{ Nitrógeno}}{L} - 0.239 \frac{g \text{ Nitrógeno}}{L}} = 5.42 \frac{g \text{ Biomasa}}{g \text{ Nitrógeno}}$$

Se utilizó la ecuación 12, se demostró el cálculo con datos obtenidos del Cuadro 16 (ver apartado anexos). De igual manera se calculó este coeficiente de rendimiento para los demás casos.

**Cálculo 3.** Azúcares totales para la fermentación de la producción de polihidroxicanoatos.

$$\begin{aligned} \text{Azúcares totales} &= \frac{(0.016 \text{ g sacarosa} + 0.24 \text{ g glucosa} + 0.021 \text{ g fructosa})}{100 \text{ mL}} \\ &= 2.77^{-3} \frac{g}{mL} \end{aligned}$$

$$\text{Azúcares totales} = (2.77^{-3} \frac{g \text{ azúcares}}{mL}) * \left( \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) * 5 = 13.85 \frac{g \text{ azúcares}}{L}$$

Se utilizaron los datos originales del Cuadro 5 (ver apartado anexos). De igual forma se calculó la cantidad de azúcares totales. Se multiplica por 5 debido al factor de dilución empleado.

**Cálculo 4.** Relación carbono – nitrógeno para la fermentación de la producción de polihidroxialcanoatos empleando el reactor BIOSTAT Aplus.

$$\text{Relación carbono – nitrógeno} = \frac{63 \frac{\text{g Carbono}}{\text{L}}}{0.239 \frac{\text{g Nitrógeno}}{\text{L}}} = 263.60 \frac{\text{g Carbono}}{\text{g Nitrógeno}}$$

Se utilizaron los datos originales del Cuadro 16 (ver apartado anexos). De igual forma se determinó la relación carbono-nitrógeno para los demás casos.

**Cálculo 5.** Determinación de biomasa a partir de peso seco.

$$\begin{aligned} \text{Peso seco} &= 65.8186 \text{ g Biomasa seca con beaker} - 65.8149 \text{ g Beaker} \\ &= 0.0037 \text{ g Biomasa seca} \end{aligned}$$

$$\text{Peso seco} = \frac{0.0037 \text{ g Biomasa seca}}{50 \text{ mL}} * 1000 \text{ mL} = 0.074 \frac{\text{g Biomasa}}{\text{L}}$$

Se utilizaron los datos originales del Cuadro 12 (ver apartado anexos). De igual forma se determinó la biomasa para los demás casos.

**Cálculo 6.** Determinación de polihidroxialcanoatos a partir de peso seco.

$$\text{Peso seco PHA} = 34.5569 \text{ g PHA con beaker} - 34.5513 \text{ g Beaker} = 0.0056 \text{ g PHA}$$

$$\text{Peso seco} = \frac{0.0056 \text{ g PHA seco}}{50 \text{ mL}} * 1000 \text{ mL} = 0.112 \frac{\text{g PHA}}{\text{L}}$$

Se utilizaron los datos originales del Cuadro 5 (ver apartado anexos). De igual forma se determinó el peso seco de PHA para los demás casos.

**Cálculo 7.** Promedio de crecimiento de biomasa para la fermentación en el reactor BioFlo 415 de la producción de polihidroxialcanoatos.

$$X = \frac{(0.084 + 0.074) \frac{\text{g Biomasa}}{\text{L}}}{2} = 0.079 \frac{\text{g Biomasa}}{\text{L}}$$

Se utilizaron los datos originales del Cuadro 17 (ver apartado anexos) y se empleó la ecuación 13. De igual forma se determinó el promedio de crecimiento de biomasa, el consumo de sustrato y la producción de polihidroxicanoatos para los demás casos.

## F. ANÁLISIS DE ERROR

**Ecuación 15.** Propagación de error sumas y restas

$$S_y = \sqrt{(S_a)^2 + (S_b)^2 + (S_c)^2 \dots}$$

Donde:

$S_y$  = Incertidumbre de resultado

$S_{a,b,c}$  = Incertidumbre de cada medida a, b, c, etc.

**Ecuación 16.** Propagación de error para multiplicaciones y divisiones

$$\frac{S_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{S_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{S_c}{c}\right)^2 + \dots}$$

Donde:

$S_y$  = Incertidumbre del resultado (multiplicación/división)

$y$  = Valor del resultado del cálculo

$a, b, c \dots$  = Valor de cada medida

$S_{a,b,c\dots}$  = Incertidumbre de cada medida a, b, c, etc

**Cálculo 8.** Incertidumbre rendimiento de formación de polihidroxicanoatos contra crecimiento bacteriano.

*Incertidumbre peso beakers* =

$$\sqrt{(0.00001)^2 + (0.00001)^2 + (0.00001)^2 + (0.00001)^2 + (0.00001)^2 + (0.00001)^2 + (0.00001)^2 + (0.00001)^2}$$

$$= \pm 2.82 * 10^{-5} \frac{g}{L}$$

$$\text{Incertidumbre peso biomasa y PHA} = \sqrt{(2.82 * 10^{-5})^2 + (2.82 * 10^{-5})^2} = 4 * 10^{-5} \frac{g}{L}$$

$$\begin{aligned} \text{Incertidumbre } Y_{\left(\frac{p}{x}\right)} &= 0.079 \frac{g \text{ PHA}}{g \text{ Biomasa}} * \sqrt{\left(\frac{4 * 10^{-5}}{0.0761}\right)^2 + \left(\frac{4 * 10^{-5}}{0.9603}\right)^2} \\ &= \pm 4.2 * 10^{-5} \frac{g \text{ PHA}}{g \text{ Biomasa}} \end{aligned}$$

Se utilizaron las ecuaciones en conjunto para obtener la incertidumbre final del rendimiento de formación de polihidroxialcanoatos contra crecimiento bacteriano. De igual forma se calculó las incertidumbres para los demás casos.

**Ecuación 17.** Desviación estándar.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i^N (X_i - X)^2}{N}}$$

Donde:

$N$  = Número de observaciones

$X_i$  = Observación número  $i$  de la variable  $X$

$X$  = Media de la variable

$\sigma$  = Desviación estándar

**Cálculo 9.** Desviación estándar de la concentración de biomasa en el tiempo 0 de la fermentación realizada en el reactor BioFlo 415.

