
Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos a partir de la fermentación de suero de leche a escala laboratorio

Alejandra Mariela Camposeco Zea



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



**Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos
a partir de la fermentación de suero de leche a escala
laboratorio**

Trabajo de graduación presentado por Alejandra Mariela Camposeco
Zea para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en
Biotecnología Industrial

Guatemala,
2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería

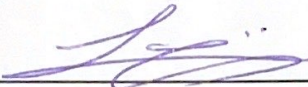


**Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos
a partir de la fermentación de suero de leche a escala
laboratorio**


Trabajo de graduación presentado por Alejandra Mariela Camposeco
Zea para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en
Biotecnología Industrial

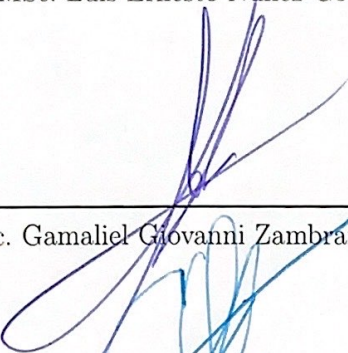
Guatemala,
2021

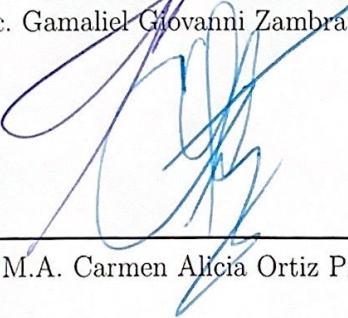
Vo.Bo.:

(f) 
Ing. MSc. Luis Ernesto Núñez González

Tribunal Examinador:

(f) 
Ing. MSc. Luis Ernesto Núñez González

(f) 
Ing. MSc. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano

(f) 
Ing. M.A. Carmen Alicia Ortiz Pineda

Fecha de aprobación: Guatemala, 16 de diciembre de 2021.

Dedicatoria

En este trabajo de graduación se resumen 5 años de dedicación, esfuerzo y aprendizaje tanto personal como académico, en el que pude reflejar las habilidades que he adquirido durante mis años de estudio, principalmente la investigación, una herramienta que será fundamental para mi futuro como mujer en la ciencia.

Dedico este trabajo a mis padres, Nidia y Alejandro, quienes son los principales promotores de mi formación. Gracias por darme uno de los mejores regalos que pude haber recibido: mi educación; por su amor incondicional y por creer en mí en todo momento. Son mi mayor inspiración.

Gracias mamá por enseñarme a ser fuerte y determinada, por creer que soy capaz de lograr incluso lo que veo imposible y por enseñarme a soñar en grande.

Gracias papá por enseñarme a ser resiliente y a trabajar por lo que quiero y por el esfuerzo que haz hecho por mí durante estos años.

A mi hermana, Allyson, porque tu valentía abrió mi camino para llegar hasta aquí. Gracias por tu apoyo incondicional, por tu paciencia y por guiarme cuando más lo necesito.

A mis compañeros de cuatro patas, Lulu, Mia y Clifford, que me han acompañado incondicionalmente y han sido rayitos de luz en mi vida.

A mis amigos, porque su compañía y cariño hicieron de estos años una experiencia tan especial. Gracias por acompañarme, motivarme y alegrarme cuando más lo necesitaba. Son y serán siempre una parte muy importante de mi vida.

A mi asesor, Ing. Luis Ernesto Núñez, por su acompañamiento, apoyo y tiempo dedicado a mi aprendizaje.

A mi director de carrera, Ing. Gamaliel Zambrano, por su atención y apoyo durante los años de carrera. Gracias por su confianza, por su aprecio y por darme las herramientas necesarias para alcanzar este logro.

A mis catedráticos y demás personas que formaron parte de mis estudios, por su dedicación, enseñanzas y aprecio, que permitieron mi formación como profesional.

Finalmente, agradezco a quienes han formado parte de mi crecimiento. A mi familia y a mis ángeles, que sé que velaron por mí en todo momento y me dieron las fuerzas cuando más lo necesitaba. Y a Dios y la Virgen María, cuya compañía y bendición me permitieron llegar hasta aquí.

Prefacio	v
Lista de figuras	x
Lista de cuadros	xv
Resumen	xvi
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III. Justificación	5
IV. Objetivos	7
A. Objetivo general	7
B. Objetivos específicos	7
V. Marco teórico	8
A. Polímeros y biopolímeros	8
B. Polihidroxialcanoatos (PHA) y sus características	10
C. Síntesis de PHA en <i>Bacillus</i> spp.	11
D. Aplicaciones de los PHA	12
E. Industria láctea y lactosa en suero de leche como materia prima	13
F. Estequiometría de la fermentación de PHA	15
G. Cinética de las fermentaciones microbianas	17
H. Reactor tipo SRT	20
I. Análisis químico	21
1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	21
2. Espectroscopía infrarroja (IR)	22
VI. Metodología	23
A. Obtención de suero de leche	23
B. Evaluación de propiedades del suero de leche	24

C. Preparación de cepas bacterianas y medios de cultivo	24
D. Preparación de inóculos de bacterias en caldo nutritivo y suero de leche	25
E. Determinación de las condiciones de fermentación a 80 mL	25
F. Fermentación de suero de leche en bioreactor a escala 10 L	27
G. Determinación del balance de masa de la fermentación	28
H. Extracción y cuantificación de biomasa y PHA producido	28
I. Análisis de muestras	29
J. Planteamiento del modelo cinético en Berkeley Madonna®	30
VII. Resultados	33
VIII. Discusión de resultados	42
IX. Conclusiones	54
X. Recomendaciones	55
XI. Referencias	56
XII. Anexos	59
A. Figuras	59
B. Datos originales y calculados	75
C. Cálculos de muestra	95
A. Ecuaciones	95
1. Ecuaciones generales	95
2. Análisis estadístico y de error	99
B. Cálculos	101
D. Análisis de error	107
E. Materiales y equipo	109
A. Datos de placa	109
B. Fichas técnicas	114

Lista de figuras

1. Formación de gránulos intracelulares de PHB en <i>Ralstonia eutropha</i>	9
2. Estructura química de los principales PHA	10
3. Propiedades físicas de los PHA en comparación con polipropileno, un polímero convencional	10
4. Ruta sintética del polihidroxibutirato	11
5. Ejemplos de aplicaciones de PHA en distintas áreas	12
6. Metabolismo de lactosa en una célula bacteriana	14
7. Curva de crecimiento respecto a la concentración de células (C_n) en el tiempo (t). Se observan las fases de (A) retardo, (B) aceleración, (C) exponencial, (D) desaceleración, (E) estacionaria y (F) de muerte celular	18
8. Dependencia de la tasa específica de crecimiento en la concentración del sustrato limitante	19
9. Esquema de un reactor agitado (STR)	21
10. Absorciones características del espectro IR de grupos funcionales	22
11. Espectro infrarrojo del producto de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 37°C y 200 rpm a escala de 10 L y razón molar C:N de 15:1 para la evaluación de la producción de PHA con referencia a los estándares comerciales.	34
12. Efecto de la proporción de volumen de inóculo en % v/v y el tipo de suero de leche en los valores promedio de (A) la concentración de producto en g/L, (B) el rendimiento de biomasa respecto al sustrato Y_{XS} , (C) el rendimiento de producto con respecto a la biomasa, Y_{PX} y (D) el rendimiento de producto con respecto al sustrato Y_{PS} en la fermentación de lactosa en suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA.	35
13. Efecto de la relación molar de carbono y nitrógeno y el tipo de suero de leche en los valores promedio de (A) la concentración de producto en g/L, (B) el rendimiento de biomasa respecto al sustrato Y_{XS} , (C) el rendimiento de producto con respecto a la biomasa, Y_{PX} y (D) el rendimiento de producto con respecto al sustrato Y_{PS} en la fermentación de lactosa en suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA.	36