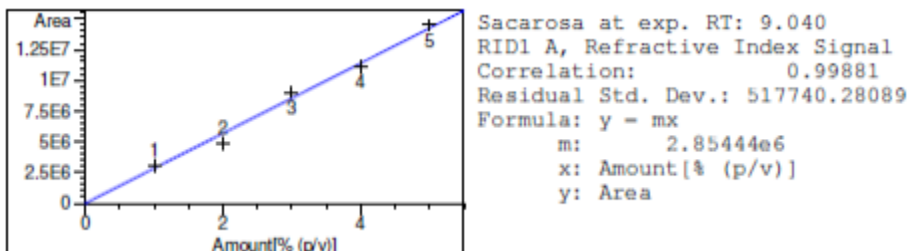
$$\sigma = \sqrt{\frac{(0.074-0.079)^2 + (0.084-0.079)^2}{2}} = \pm 7.07 * 10^{-3} \frac{g}{L}$$

$$\text{Error típico} = 3 * \sigma = \pm 2.12 * 10^{-2} \frac{g}{L}$$

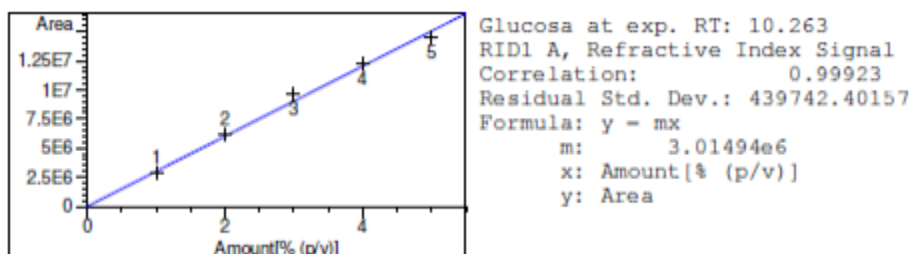
Se utilizaron los valores de los cuadros 17 y 18 de la sección de datos calculados del apartado de apéndice. De igual forma se calculó la desviación estándar y el error típico para los demás casos. Se multiplica por tres la desviación estándar para tener 99.7% de probabilidad de certeza.

## G. CURVAS DE CALIBRACIÓN HPLC

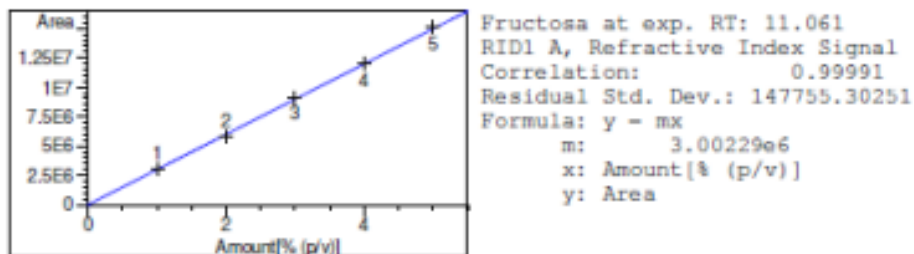
**Figura 32.** Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de sacarosa.



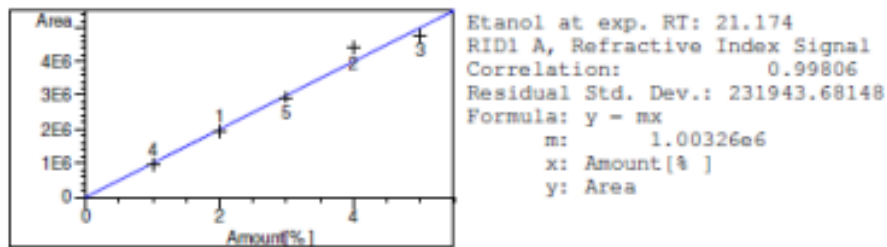
**Figura 33.** Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de glucosa.



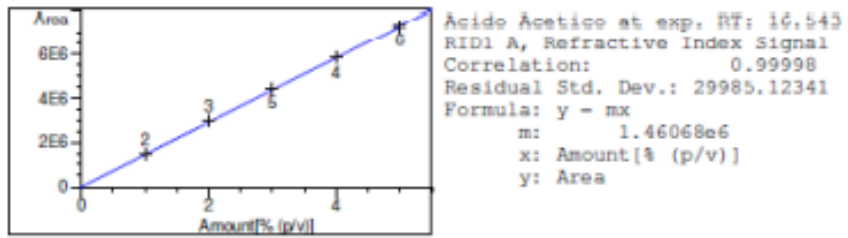
**Figura 34.** Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de fructosa.



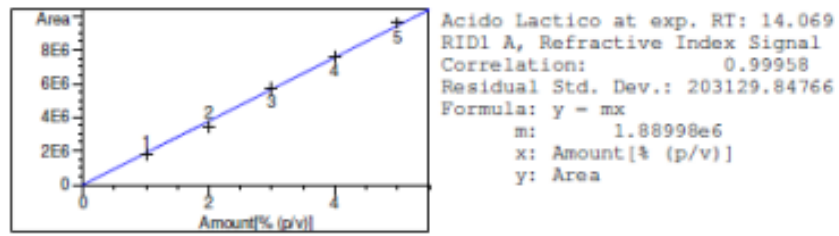
**Figura 35.** Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de etanol.



**Figura 36.** Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de ácido acético.

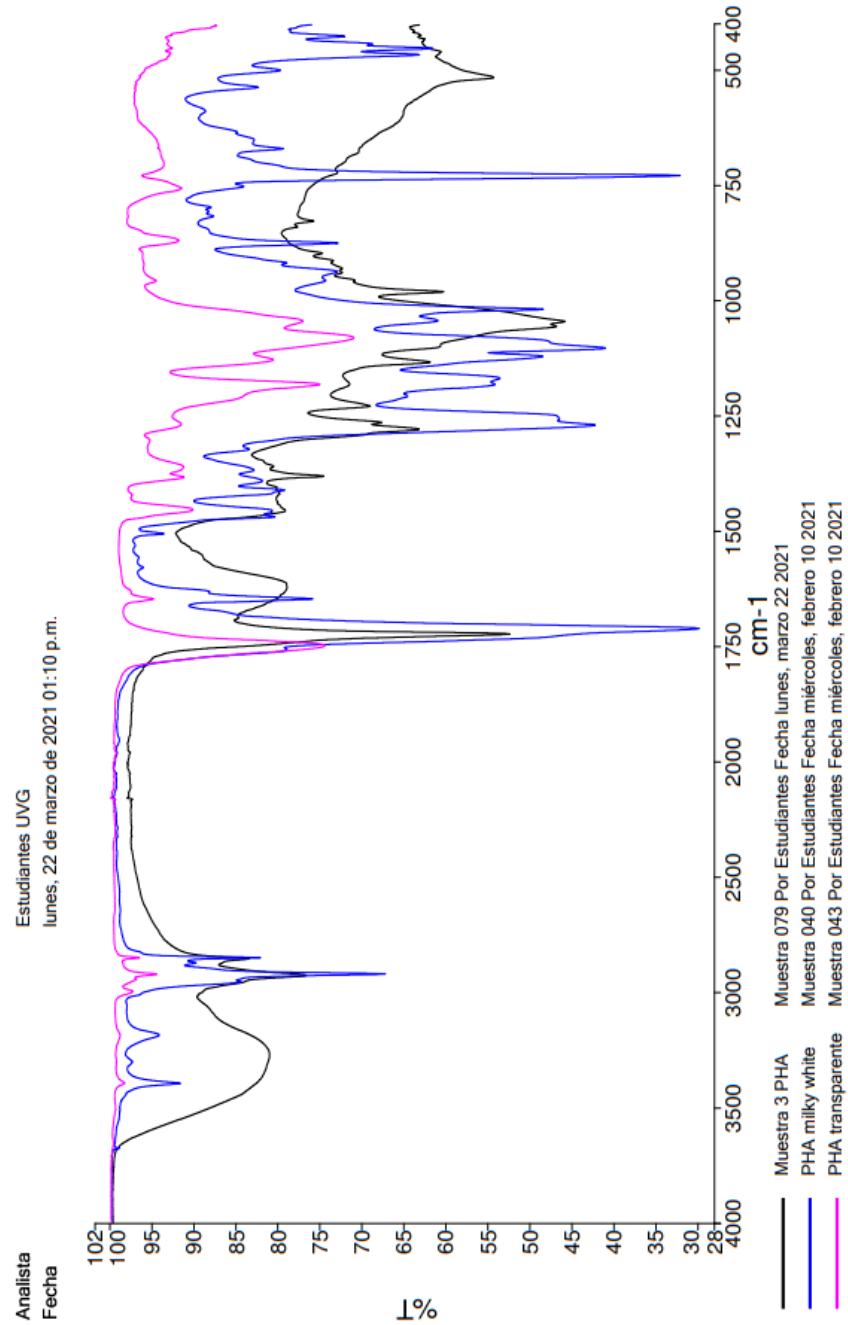


**Figura 37.** Curva de calibración de HPLC para la cuantificación ácido láctico.



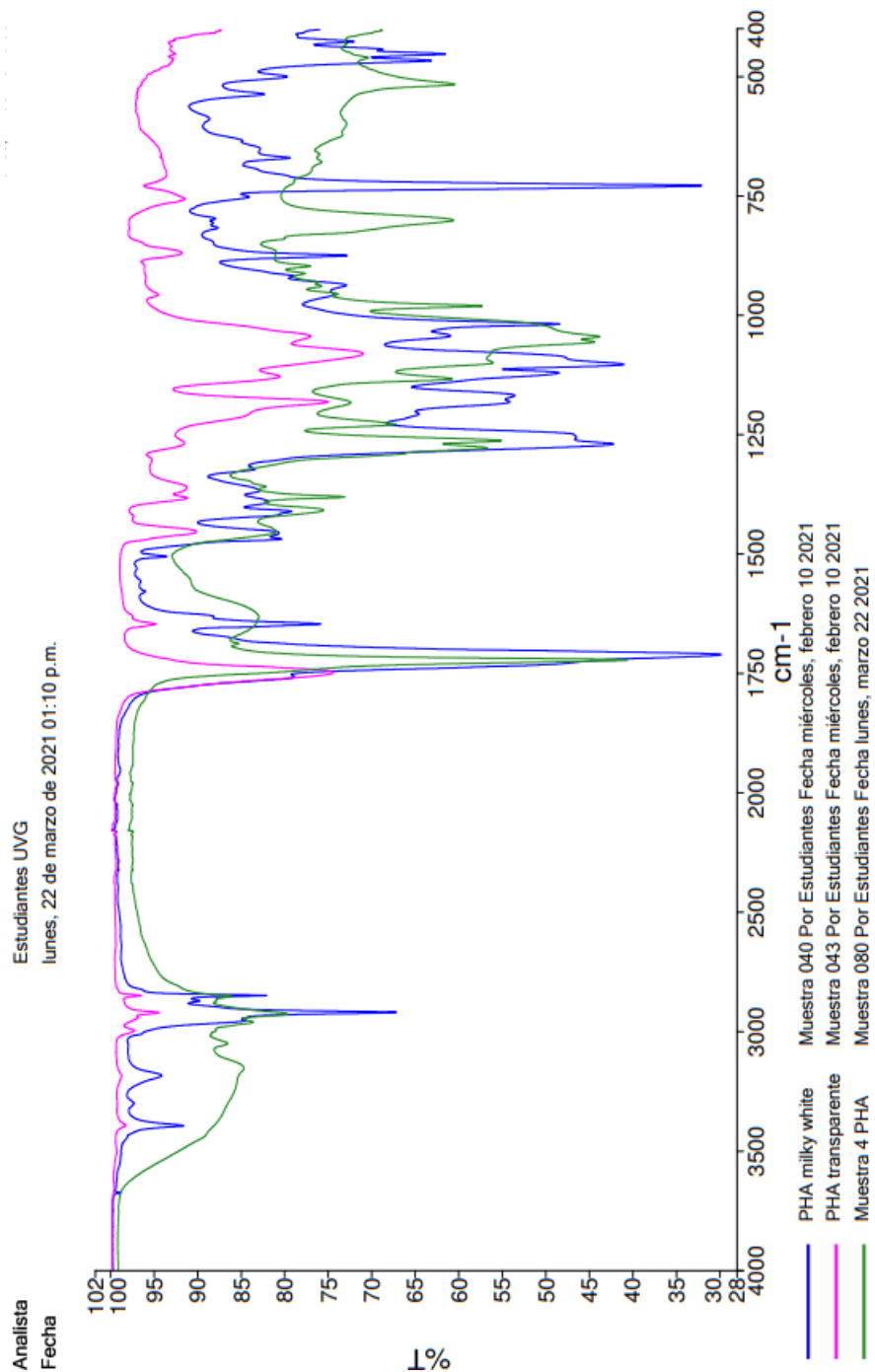
## H. ESPECTROS IR DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