14.	Balance de masa global de la fermentación de lactosa en suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a escala de 10 L durante 72 h a pH 7.1, 37°C y 200 rpm, con una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v) y a presión atmosférica de 0.844 atm.	37
15.	Balance de materia con las especies indicativas de la ecuación estequiométrica que representa la fermentación de lactosa en suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a escala de 10 L durante 72 h a pH 7.1, 37°C y 200 rpm, con una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v) y a presión atmosférica de 0.844 atm.	38
16.	Ajuste de datos experimentales para la determinación de parámetros de modelo cinético de la fermentación de lactosa en suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a una razón molar de carbono:nitrógeno de 15:1 en el software Berkeley Madonna®.	41
17.	Espectro infrarrojo del producto de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la proporción de volumen de inóculo en la producción de PHA con urea como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 1% (v/v), (C) 5% (v/v) y (E) 10% (v/v) y en suero cocido a (B) 1% (v/v), (D) 5% (v/v) y (F) 10% (v/v).	59
18.	Espectro infrarrojo del producto de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la proporción de volumen de inóculo en la producción de PHA con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 1% (v/v), (C) 5% (v/v) y (E) 10% (v/v) y en suero cocido a (B) 1% (v/v), (D) 5% (v/v) y (F) 10% (v/v).	61
19.	Espectro infrarrojo del producto de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la relación molar C:N en la producción de PHA con urea como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 10:1, (C) 15:1 y (E) 20:1 y en suero cocido a (B) 10:1 (D) 15:1 y (F) 20:1.	63
20.	Espectro infrarrojo del producto de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la relación molar C:N en la producción de PHA con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 10:1, (C) 15:1 y (E) 20:1 y en suero cocido a (B) 10:1 (D) 15:1 y (F) 20:1.	65
21.	Curva de consumo de sustratos (lactosa y nitrógeno) y generación de biomasa y producto durante la fermentación de suero de leche cocido por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a una razón molar de carbono/ nitrógeno 15:1 a escala de 10 L, a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, con urea como fuente de nitrógeno y una proporción de volumen de inóculo del 5% (v/v), y a presión atmosférica de 0.844 atm.	67
22.	Curva de velocidades de reacción de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de producto respecto al tiempo de la fermentación de lactosa en suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a una razón molar de carbono/nitrógeno de 15:1. Los datos se obtuvieron a una escala de 10 L a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, utilizando urea como fuente de nitrógeno y una proporción de volumen de inóculo del 5% (v/v). Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.	68

23. Curva de calibración para la cuantificación de ácido láctico mediante HPLC en% (p/v)	69
24. Curva de calibración para la cuantificación de etanol mediante HPLC en% (p/v)	69
25. Curva de calibración para la cuantificación de lactosa mediante HPLC en% (p/v)	70
26. Cromatograma de la cuantificación de lactosa en una muestra de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i>	70
27. Fermentaciones de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 80 mL para evaluación de efecto de relación molar C:N en el rendimiento de PHA durante 48 h a pH 7.1, 37°C y 200 rpm y a presión atmosférica de 0.844 atm.	71
28. Reactor New Brunswick Scientific BioFlo 415 del Centro de Procesos Industriales del Departamento de Ingeniería Química utilizado para la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a escala de 10L a razón molar C:N de 15:1 a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm y a presión atmosférica de 0.844 atm.	71
29. Muestra de 50 mL tomada de la fermentación de suero de leche cocido por <i>B. subtilis</i> a escala de 10L a razón molar C:N de 15:1, a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm y a presión atmosférica de 0.844 atm.	72
30. Determinación del peso seco de biomasa de <i>B. subtilis</i> producida durante la fermentación de suero de leche para la producción de PHA en la balanza analítica OHAUS Pioneer del Laboratorio de Operaciones Unitarias.	72
31. Determinación del peso seco de PHA producido durante la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> en la balanza analítica OHAUS Pioneer del Laboratorio de Operaciones Unitarias.	73
32. Espectrofotómetro FT-IR PerkinElmer Frontier del Laboratorio de Analítica Instrumental Avanzada utilizado para la obtención de los espectros IR de los productos de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i>	73
33. Cromatógrafo de alta resolución del Laboratorio de Analítica Instrumental Avanzada utilizado para la cuantificación de lactosa, etanol y ácido láctico de las muestras de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i>	74
34. Colorímetro HACH del Centro de Procesos Industriales del Departamento de Ingeniería Química utilizado para la cuantificación de nitrógeno y fosfatos de las muestras de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i>	74

Lista de cuadros

1.	Propiedades evaluadas del suero de leche respecto al pH y concentraciones de lactosa, nitrógeno y fosfatos a utilizar en las fermentaciones por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA.	33
2.	Identificación de grupos funcionales en la estructura del producto de fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 37°C y 200 rpm a escala de 10 L y razón molar C:N de 15:1 a partir de las señales características del espectro IR para la evaluación de la producción de PHA	33
3.	Rendimientos promedio de formación de biomasa, producto y subproductos respecto al consumo de lactosa, Y_L y glucosa Y_G en la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA	37
4.	Descripción de los parámetros del modelo cinético obtenidos del ajuste de datos experimentales por el software Berkeley Madonna para la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a una razón molar C:N 15:1	40
5.	Identificación de grupos funcionales en la estructura del producto de fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la proporción de volumen de inóculo en la producción de PHA con urea como fuente de nitrógeno en suero crudo y cocido (Figura 17).	60
6.	Identificación de grupos funcionales en la estructura del producto de fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la proporción de volumen de inóculo en la producción de PHA con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en suero crudo y cocido (Figura 18).	62
7.	Identificación de grupos funcionales en la estructura del producto de fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la relación molar C:N en la producción de PHA con urea como fuente de nitrógeno en suero crudo y cocido (Figura 19).	64

8.	Identificación de grupos funcionales en la estructura del producto de fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la relación molar C:N en la producción de PHA con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en suero crudo y cocido (Figura 20).	66
9.	Composición de la solución de fermentación a volumen final de 80 mL para la determinación del efecto de la proporción de volumen de inóculo en la generación de PHA a partir de suero de leche crudo y cocido por <i>B. subtilis</i> evaluando dos fuentes de nitrógeno.	75
10.	Composición de la solución de fermentación a volumen final de 80 mL para la determinación del efecto de la relación molar C:N en la generación de PHA a partir de suero de leche crudo por <i>B. subtilis</i> evaluando dos fuentes de nitrógeno.	75
11.	Composición de la solución de fermentación a volumen final de 80 mL para la determinación del efecto de la relación molar C:N en la generación de PHA a partir de suero de leche cocido por <i>B. subtilis</i> evaluando dos fuentes de nitrógeno.	76
12.	Conteos celulares de inóculos de caldo nutritivo y suero de leche crudo y cocido para pruebas a escala de 80 mL de la fermentación de lactosa por <i>B.subtilis</i> mediante el método de Neubauer.	76
13.	Conteos celulares de inóculos de caldo nutritivo y suero de leche cocido para pruebas a escala de 10 L de la fermentación de lactosa por <i>B.subtilis</i> mediante el método de Neubauer.	77
14.	Datos originales de la cuantificación de la concentración de lactosa, nitrógeno y fosfatos en el suero de leche para fermentaciones por <i>B.subtilis</i> para la producción de PHA.	77
15.	Cuantificación de lactosa por HPLC y de biomasa y el producto en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la proporción de volumen de inóculo en la fermentación de lactosa por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA.	78
16.	Cuantificación de lactosa por HPLC y de biomasa y el producto en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto la relación molar de carbono y nitrógeno en la fermentación de lactosa por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA.	79
17.	Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y concentración de producto en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la proporción de volumen de inóculo en la fermentación de lactosa por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA.	80
18.	Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y concentración de producto en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la relación molar de carbono y nitrógeno en la fermentación de lactosa por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA.	81
19.	Rendimientos de biomasa con respecto al sustrato (Y_{xs}) y de producto con respecto a la biomasa (Y_{px}) y al sustrato (Y_{ps}) en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la proporción de volumen de inóculo en la fermentación de lactosa por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA.	82

20.	Rendimientos de biomasa con respecto al sustrato (Y_{xs}) y de producto con respecto a la biomasa (Y_{px}) y al sustrato (Y_{ps}) en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la relación molar de carbono y nitrógeno en la fermentación de lactosa por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA.	83
21.	Rendimientos promedio de biomasa con respecto al sustrato y de producto con respecto a la biomasa, al sustrato y concentración en g/L de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la proporción de volumen de inóculo en la fermentación de lactosa por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA.	84
22.	Rendimientos promedio de biomasa con respecto al sustrato y de producto con respecto a la biomasa, al sustrato y concentración en g/L de pruebas a escala de 80 mL para evaluar la relación molar de carbono y nitrógeno en la fermentación de lactosa por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA.	84
23.	Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias de las pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la proporción de volumen de inóculo en la fermentación de lactosa por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA con significancia de 0.05.	85
24.	Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias de las pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la relación molar de carbono y nitrógeno en la fermentación de lactosa por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA con significancia de 0.05.	85
25.	Mediciones en duplicado de las concentraciones inicial y final de componentes de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA.	86
26.	Concentraciones inicial y final en duplicado de componentes de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para producción de PHA.	86
27.	inicial y final promedio de componentes de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA y cambio en su concentración según el consumo o formación durante la reacción.	87
28.	Coefficientes exactos de la fórmula estequiométrica de <i>B. subtilis</i> producto de la fermentación de suero de leche para la generación intracelular de PHA obtenidos de la ecuación estequiométrica representativa de la fermentación.	87
29.	Coefficientes exactos de la ecuación estequiométrica de la fermentación de suero de leche en <i>B. subtilis</i> utilizando glucosa hidrolizada de lactosa para la producción intracelular de PHA obtenidos a partir de los rendimientos de consumo de sustratos y generación de biomasa y productos.	88
30.	Medición de la concentración de nitrógeno en duplicado durante la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA.	88
31.	Medición de la concentración de nitrógeno en duplicado y valor promedio obtenido durante la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA.	88
32.	Cuantificación de lactosa por HPLC y de la masa de biomasa y el producto de la primera corrida de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.	89
33.	Cuantificación de lactosa por HPLC y de la masa de biomasa y el producto de la segunda corrida de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.	90

34. Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y rendimiento del producto de la primera corrida de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.	91
35. Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y rendimiento del producto de la segunda corrida de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.	92
36. Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y rendimiento del producto como media aritmética del duplicado de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.	93
37. Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y rendimiento del producto como media móvil del duplicado de la fermentación de suero de leche por <i>B. subtilis</i> para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.	94
38. Especificaciones de cámara de Neubauer BRAND del Centro de Procesos Industriales del Departamento de Ingeniería Química	109
39. Especificaciones de incubadora Lab-Line del Laboratorio de Procesos Bioindustriales del Centro de Investigación y Tecnología	109
40. Especificaciones de refrigeradora Mabe del Laboratorio de Procesos Bioindustriales	110
41. Especificaciones de potenciómetro con electrodo OHAUS del Centro de Procesos Industriales	110
42. Especificaciones de autoclave NAPCO del Laboratorio de Procesos Bioindustriales	110
43. Especificaciones de centrífuga Eppendorf del Laboratorio de Procesos Bioindustriales	111
44. Especificaciones de centrífuga Sorvall® del Laboratorio de Procesos Bioindustriales	111
45. Especificaciones de colorímetro HACH® del Centro de Procesos Industriales	111
46. Especificaciones de reactor digital HACH® del Centro de Procesos Industriales	112
47. Especificaciones de cromatógrafo de alta resolución Agilent Technologies del Laboratorio de Analítica Instrumental Avanzada	112
48. Especificaciones de incubadora con agitación New Brunswick Scientific del Laboratorio de Procesos Bioindustriales	112
49. Especificaciones de microscopio Fisher Scientific del Laboratorio de Procesos Bioindustriales	112
50. Especificaciones de balanza analítica OHAUS Pioneer del Laboratorio de Operaciones Unitarias	113
51. Especificaciones de balanza OHAUS del Laboratorio de Operaciones Unitarias	113
52. Especificaciones de horno de convección VWR® del Laboratorio de Procesos Bioindustriales	113
53. Especificaciones de espectrofotómetro FT-IR PerkinElmer Frontier del Laboratorio de Analítica Instrumental Avanzada	113
54. Especificaciones de biorreactor BioFlo 415 New Brunswick Scientific del Centro de Procesos Industriales	114

55. Especificaciones de micropipetas Eppendorf del Centro de Procesos Industriales	114
56. Especificaciones de caldo nutritivo	114
57. Especificaciones de agar nutritivo	115
58. Especificaciones de sulfato de amonio	115
59. Especificaciones de urea	115
60. Especificaciones de fosfato de disodio	116
61. Especificaciones de azul de tripán	116
62. Especificaciones de hidróxido de sodio	116
63. Especificaciones de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	116

La generación de biopolímeros ha sido una práctica creciente en las últimas décadas debido a la necesidad de la producción sostenible y de bajo impacto ambiental. Se han evaluado distintas materias ricas en carbono que propicien las condiciones necesarias para la síntesis de polihidroxialcanoatos (PHA), un tipo de biopolímeros generado por una gran variedad de microorganismos en condiciones de estrés metabólico. Sin embargo, los costos de producción suelen ser altos, por lo que se evalúa la utilización de residuos industriales ricos en carbono como materia prima. Con base en esto, en el presente trabajo se evaluó la producción de PHA por la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* a partir de la fermentación de suero de leche, un residuo de la industria láctea rico en lactosa. Asimismo, debido a que la producción de PHA se propicia tanto por un exceso de carbono como una limitación de otros sustratos como el nitrógeno, se propuso evaluar la influencia de la relación molar C:N en los rendimientos de su producción. Por último, se planteó generar un balance de materia y modelos elementales y cinéticos de la fermentación de suero de leche a las condiciones evaluadas, que representaran el proceso fermentativo. Se logró sintetizar PHA a partir de la fermentación de lactosa en el suero de leche por *B. subtilis* hasta una concentración máxima de 0.41 g/L, comprobado mediante la obtención del espectro infrarrojo característico del producto. Se logró evaluar el efecto de la relación molar C:N en el rendimiento de producción de PHA, determinando que se obtuvo el mayor rendimiento de producto respecto al sustrato con un valor de 0.045 g PHA/g lactosa para la relación 15:1, con diferencias poco significativas con la relación 20:1, empleando urea como fuente de nitrógeno. Se obtuvo el balance de masa del proceso y el modelo elemental a partir de la ecuación estequiométrica representativa de la fermentación. Además, se propuso un modelo cinético basado en las ecuaciones de Monod y de Leudeking-Piret, modificado con una variación exponencial de la rapidez de consumo de sustrato, que permitió predecir los parámetros de las expresiones de la velocidad de generación de biomasa de *B. subtilis*, consumo de lactosa y formación de PHA durante la fermentación a las condiciones propuestas.

La problemática ambiental ha impulsado el desarrollo de tecnologías que sustituyan a las prácticas de producción actuales y que disminuyan el impacto que generan en los ecosistemas. Una de estas medidas es la producción de biopolímeros mediante sistemas biológicos a partir de fuentes de carbono de bajo costo, generalmente residuos, que minimicen el uso de los polímeros derivados de petroquímicos. Entre estos se encuentran los polihidroxicanoatos (PHA), caracterizados por poseer propiedades físicas y mecánicas similares a las de los polímeros tradicionales, con la principal diferencia que son biodegradables en compuestos simples como dióxido de carbono y agua (Molina, 2016; Dos Santos, *et al.*, 2017).

Los PHA son biopolímeros conformados por cadenas lineares de ésteres alifáticos de cadena corta o mediana. Se producen de forma intracelular en una gran diversidad de microorganismos, generalmente bacterias, en respuesta a situaciones de estrés ambiental. Este polímero se almacena en forma de inclusiones celulares como reserva de energía ante un desequilibrio de nutrientes disponibles para consumo, como exceso de carbono y escasez de nitrógeno, oxígeno o fósforo (Favaro, *et al.*, 2018; Peña-Jurado, *et al.*, 2019). Por tanto, la manipulación de las condiciones de crecimiento de los microorganismos que promuevan la formación de PHA es una práctica de interés en la producción de dichos biopolímeros.

Distintas fuentes de carbono han sido estudiadas para la producción de PHA, entre las que destaca recientemente el suero de leche. Este material generado como residuo de la industria de derivados lácteos, posterior a la precipitación de la mayor parte de proteínas de la leche, tiene la característica de ser rico en lactosa, en concentraciones de hasta un 5% (m/v). Este disacárido está conformado por monómeros de glucosa y galactosa, que suelen ser fermentables por diversos microorganismos. Para su consumo es indispensable que el microorganismo cuente con las enzimas necesarias para el metabolismo del disacárido, principalmente la enzima β -galactosidasa, que permite la hidrólisis de su enlace glucosídico. Una bacteria Gram positiva encontrada generalmente en suelos, reconocida por su capacidad de producción de PHA y que además expresa dicha enzima es *Bacillus subtilis*, por lo que es un posible sistema biológico de estudio para la producción de estos biopolímeros (Motta-Correa y Mosquera, 2015; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Además de analizar al suero de leche como posible fuente de carbono para la síntesis de PHA, es indispensable llevar a cabo estudios que permitan modelar los procesos fermentativos involucrados en su producción. La realización de dichos estudios a escala laboratorio, en los que se analice el consumo de sustratos, generación del producto y crecimiento celular, permiten el planteamiento de modelos elementales basados en balances de materia y modelos cinéticos característicos de la fermentación (Lee, 2001, Castañeda, 2019). Ambos son indispensables para la representación de la formación de los biopolímeros mencionados en los sistemas biológicos utilizados, y a la vez funcionan para determinar los factores que permiten incrementar los rendimientos de producción y el escalamiento del proceso.