**Figura 38.** Muestra de PHA utilizando sacarosa como sustrato, con una relación 300:1 (m/m) carbono-nitrógeno.



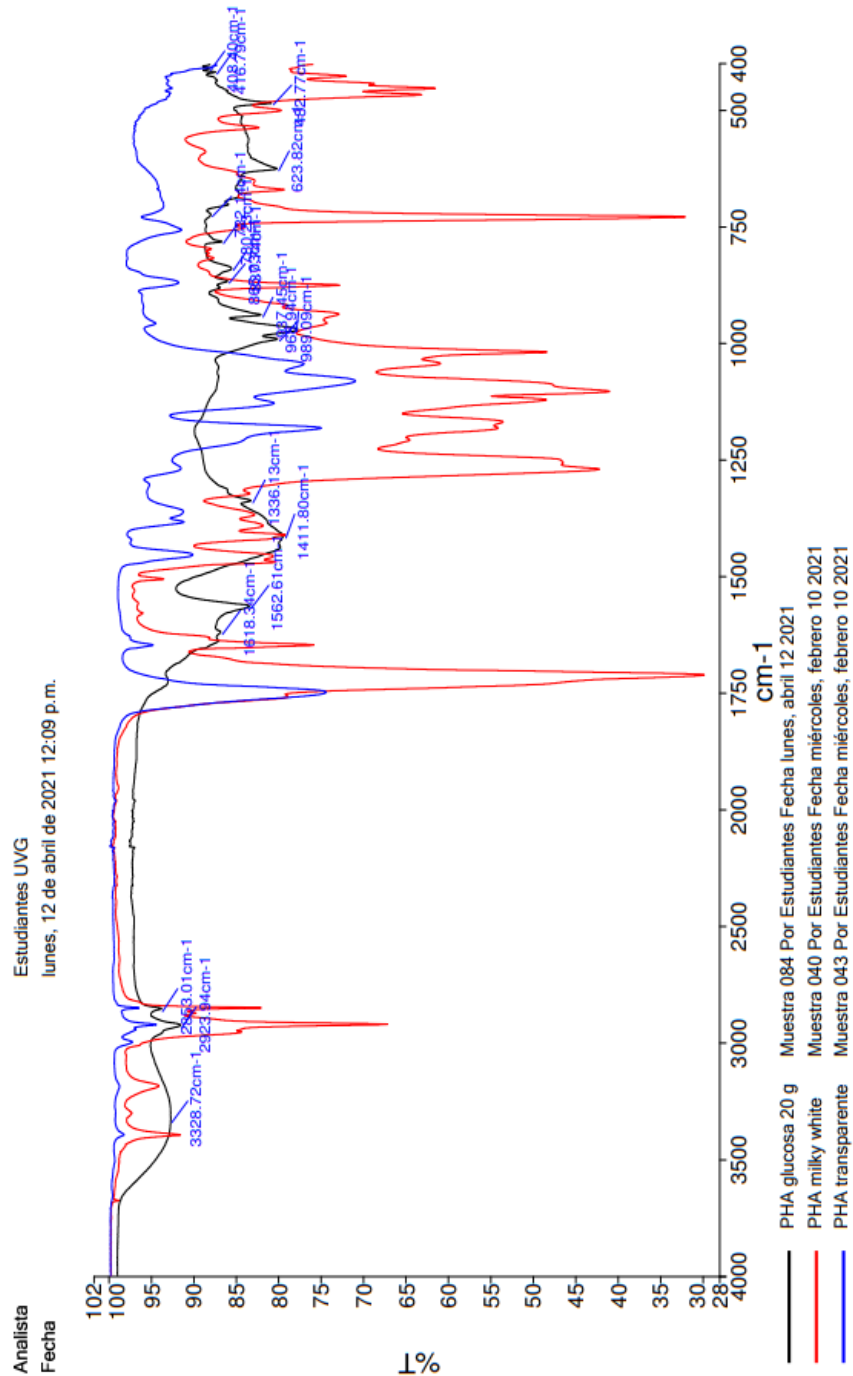
Resultados obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIostat Aplus. Se observa la vibración del enlace carbonilo en el intervalo de 1725-1705  $cm^{-1}$ , la absorción y tensión de los enlaces CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> en alrededor 2962  $cm^{-1}$ ; lo cual es característico de una molécula de PHA.

**Figura 39.** Muestra de PHA utilizando sacarosa como sustrato, con una relación 179:1 (m/m) carbono-nitrógeno.



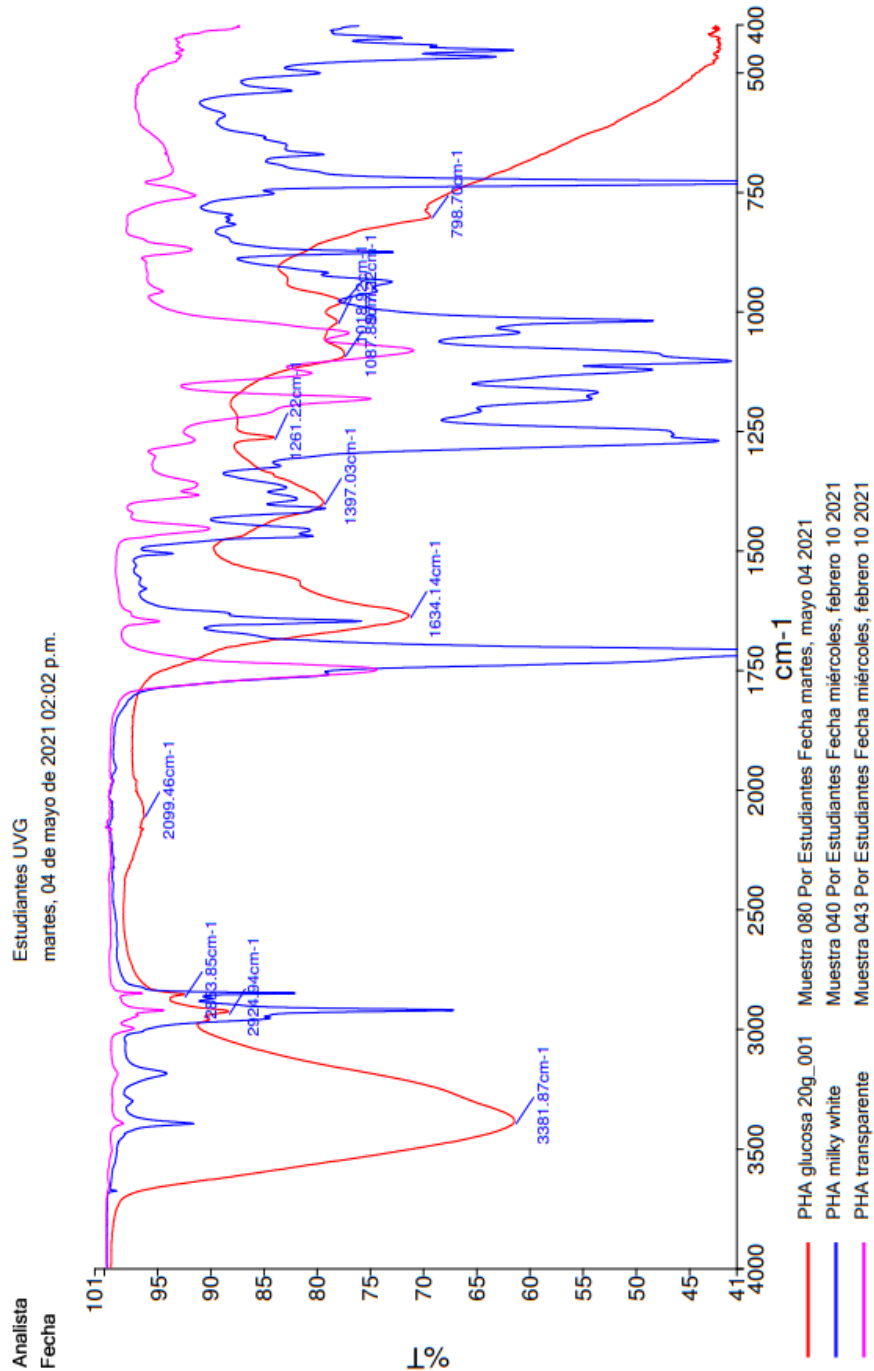
Resultados obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus. Se observa la vibración del enlace carbonilo en el intervalo de 1725-1705  $cm^{-1}$ , la absorción y tensión de los enlaces CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> en alrededor 2962  $cm^{-1}$ ; lo cual es característico de una molécula de PHA.