Con base en esto, en el presente trabajo de graduación se propuso la evaluación de la producción de polihidroxialcanoatos a partir de suero de leche, cuyo contenido de lactosa fue analizado como fuente principal de carbono fermentable por la cepa *Bacillus subtilis*. Se buscó cuantificar el contenido de lactosa en el suero para determinar la relación molar de carbono/nitrógeno a la cual se genera el estrés metabólico necesario para la obtención de los mayores rendimientos de su producción. Además, se buscó modelar la formación de PHA respecto al consumo de lactosa y al crecimiento de la biomasa bacteriana, para obtener un balance de materia y un modelo cinético que representen el sistema fermentativo. En este trabajo se desarrolló la evaluación del suero de leche como una materia prima funcional para la producción de biopolímeros de tipo PHA, posibles sustitutos de polímeros de único uso, así como se determinó el efecto de las condiciones evaluadas en su formación en el sistema estudiado a escala laboratorio.

El estudio de los PHA generados por microorganismos data de 1926, al ser aislados y caracterizados por primera vez por Maurice Lemoigne en *Bacillus megaterium*. Desde entonces han sido ampliamente estudiados para determinar sus propiedades y usos, cobrando importancia durante las últimas décadas ante la problemática ambiental como un sustituto de los polímeros derivados del petróleo. Se han estudiado distintos subproductos o residuos industriales como fuente de carbono de bajo costo. Entre estos se encuentran los subproductos de la industria azucarera, como los jugos clarificados y melaza, caracterizados por su alto contenido de sacarosa. Asimismo, los lípidos de desecho generados en industrias de procesamiento de alimentos han sido aprovechados por su alto contenido de carbono oxidable. Sin embargo, una de las materias que ha cobrado importancia es el suero de leche, un residuo de la industria de productos lácteos rico en lactosa, con concentraciones que alcanzan los 50 g/L, y que usualmente es desechado (Aljuraifani, *et al.*, 2018; Favaro, *et al.*, 2018).

La producción de estos biopolímeros utilizando lactosa como fuente de carbono fue inicialmente estudiada por Yellore y Desai en 1998 en *Methylobacterium* sp., con la que se alcanzaron rendimientos de hasta 5.25 g/L. También evaluaron la posibilidad de utilizar suero de leche como fuente del disacárido fermentable, con lo que se alcanzaron rendimientos de 1.1 g/L. Años después, mediante una optimización del suministro de nitrógeno en un proceso de fermentación batch realizado por Nath y colegas en 2008, se alcanzó un rendimiento de 2.1 g/L de PHA con la misma bacteria, demostrando la importancia del control de la disponibilidad de sustratos y el estrés metabólico que esto provoca en el proceso fermentativo.

Otras cepas estudiadas para este proceso han sido *Pseudomonas hydrogenovora* y *Hydrogenophaga pseudoflava*, alcanzando rendimientos de 0.2 y 2.7 g/L de PHA, respectivamente, según lo descrito en la revisión de Koller y colegas (2007). En comparación con otras cepas reconocidas como productoras de PHA como *Cupriavidus necator* y *H. mediterranei*, las cepas mencionadas son capaces de hidrolizar por sí mismas a la lactosa en sus monómeros fermentables, glucosa y galactosa, lo que genera una reducción de los costos de producción que este proceso pudiera generar (Favaro, *et al.*, 2018).

Asimismo, ha sido posible la modificación genética de bacterias como *C. necator*, *P. saccharophila* y *Escherichia coli*, para que sean capaces de metabolizar lactosa directamente del suero de leche y de producir los biopolímeros de interés, según lo descrito en la revisión de Favaro *et al.* (2018). Un estudio realizado por País y colegas en 2014 en el que se modificó el genoma de una cepa recombinante de *E. coli* para la expresión de las enzimas involucradas en la producción del biopolímero y para el consumo de lactosa de suero de leche, alcanzó un contenido total de PHA de hasta el 87% del peso seco de biomasa. Esto demostró la posibilidad de modificaciones genéticas para el incremento de la producción de los biopolímeros con lactosa como fuente de carbono, aun cuando la bacteria en su forma silvestre no pueda sintetizarlos.

No obstante, ante la necesidad de escalamiento de este tipo de procesos, es indispensable efectuar un estudio de cepas de bacterias silvestres de alta disponibilidad que puedan fermentar la lactosa en el suero de leche para la producción de PHA de manera rentable. Entre estas cepas destaca *Bacillus subtilis*, una cepa que usualmente habita en la mayoría suelos y ha sido descrita a profundidad por su capacidad de producir una variedad de PHA, entre los que destaca el polihidroxibutirato (PHB). Esta cepa, además de las características mencionadas, es capaz de asimilar a la lactosa mediante su difusión a través de la membrana por la presencia de una permeasa específica para el disacárido. Además, sintetiza la enzima β -galactosidasa, una hidrolasa que lleva a cabo la ruptura del enlace glucosídico de la lactosa, debido a la presencia del gen *yesZ* en su genoma. En el estudio realizado por Peña-Jurado y colegas (2019), fue posible la producción de PHB con un rendimiento de 0.54 g/L mediante una cepa silvestre de *B. subtilis*, a las siguientes condiciones: 37 °C, pH 7.6 y 200 rpm. En este estudio se analizó además la influencia del nitrógeno como nutriente determinante de la producción del biopolímero, alcanzando el mayor rendimiento a una razón másica de C:N de 17.5:1.

Debido al propósito del presente estudio de llevar a cabo la evaluación de la producción de PHA mediante la fermentación de suero de leche por una cepa de *B. subtilis*, se utilizó el estudio de Peña-Jurado y colegas (2019) como referencia. Se utilizaron las condiciones físicas descritas en este estudio para analizar algunas de las condiciones determinantes de los rendimientos de producto, principalmente la relación molar carbono/nitrógeno que genera el estrés metabólico necesario para la síntesis del biopolímero.

Por otro lado, se buscó evaluar los balances de materia para la generación de un modelo elemental dado por la ecuación estequiométrica, así como realizar un modelo cinético, ambos representativos de la fermentación descrita. A pesar de que algunos de estos estudios se han realizado para la producción de PHA en distintos microorganismos para sustratos como glucosa, fructosa y sacarosa, rara vez se han realizado para lactosa como fuente de carbono, y ningún estudio ha sido publicado empleando *B. subtilis* como sistema biológico, por lo que no existe un precedente para este propósito. Con base en esto, se utilizó el planteamiento de la ecuación estequiométrica general para cualquier microorganismo descrito en Castañeda, (2019). Asimismo, el modelo cinético que representa la fermentación se planteó con base en los modelos de Monod y de Leudeking-Piret, descritos en la bibliografía de Levenspiel (1999) y Lee (2001).

La contaminación ambiental, además de caracterizarse por ser un fenómeno de dimensión global, es una problemática creciente, provocada principalmente por la actividad humana y la generación excesiva de desechos. Unos de los más relevantes son los polímeros derivados de petroquímicos que, por su naturaleza, se acumulan en suelos y agua y provocan altos niveles de contaminación, principalmente por la acumulación de residuos tóxicos y generación de gases de efecto invernadero. Se aproxima que pueden llegar a generar hasta 56 mil millones de toneladas de CO_2 para 2050. No obstante, siguen siendo ampliamente consumidos por su utilidad, con producciones a nivel mundial de 380 millones de toneladas anuales, de las cuales aproximadamente un 50 % es desechado (Fundación Heinrich Böll, 2019).

Una alternativa estudiada en las últimas décadas son los biopolímeros, compuestos sintetizados por organismos vivos a partir del consumo de fuentes ricas en carbono. Entre estos se encuentran los polihidroxialcanoatos (PHA), que se caracterizan por poseer propiedades físicas y mecánicas similares a las de los polímeros derivados de petróleo (Favaro, *et al.*, 2018). No obstante, la producción y, por lo tanto, comercialización de estos biopolímeros se ve dificultada por los altos costos de producción, principalmente derivados de las materias primas, que alcanza alrededor del 50 % del costo total del proceso. Este es el principal obstáculo para que su producción sea rentable, y, por ende, puedan llegar a ser competitivos con los polímeros tradicionales.