**Figura 40.** Muestra de PHA utilizando sacarosa como sustrato, con una relación 83:1 (m/m) carbono-nitrógeno.



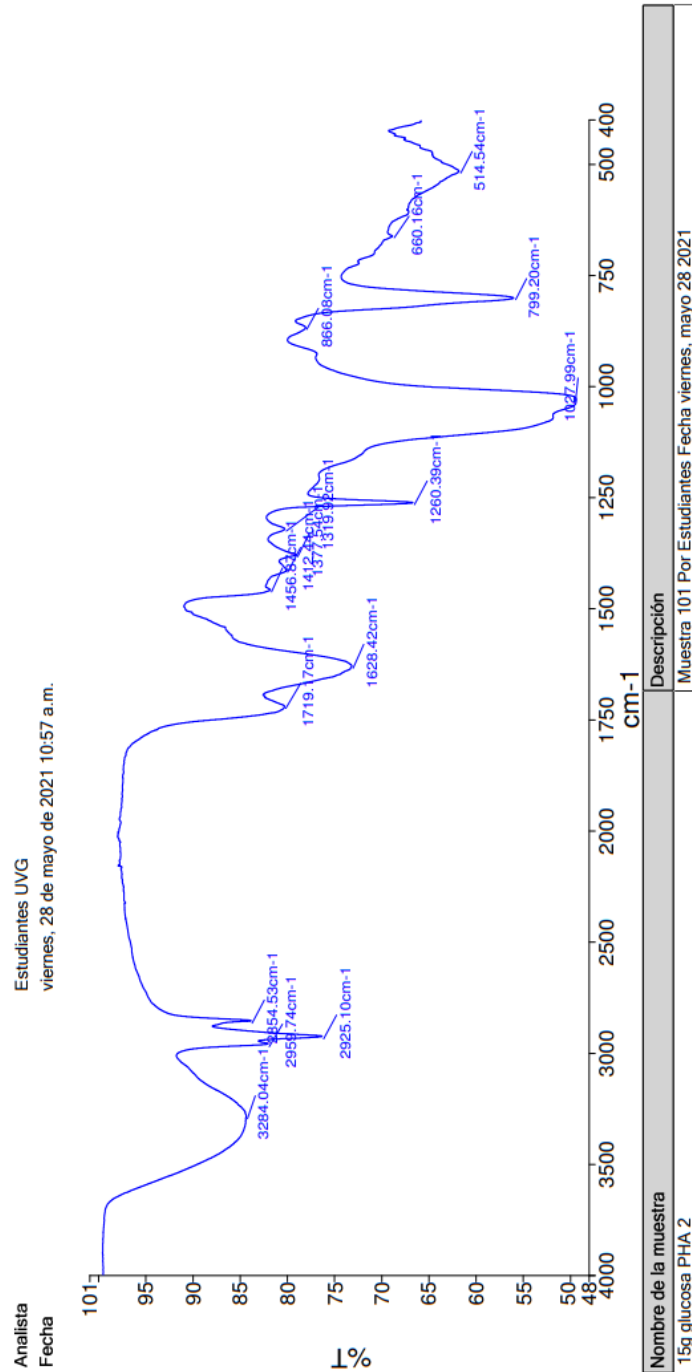
Resultados obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus. No se observa la vibración del enlace carbonilo en el intervalo de 1725-1705  $cm^{-1}$ , pero sí la absorción y tensión de los enlaces CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub>-Ch<sub>2</sub> en alrededor 2962  $cm^{-1}$ ; por lo que esta molécula no es característica de una de PHA.

**Figura 41.** Muestra de PHA utilizando glucosa como sustrato, con una relación 263:1 (m/m) carbono-nitrógeno.



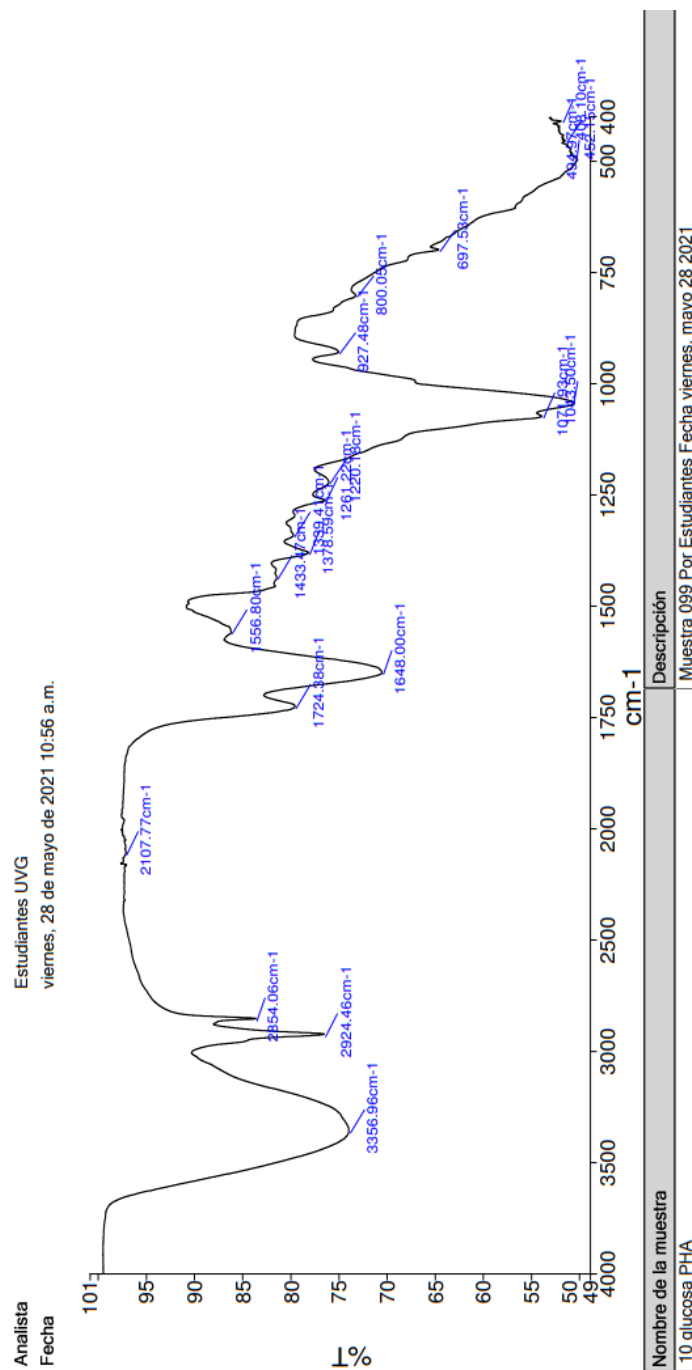
Resultados obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus. No se observa la vibración del enlace carbonilo en el intervalo de 1725-1705  $cm^{-1}$ , pero sí la absorción y tensión de los enlaces CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub>-Ch<sub>2</sub> en alrededor 2962  $cm^{-1}$ ; por lo que esta molécula no es característica de una de PHA.