Se ha buscado el aprovechamiento de residuos ricos en carbono para la generación de estos biopolímeros, con el fin de reducir los costos de su producción. Uno de estos es el suero de leche, proveniente de la industria de productos lácteos. Se aproxima que, por cada kilogramo de queso producido, se obtienen 9 litros de suero, que contiene alrededor del 90 % de los nutrientes de la leche (Motta-Correa y Mosquera, 2015). En Guatemala, la producción alcanza los 1.4 millones de litros de leche diarios, de los cuales el 20 % se utiliza para la producción de derivados lácteos, de donde se obtiene este residuo (Azzari, 2014). Al ser un material rico en lactosa, con alrededor del 5 % (m/v), puede estudiarse como fuente de carbono para la producción de bioplásticos de tipo PHA, como una forma de agregarle valor y convertirlo en un producto útil.

Además de la evaluación del suero de leche como una materia de bajo costo por su naturaleza residual, es indispensable analizar las condiciones a las cuales se promueve la producción de PHA a partir del mismo, pues es un polímero que suele generarse de forma intracelular en una gran variedad de microorganismos en condiciones de estrés metabólico. Por consiguiente, el análisis de las condiciones que favorezcan los rendimientos de producción, la estequiometría de la reacción y la cinética de la fermentación en cuanto a consumo de sustratos, formación de producto y crecimiento celular, facilita el planteamiento de modelos representativos del sistema fermentativo que permiten el escalamiento del proceso.

En Guatemala, no existe un precedente de estudios que planteen propuestas para la producción de biopolímeros de tipo PHA a partir de materias residuales de bajo costo, como el suero de leche, cuya generación es significativa según lo mencionado previamente. La evaluación de la producción de PHA a partir de este residuo y el planteamiento de modelos elementales y cinéticos representativos de la fermentación, son indispensables para generar propuestas de procesos que a futuro permitirían que la producción nacional de estos biopolímeros sea factible y rentable. Además, su desarrollo es un precedente para el planteamiento de procesos lo suficientemente competitivos para sustituir a los polímeros tradicionales, y, por lo tanto, reducir el impacto ambiental provocado por la generación de productos y residuos contaminantes.

A. Objetivo general

Evaluar la producción de polihidroxicanoatos (PHA) mediante la fermentación de suero de leche a escala laboratorio

B. Objetivos específicos

- Evaluar la relación carbono/nitrógeno para determinar su influencia en la producción de PHA utilizando la lactosa en suero de leche como fuente de carbono.
- Realizar el balance de masa de la síntesis de PHA para generar un modelo elemental del sistema fermentativo.
- Generar un modelo cinético que represente la producción de PHA en las condiciones evaluadas a partir de la fermentación de suero de leche.

A. Polímeros y biopolímeros

Los polímeros son compuestos generalmente derivados de petroquímicos como petróleo crudo y gas natural. Como su nombre lo indica, son sintetizados mediante la polimerización de hidrocarburos como etileno, propileno y butileno, entre otros, obtenidos a partir de procesos de extracción y refinado. Entre los más comunes se encuentran el polietileno (PE), polipropileno (PP), poliéster (PS), tereftalato de polietileno (PET), cloruro de polivinilo (PVC) y nylon. Son altamente demandados en varias industrias como la alimenticia, farmacéutica, textil y manufactura en general, debido a su versatilidad. Por sus propiedades físicas y mecánicas, son materiales resistentes, flexibles, moldeables y químicamente inertes, haciéndolos más útiles en comparación con otros materiales como el papel y el vidrio (Fundación Heinrich Böll, 2019; Nagalakshmaiah, *et al.*, 2019).

Debido a su alto peso molecular y su conformación, los polímeros derivados de petroquímicos son materiales recalcitrantes y resistentes a la degradación microbiana. Aunque es una de las principales ventajas de su uso, esto genera que su proceso de degradación sea prolongado, pues por ejemplo, se aproxima que una bolsa plástica de PE puede tardar hasta 500 años en descomponerse. Debido a que la producción de estos polímeros es alta, que para 2018 alcanzó las 380 millones de toneladas métricas, con una tasa de reciclaje de únicamente el 9%, se acumulan en los ecosistemas dado que no se degradan en un tiempo comparable al de su producción (Fundación Heinrich Böll, 2019; Nagalakshmaiah, *et al.*, 2019).

La acumulación en los ecosistemas genera la liberación de partículas y sustancias tóxicas en aguas y suelos, que además de generar su contaminación, son consumidas por distintos animales y de forma indirecta, por seres humanos, representando un riesgo para la integridad de la fauna marina y la salud humana. Asimismo, mientras ocurre su degradación se generan grandes cantidades de gases de efecto invernadero, los principales causantes del calentamiento global. Se aproxima que para el año 2050 este proceso genere hasta 56 mil millones de toneladas de CO_2 . Por último, dado que son producidos a partir de recursos no renovables, a largo plazo su producción no es sustentable y debe ser sustituida por opciones

sostenibles y amigables con el ambiente (Lemos y Cordoba, 2015; Fundación Heinrich Böll, 2019; Nagalakshmaiah, *et al.*, 2019).

Una alternativa que se encuentra en desarrollo son los biopolímeros, compuestos producidos por sistemas biológicos a partir de materia rica en carbono. Poseen características de flexibilidad y resistencia similar a la de los polímeros derivados de petróleo, con capacidad de degradarse en condiciones naturales en compuestos como dióxido de carbono y agua. Su ventaja radica en que pueden ser fabricados a partir de fuentes renovables o biodegradables como residuos agrícolas o industriales ricos en carbohidratos y lípidos. Esto implica no solo una reducción en los costos de producción al utilizar materias primas renovables o reusables, sino también los coloca como una opción viable para la reducción del impacto ambiental generado por la acumulación de residuos derivada de la actividad humana (Valero-Vadivieso, *et al.*, 2011; Lemos y Cordoba, 2015).

Los biopolímeros pueden clasificarse según su fuente, siendo las clasificaciones más importantes los polímeros derivados de biomasa como polisacáridos y proteínas, polímeros basados en monómeros bioderivados como aceites vegetales y ácido láctico, y los polímeros sintetizados por microorganismos como los polihidroxialcanoatos. Estos últimos han cobrado importancia en la industria por sus propiedades físicas y mecánicas y mecanismos de producción por medio de fermentaciones. Se trata de una familia de poliésteres biodegradables sintetizados y acumulados de forma intracelular en distintos microorganismos como reserva de carbono y energía. En la Figura 1 se ejemplifica esta formación de inclusiones de PHB en el interior de la célula. Suelen producirse en condiciones de estrés ambiental y desbalance de nutrientes, logrando alcanzar hasta un 90 % de su peso seco. Son candidatos ideales para sustituir los derivados de petróleo, debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, diversidad química, propiedades termoplásticas, resistencia al agua y principalmente por su producción más amigable con el ambiente (Valero-Vadivieso, *et al.*, 2011; Molina, 2016).

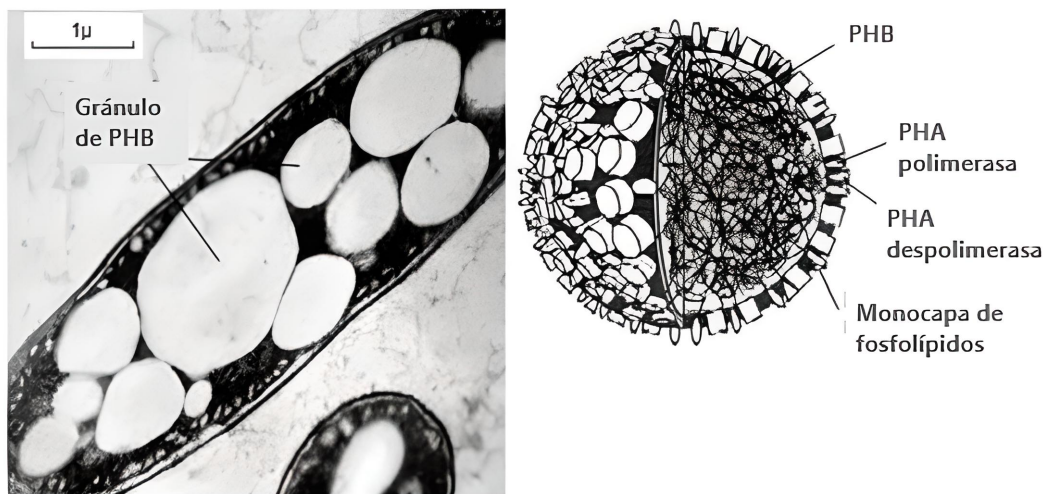


Figura 1: Formación de gránulos intracelulares de PHB en *Ralstonia eutropha* (Dos Santos, *et al.*, 2017)