**Figura 42.** Muestra de PHA utilizando glucosa como sustrato, con una relación 184:1 (m/m) carbono-nitrógeno.



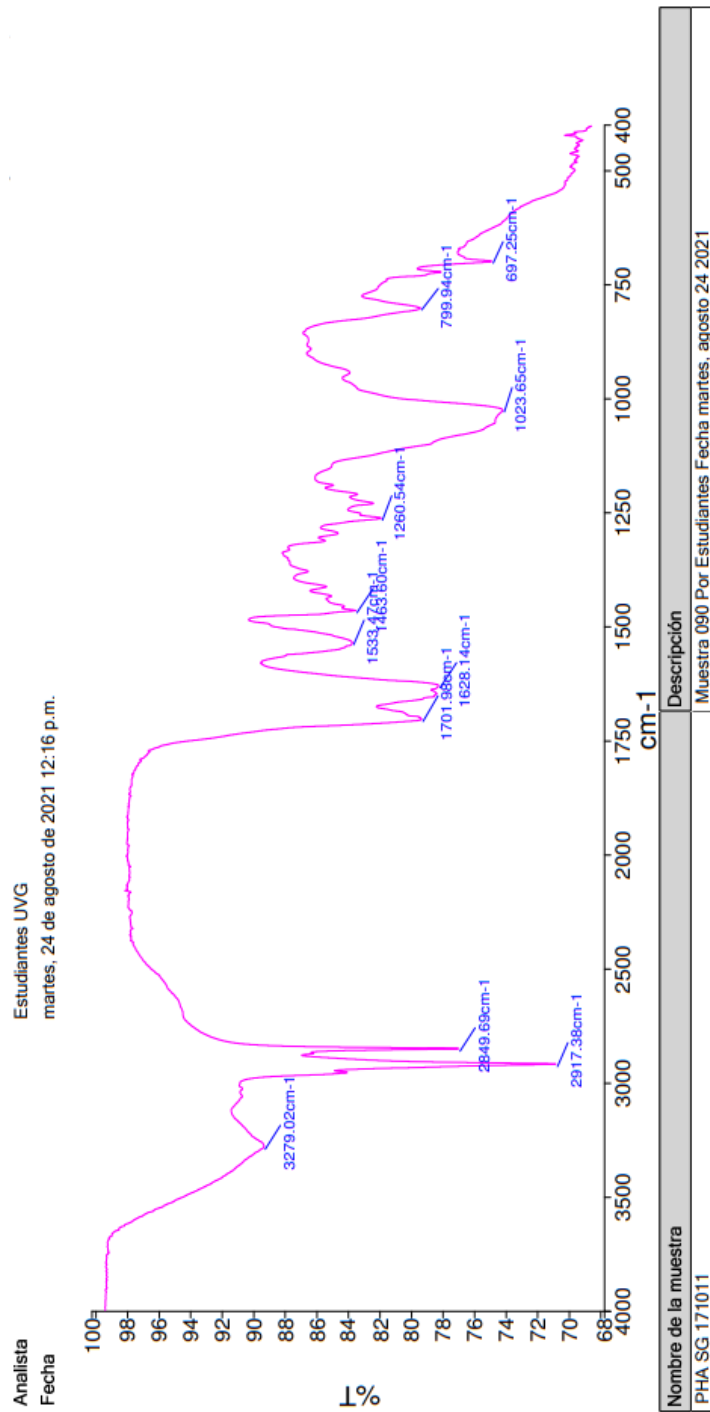
Resultados obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIostat Aplus. Se observa la vibración del enlace carbonilo en el intervalo de 1725-1705  $cm^{-1}$ , la absorción y tensión de los enlaces CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> en alrededor 2962  $cm^{-1}$ ; lo cual es característico de una molécula de PHA.

**Figura 43.** Muestra de PHA utilizando glucosa como sustrato, con una relación 113: 1 (m/m) carbono-nitrógeno.



Resultados obtenidos con tiempo de fermentación de 48h a 37°C y 150rpm en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus. Se observa la vibración del enlace carbonilo en el intervalo de 1725-1705  $cm^{-1}$ , la absorción y tensión de los enlaces CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> en alrededor 2962  $cm^{-1}$ ; lo cual es característico de una molécula de PHA.

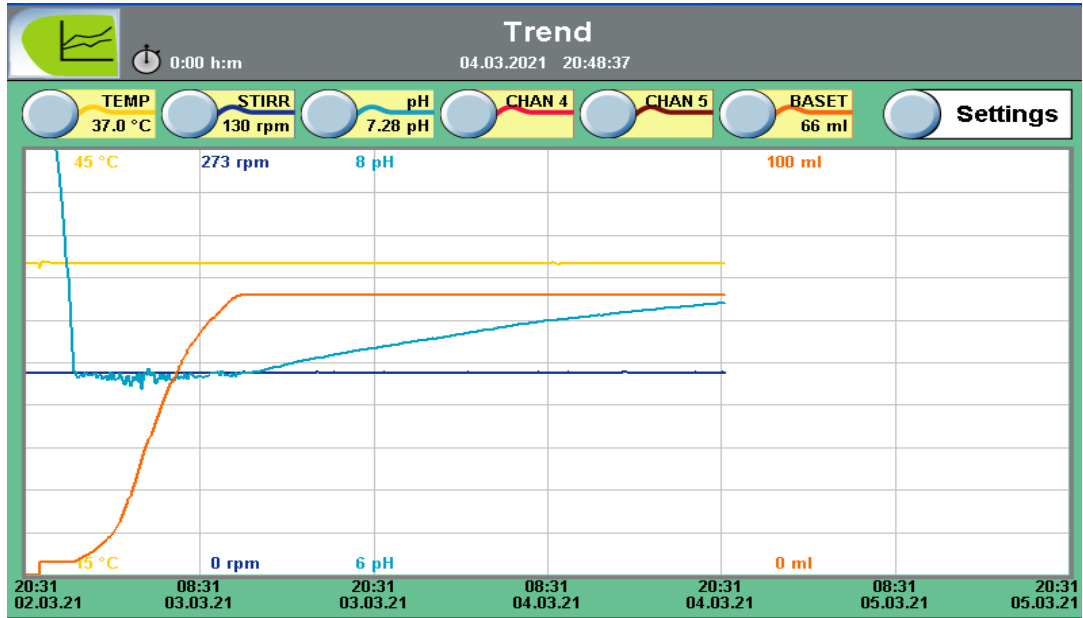
**Figura 44.** Muestra de PHA obtenida de la fermentación utilizando el reactor BioFlo 415.



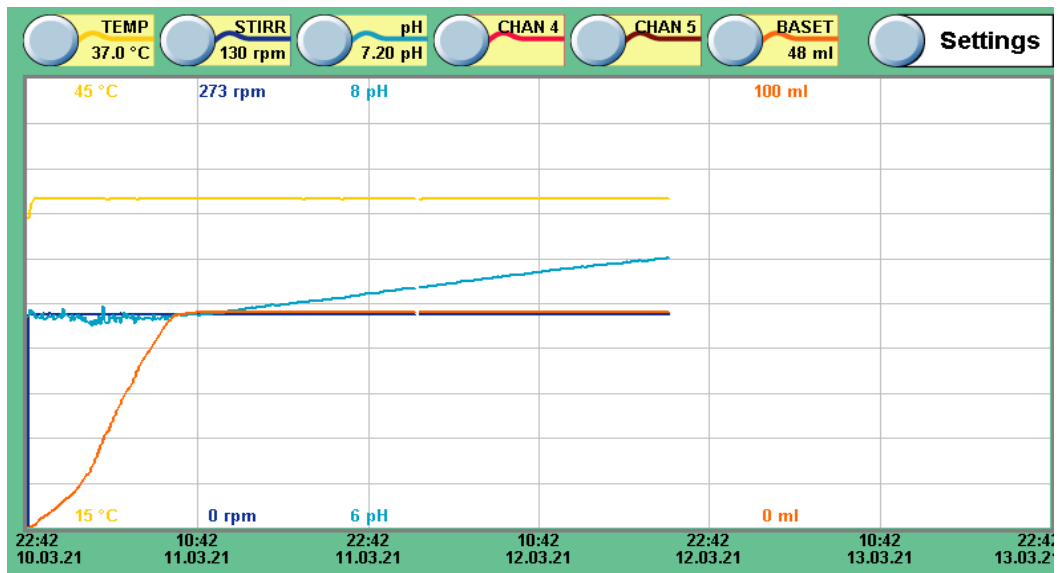
Resultados obtenidos con tiempo de fermentación de 36h a 37°C y 150rpm en reactor BioFlo 415. Se observa la vibración del enlace carbonilo en el intervalo de 1725-1705  $cm^{-1}$ , la absorción y tensión de los enlaces CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> en alrededor 2962  $cm^{-1}$ ; lo cual es característico de una molécula de PHA.

# I. COMPORTAMIENTO DE VARIABLES EN REACTOR BIOSTAT Aplus

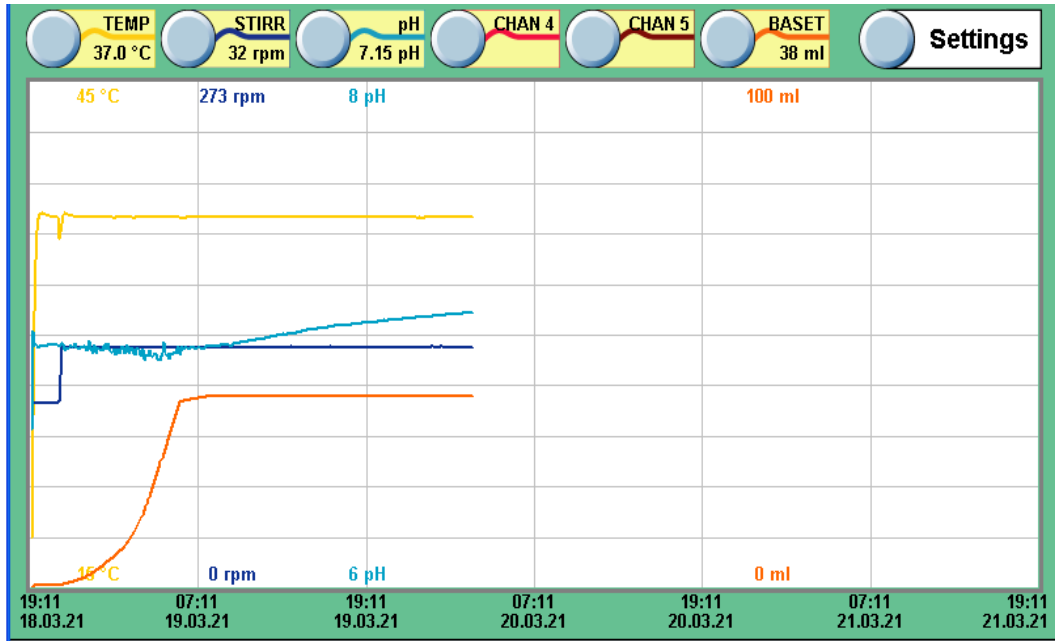
**Figura 45.** Fermentación de *Bacillus subtilis* utilizando 20 g/L de sacarosa para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.



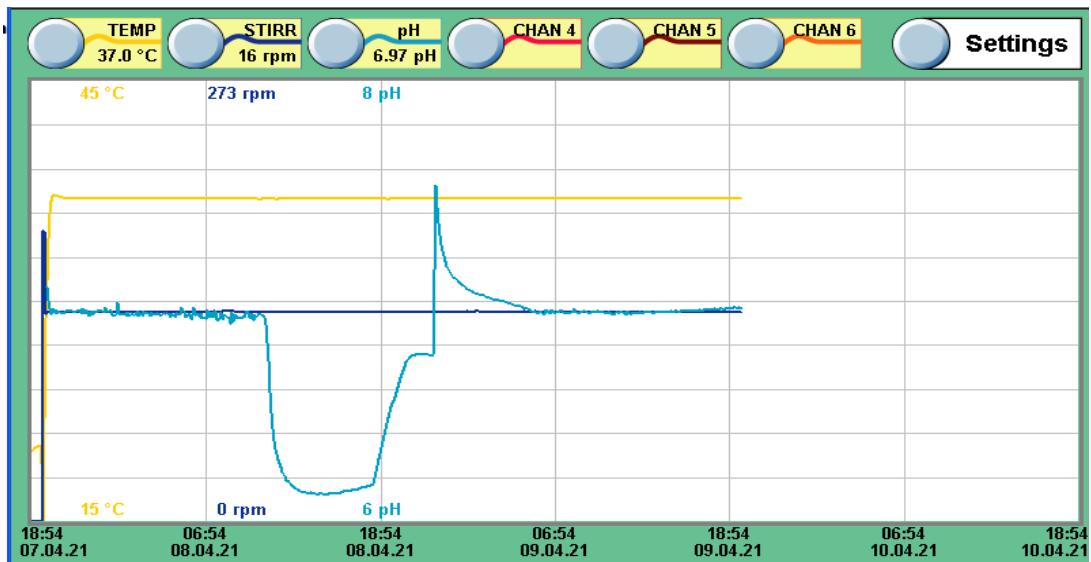
**Figura 46.** Fermentación de *Bacillus subtilis* utilizando 15 g/L de sacarosa para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.