B. Polihidroxicanoatos (PHA) y sus características

Los PHA son poliésteres alifáticos conformados por cadenas lineares cortas o medianas de monómeros de 3-hidroxiácidos en su configuración D(-), debido a la estereoespecificidad de las enzimas involucradas en la síntesis. Estos monómeros pueden contener de 4 a 5 carbonos si son de cadena corta o de 6 a 14 los de cadena media, con una estructura entre 60-70 % cristalina. Según el tipo de PHA, poseen distintos alcanos en el grupo alquilo, como se observa en la Figura 2, que le confiere características hidrofóbicas. Además, poseen un alto peso molecular, entre 10,000-3,000,000 g/mol, dependiendo del microorganismo productor, fuente de carbono, duración de la fermentación y pureza del polímero. Es un material no tóxico, activo ópticamente por la presencia de un carbono quiral y en su forma pura, posee una coloración amarillenta. Asimismo, se caracteriza por ser impermeable al agua y gas y estable ante radiación ultravioleta. Debido a sus propiedades termoplásticas puede someterse a extrusión, inyección, soplado y termoformado. Las principales propiedades físicas de los PHA más comunes se describen en la Figura 3, en comparación con el polipropileno, un polímero convencional (Barbosa, *et al.*, 2005; González, 2008; Dos Santos, *et al.*, 2017; Kavitha, *et al.*, 2017).

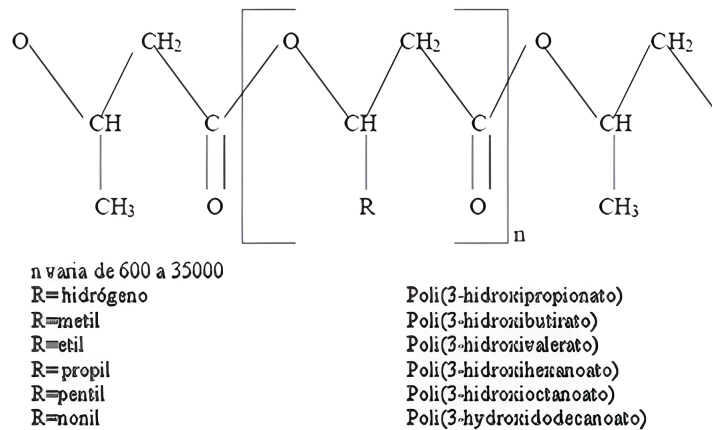


Figura 2: Estructura química de los principales PHA

(González, 2008)

Propiedad	PHB	PHBV	PHB4B	PHBHx	PP
Temperatura de fusión	177	145	150	127	176
Temperatura de transición	2	-1	-7	-1	-10
Cristalinidad (%)	60	56	45	34	50-70
Tensión (MPa)	43	20	26	21	38
Elastibilidad (%)	5	50	444	400	400

Temperaturas en $^{\circ}\text{C}$. PHB (poli3-hidroxiobutirato), PHBV (poli 3-hidroxiobutirato-co---hidroxivalerato), PHB4B (poli3-hidroxiobutirato-co-4-hidroxiobutirato), PHBHx (poli3-hidroxi hexanoato), PP (polipropileno).

Figura 3: Propiedades físicas de los PHA en comparación con polipropileno, un polímero convencional

(González, 2008)

C. Síntesis de PHA en *Bacillus* spp.

Los PHA son sintetizados a partir de acetyl-CoA mediante tres reacciones enzimáticas. El polihidroxibutirato es uno de los PHA más comunes, y su síntesis se da por la siguiente ruta: la enzima 3-cetotiolasa (PhbA) convierte dos moléculas de acetyl-CoA, generado a través de glicólisis y ruta de pentosas fosfato, en una molécula de acetoacetyl-CoA. Luego, la enzima acetoacetyl-CoA reductasa (PhbB), dependiente de la coenzima NADPH, transforma este compuesto en D-3-hidroxibutiril-CoA. Por último, la enzima PHB sintasa (PhbC) cataliza la polimerización de dos moléculas de este compuesto o bien con una cadena de PHB existente mediante la formación de un enlace éster, generando así el polímero. Las enzimas involucradas son expresadas en microorganismos que contengan el operón *phbCAB* según se describe en la Figura 4. La expresión de los genes relacionados con esta ruta sintética es regulada por presiones ambientales que representen condiciones subóptimas de crecimiento y reproducción, como por ejemplo el desequilibrio de nutrientes como escasez de oxígeno, nitrógeno o fósforo y exceso de carbono (Balaji, 2013, Mohapatra, *et al.*, 2017).

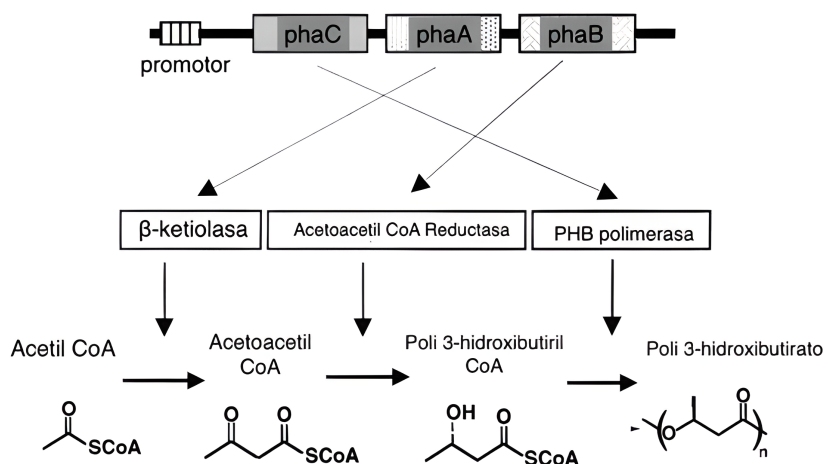


Figura 4: Ruta sintética del polihidroxibutirato

(Molina, 2016)

Entre los principales microorganismos productores de PHB se encuentran bacterias, microalgas, actinomicetos, cianobacterias, entre otros. El microorganismo más estudiado actualmente es la bacteria *Cupravidus necator*, una bacteria Gram negativa perteneciente a las betaproteobacterias. Sin embargo, se han descrito géneros de cianobacterias productoras como *Chlorogloea fritschii*, *Spirulina*, *Aphanothece*, y bacterias como *Azohydromonas lata*, *Pseudomonas oleovorans*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Bacillus megaterium* y *B. subtilis* (Molina, 2016; Kavitha, *et al.*, 2017; Favaro *et al.*, 2018).

Se ha estudiado a las cepas del género *Bacillus* para la producción de PHA debido a su capacidad de metabolizar distintas fuentes de carbono de forma eficiente, tanto para su crecimiento como para la bioconversión, logrando maximizar los rendimientos de producción. Entre las más estudiadas han sido *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus* y *B. mycoides*. Estas bacterias son capaces de sintetizar este tipo de biopolímeros en sus etapas de crecimiento exponencial y estacionaria. Durante la etapa exponencial, se da la formación de producto asociada a crecimiento, y no es dependiente de limitantes de nutrientes. Por otro lado,

durante la etapa estacionaria ocurre la formación de producto no asociado a crecimiento, propiciada por limitaciones de nutrientes, específicamente nitrógeno, fósforo o magnesio en el caso de este género de bacterias (Molina, 2016; Mohapatra, *et al.*, 2017; Favaro *et al.*, 2018).

Las cepas del género *Bacillus* son bacilos Gram positivos que se caracterizan por la formación de esporas en condiciones de estrés metabólico, lo que incrementa la producción de PHA como ventaja adaptativa para su supervivencia mediante el almacenamiento de energía, sin la adición de sustratos precursores. Esto implica una mayor producción del polímero deseado y de esta forma, un aumento en los rendimientos de la reacción al aplicarse para la fermentación industrial. Además, a diferencia de la síntesis de PHA a partir de bacterias Gram negativas, el producto obtenido por la fermentación con *Bacillus* spp. puede ser aprovechado para aplicaciones médicas, pues se evita el riesgo de reacciones inmunogénicas con tejidos celulares, pues no producen los lipopolisacáridos que generan este fenómeno (Molina, 2016; Favaro *et al.*, 2018).

D. Aplicaciones de los PHA

A pesar de que no han sido comercializados a gran escala, los polihidroxicanoatos son útiles para aplicaciones en distintas áreas como se describe en la Figura 5. Entre las principales cabe resaltar la fabricación de películas de recubrimiento, como agentes ligantes en formulaciones de tintas a base de agua, producción de empaques alimenticios, síntesis de compuestos activos, como agentes de entrega de fármacos y como soporte para la ingeniería de tejidos e implantes médicos, por su biocompatibilidad con el cuerpo humano. Asimismo, también pueden ser utilizados en la cubierta de materiales fibrosos como papel y cartón mediante la forma de látex acuoso, protegiéndolos de la degradación por humedad debido a su resistencia al agua. Sin embargo, su aplicación principal debido a su naturaleza de cadena corta es para la fabricación de botellas, bolsas y otros productos desechables (Lemos y Cordoba, 2015; Dos Santos, *et al.*, 2017).

Área	Aplicación
Biomedicina	Suturas, soportes de cultivos de tejidos para implantes, implantes quirúrgicos, apósitos, partes de huesos o venas, ingeniería de válvulas de corazón.
Farmacología	Encapsulado de medicinas para liberación controlada.
Empaque	Empaque de alimentos.
Veterinaria	Encapsulado de productos medicinales veterinarios.
Agricultura	Encapsulado de fertilizantes.
Ambiente	Producción de bolsas, botellas, materiales desechables, artículos de higiene personal, películas de recubrimiento, pañales desechables, remediación de áreas afectadas por derrames de petróleo.
Industrial	Recuperación de oligómeros y monómeros para la síntesis de nuevos polímeros.

Figura 5: Ejemplos de aplicaciones de PHA en distintas áreas (Dos Santos, *et al.*, 2017)

E. Industria láctea y lactosa en suero de leche como materia prima

La ventaja principal de los biopolímeros, específicamente el polihidroxiбутirato, es que pueden producirse a partir de residuos agrícolas e industriales con contenidos altos de carbono, por ejemplo, carbohidratos. Entre estas materias primas de bajo costo se encuentra el almidón no comestible y residuos celulósicos y lignocelulósicos de la industria agrícola, metanol y glicerol crudo de la producción de biodiésel, residuos ricos en lípidos de la industria animal y el suero de leche. Este último es un subproducto importante de la industria de lácteos, y ha sido evaluado debido a su alto contenido de lactosa como principal fuente de carbono. Se producen aproximadamente 9 litros de suero por cada kilogramo de queso fabricado, representando entre el 85-90 % del volumen de la leche, y que equivale a una producción anual de 110-115 millones de toneladas métricas a nivel mundial (Motta-Correa y Mosquera, 2015; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

En Guatemala se producen 1.4 millones de litros de leche diarios, de los cuales aproximadamente el 20 % se utiliza para la producción de derivados lácteos de la cual se obtiene como subproducto el suero de leche. En ocasiones, es utilizado para la generación de alimento de ganado o procesado para la extracción de proteína hidrolizada. Sin embargo, alrededor del 50 % es desechado como efluente hacia cuerpos receptores, siendo un importante contaminante de los recursos hídricos y un generador de eutrofización acuática debido a su alta demanda química (DQO > 60,000 ppm) y biológica (DBO > 35,000 ppm) de oxígeno, debido a su contenido de lactosa, proteínas y otros compuestos oxidables (Azzari, 2014; Motta-Correa y Mosquera, 2015; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

El suero de leche se caracteriza por ser un líquido de color amarillo verdoso y sabor ácido, remanente de la precipitación y separación de la caseína de la leche durante la elaboración de quesos y otros productos lácteos. Sus principales componentes son la lactosa, potasio, calcio, fósforo, magnesio, sodio, grasas, vitaminas como el complejo B y ácido ascórbico y proteínas lactoséricas. En términos de masa, el suero contiene el 50 % de los sólidos totales, 25 % de las proteínas, 7 % de la grasa, 50 % de los minerales y cerca del 95 % de la lactosa de la leche. Aproximadamente de 3-5 % (m/v) de su composición es lactosa, un carbohidrato conformado por monómeros de glucosa y galactosa, azúcares simples utilizados usualmente como fuente de energía. Su alto contenido de lactosa lo hace una fuente rica en carbono que puede ser fermentada por distintas bacterias para la producción de PHB (Motta-Correa y Mosquera, 2015; Amaro, *et al.*, 2019).

El suero derivado de la producción de queso se conoce como suero crudo y puede ser dulce, con un pH entre 6.0-6.5 o ácido, con pH entre 4.4-5.1. Está caracterizado por poseer la mayor parte de la lactosa de la leche, en porcentajes de aproximadamente 3-5 % (m/v) y entre un 0.2 - 1.1 % en peso de proteínas lactoséricas como lactoalbúmina y lactoglobulina. Mediante un segundo procesamiento, estas proteínas precipitan a altas temperaturas y se utilizan en la producción de un derivado lácteo bajo en grasa, llamado requesón o queso ricota. El subproducto de este segundo proceso se conoce como el suero cocido, cuyo contenido proteico es menor al suero crudo pero el contenido de lactosa se mantiene en un rango entre 3 y 5 % (m/v), por lo que ambos son fuentes ricas en carbono utilizables para su aprovechamiento como materia prima para fermentaciones microbianas (Motta-Correa y Mosquera, 2015; Amaro, *et al.*, 2019).

Como se menciona anteriormente, la lactosa es la principal fuente de carbono presente en el suero de leche. Este es un disacárido conformado por un monómero de glucosa y un monómero de galactosa, unidos por un enlace β - 1 \rightarrow 4 glucosídico, como se demuestra en la Figura 6. También se le llama lactosa monohidrato, pues cristaliza con una molécula de agua de hidratación. Su fórmula molecular es $C_{12}H_{22}O_{12} \cdot H_2O$ y tiene una masa molar de 360.32 g/mol en su forma monohidratada, y de 342.30 g/L en su forma anhidra. Comúnmente, se le conoce como el azúcar de la leche pues se encuentra en concentraciones entre 2-8 % m/v, siendo principalmente de origen animal (Chai, *et al.*, 2012; Amaro, *et al.*, 2019).

Su aplicación como sustrato fermentable en microorganismos se debe a dos principales razones. Inicialmente, para que un microorganismo pueda fermentar lactosa, debe poseer una proteína de transporte en la membrana conocida como permeasa de lactosa, que permite su difusión hacia el interior de la célula, donde es metabolizada. Asimismo, el microorganismo debe expresar una hidrolasa llamada β - galactosidasa, que genera la ruptura del enlace glicosídico y permite la liberación de los monómeros que conforman el disacárido. En la mayoría de los microorganismos estudiados, la glucosa es el principal carbohidrato metabolizable; no obstante, algunos han demostrado la capacidad de utilizar además a la galactosa cuando se expresa una enzima epimerasa, que como su nombre lo indica, cataliza la epimerización de galactosa en glucosa para ser asimilada por la célula (Chai, *et al.*, 2012; Amaro, *et al.*, 2019).

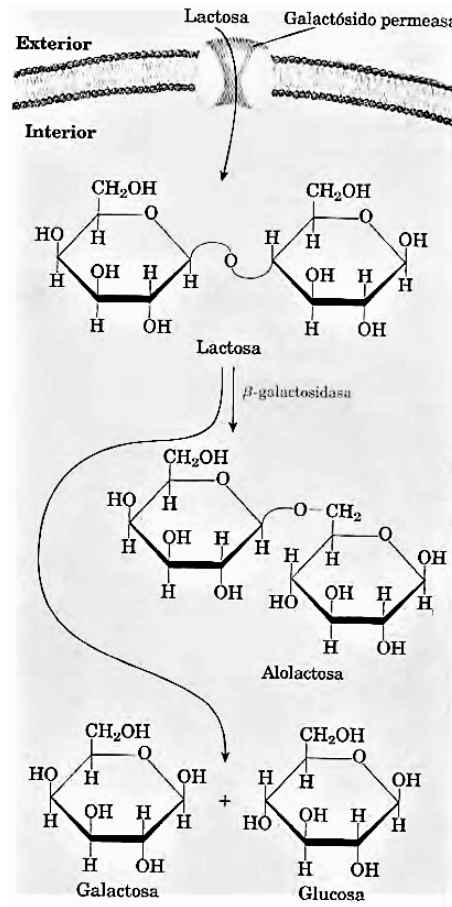


Figura 6: Metabolismo de lactosa en una célula bacteriana (Chai, *et al.*, 2012)

F. Estequiometría de la fermentación de PHA

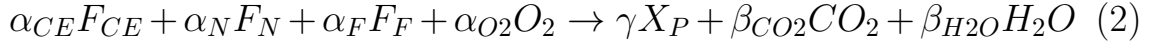
Las fermentaciones microbianas pueden analizarse como reacciones que describen un fenómeno químico en las que los microorganismos actúan como agentes biológicos que transforman nutrientes en productos y para su propio crecimiento. Un microorganismo quimioorganotrófico requiere de los siguientes nutrientes para su crecimiento y mantenimiento: una fuente de carbono y energía (FCE), una fuente de nitrógeno (FC), oxígeno en caso de ser un microorganismo aeróbico y macro y micronutrientes. Estos permiten que ocurra respiración celular y, por lo tanto, el mismo pueda reproducirse, generando lo que se conoce como biomasa (X) o masa de microorganismos. Asimismo, se encuentran los productos generados durante rutas metabólicas oxidativas como el dióxido de carbono y agua y los compuestos orgánicos generados por procesos fermentativos. Por otro lado, también se generan productos (P) no ligados al metabolismo energético, según las condiciones de fermentación, como alcoholes, ácidos orgánicos, polímeros, entre otros (Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019).