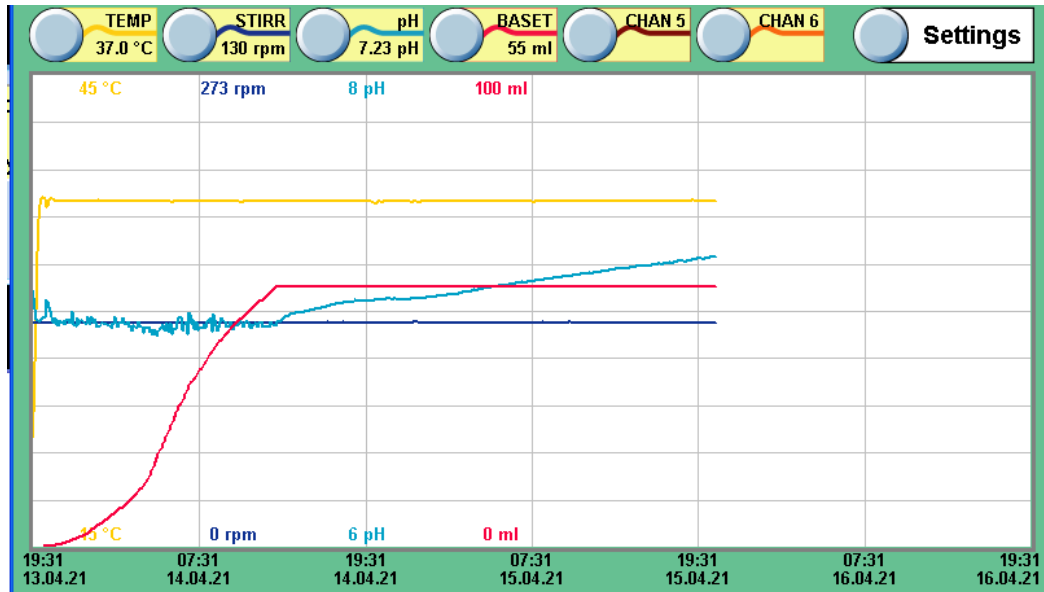
**Figura 47.** Fermentación de *Bacillus subtilis* utilizando 10 g/L de sacarosa para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.



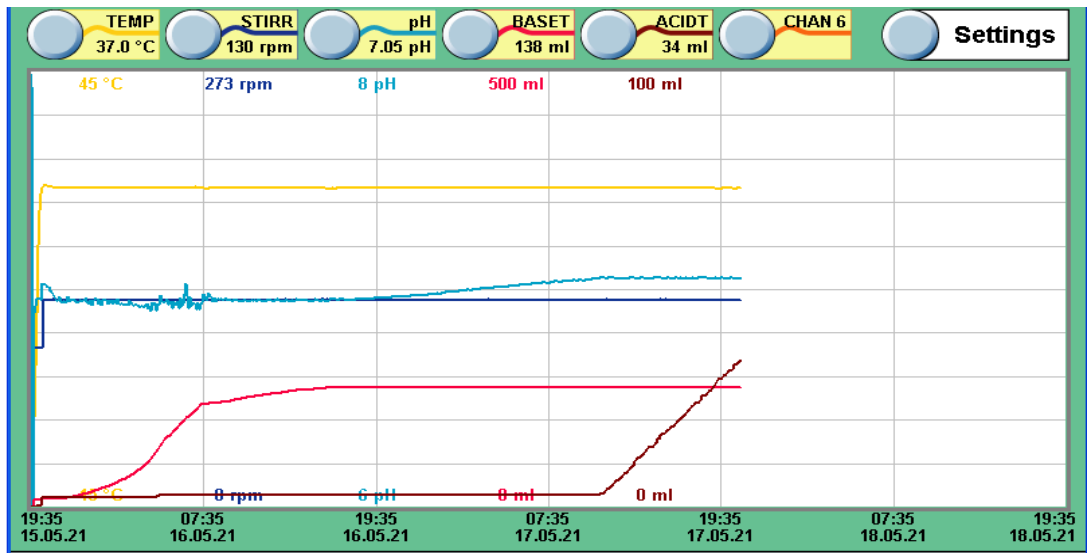
**Figura 48.** Fermentación de *Bacillus subtilis* utilizando 20 g/L de sacarosa invertida para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIOSTAT Aplus.



**Figura 49.** Fermentación de *Bacillus subtilis* utilizando 15 g/L de sacarosa invertida para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIostat Aplus.



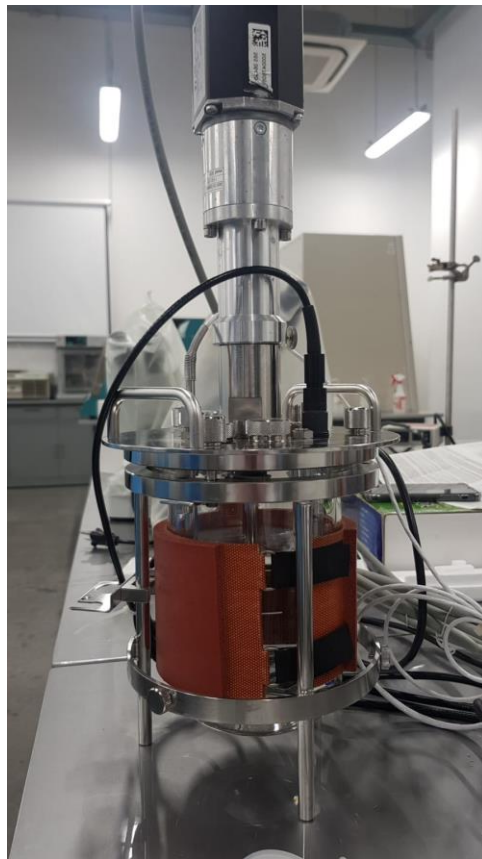
**Figura 50.** Fermentación de *Bacillus subtilis* utilizando 10 g/L de sacarosa invertida para la producción de polihidroxicanoatos en reactor SARTORIUS BIostat Aplus.



**Figura 51.** Fermentación de *Bacillus subtilis* en Reactor BioFlo415.



**Figura 52.** Fermentación de *Bacillus subtilis* en reactor SARTORIUS BIostat Aplus.



**Figura 53.** Purificación de polihidroxicanoatos utilizando cloroformo e hipoclorito de sodio.