Las biotransformaciones mencionadas ocurren dentro de las células mediante reacciones bioquímicas de generación o degradación de nutrientes, que se conocen como anabolismo y catabolismo, respectivamente. En las reacciones anabólicas se sintetizan los precursores para biomoléculas que permiten el crecimiento y reproducción celular, mientras que en las reacciones catabólicas, los sustratos son degradados para la obtención de energía. En conjunto conforman una red metabólica compleja en los microorganismos, cuyo análisis puede simplificarse al tomar a la célula como una sola operación en la cual ingresan los nutrientes y se obtiene biomasa y productos. Derivado de esto, es posible el planteamiento de un balance de masa en el que las entradas (E) están conformadas por los nutrientes que ingresan a los sistemas de fermentación, las salidas (S) son la biomasa generada y los productos no ligados al metabolismo, y la acumulación (A) puede considerarse la generación de CO_2 y otros derivados de la oxidación de sustratos. De esta forma, la sumatoria de las entradas y la acumulación son equivalentes a los productos generados (Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019):

Con base en esta simplificación, en la Ecuación [II](#) se describe la reacción simplificada para procesos aeróbicos, en donde α , β y γ corresponden a los coeficientes estequiométricos de los reactivos, productos y biomasa, respectivamente:



A esta expresión pueden incluirse otros nutrientes que sean necesarios para el crecimiento celular y formación de productos específicos, como el fósforo (FF), un componente que favorece la formación de biomasa. Asimismo, cuando el producto P es un biopolímero generado de forma intracelular, puede incluirse en la expresión de la biomasa (X_P) pues altera la composición del microorganismo bajo esta condición de almacenamiento de energía, por la formación de cuerpos de inclusión asociados a la célula, a diferencia de otros productos. Para la producción de polihidroxialcanoatos, esta expresión puede obtenerse como (Bailey y Ollis, 1977; Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019):



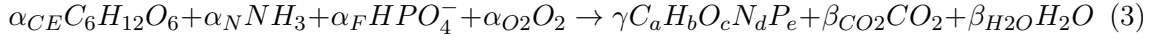
La bacteria *Bacillus subtilis* es capaz de metabolizar la lactosa en el suero de leche debido a la presencia de la enzima β -galactosidasa, que lleva a cabo la hidrólisis del disacárido en glucosa y galactosa. Sin embargo, carece del gen *galE*, que codifica para la enzima GalE, una epimerasa que permite la transformación de galactosa a glucosa, el principal sustrato para las reacciones metabólicas, y, por ende, no puede utilizar este primer monosacárido como fuente de carbono. De esta manera, únicamente puede aprovecharse la glucosa para la formación de biomasa y producto y es considerada la principal fuente de carbono cuando se realiza un análisis elemental del sistema de fermentación (Chai, *et al.*, 2012; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Asimismo, para alcanzar una relación molar C:N definida para generar el estrés metabólico que provoca la formación de PHA, es necesaria la adición de una fuente de nitrógeno, pues además es indispensable para el crecimiento del microorganismo a pesar de encontrarse de forma limitada. Una fuente de nitrógeno orgánico metabolizable por esta bacteria es la urea, que posee dos moles de nitrógeno por mol del compuesto. Mediante la enzima ureasa, expresada por los genes *ureC*, *ureB* y *ureA* en el operón *ureABC* presentes en el genoma de *B. subtilis*, una molécula de urea es hidrolizada en dos moléculas de amonio y una de dióxido de carbono como subproducto. Asimismo, también es capaz de utilizar como fuente de nitrógeno inorgánico al sulfato de amonio, una sal que en medio acuoso se disocia en iones de amonio y sulfato. Debido a que el amonio es un compuesto asimilado y oxidado fácilmente por esta bacteria, se considera como la principal fuente de nitrógeno en la reacción estequiométrica de la fermentación (Pang, *et al.*, 2019).

Por último, la composición de los microorganismos varía según la especie, siendo sus principales componentes el carbono, que alcanza un 50 % de su peso seco, seguido del oxígeno con un 20 %, nitrógeno con un 14 %, hidrógeno con un 8 % y fósforo en un 3 %. También está compuesto por otros elementos como azufre, potasio, magnesio, calcio, entre otros, pero en menores proporciones que no son significativas cuando se busca realizar el análisis elemental. Por tanto, se ha llegado a la generalización de que la composición elemental de cualquier microorganismo es mayoritariamente carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo, con una proporción molar promedio de $CH_{1.81}O_{0.52}N_{0.21}P_{0.023}$. No obstante, como se menciona anteriormente, esta composición promedio puede variar cuando se da la acumulación del polímero dentro de la célula en forma de cuerpos de inclusión, pues no es convertido en otros productos o expulsado de la misma. Es por esto que indispensable conocer esta nueva expresión que permita determinar la composición de la célula del sistema biológico y representar la fermentación de manera adecuada y precisa (Lee, 2001; Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019).

Ante estas suposiciones, y utilizando como fuente de fósforo el fosfato monobásico por su fácil asimilación en la célula, la expresión para la producción de PHA puede simplificar como se demuestra en la Ecuación 3 a continuación. El planteamiento de las ecuaciones estequiométricas permiten modelar a nivel elemental la fermentación llevada a cabo. Para su solución, son necesarios los balances por elemento, utilizando además datos experimentales para la determinación de los coeficientes estequiométricos y otras relaciones. Estas son

principalmente el coeficiente de respiración (CR), que indica la proporción de producción de CO_2 respecto al consumo de O_2 . Para fermentaciones microbianas de este tipo, este valor se encuentra entre 1-1.033. Asimismo, la composición elemental de oxígeno e hidrógeno de las células de cualquier microorganismo, incluso con la acumulación de PHA como en este caso, suele mantenerse constante, debido a que derivan del consumo de sustratos definidos: glucosa, amonio y oxígeno. En el caso de las bacterias, esta relación O/H es de 0.2873 (Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019).



G. Cinética de las fermentaciones microbianas

El estudio de la cinética de crecimiento microbiano es indispensable para el diseño y operación de sistemas de fermentación complejos. En la cinética microbiana se analiza la relación de la tasa de crecimiento del microorganismo respecto a la disponibilidad de sustratos y condiciones físicas. Es el resultado del conjunto de reacciones metabólicas y fenómenos de transporte que ocurren dentro de la célula en sistemas multicomponente de varias fases. Este sistema es dinámico pues mientras las células crecen y se desarrollan durante su ciclo de crecimiento, el medio se encuentra en cambios constantes de las condiciones físicas y químicas (Lee, 2001; Shuler, *et al.*, 2017).

El crecimiento microbiano se da en varias etapas, que se observan en las curvas de concentración celular respecto al tiempo de la Figura 7. Se inicia con una fase de retardo, en la cual las células se ajustan al medio tanto en términos de condiciones físicas como en disponibilidad de sustratos fermentables. El cambio de una concentración de medio o del tamaño del inóculo, de fuente de nutrientes o en las condiciones como pH y temperatura, generan un retardo en el crecimiento pues las células deben producir las enzimas necesarias para llevar a cabo los procesos metabólicos. Para una fermentación más eficiente, es común que le realice una o varias adaptaciones previas al sustrato a utilizar con volúmenes progresivamente mayores, a modo de reducir esta fase de retardo en la que no se genera biomasa o productos (Lee, 2001).

Luego, ocurre una aceleración para entrar a la fase exponencial, en la que las células se duplican a una velocidad de crecimiento que incrementa con el consumo de sustrato. En esta fase puede interpretarse como una reacción autocatalítica de primer orden, por lo que la tasa de crecimiento es proporcional a la concentración de células en un tiempo determinado, dada por la Ecuación 4 (Levenspiel, 1999; Lee, 2001).

$$r_N = \frac{C_N}{dt} = \mu C_N \quad (4)$$

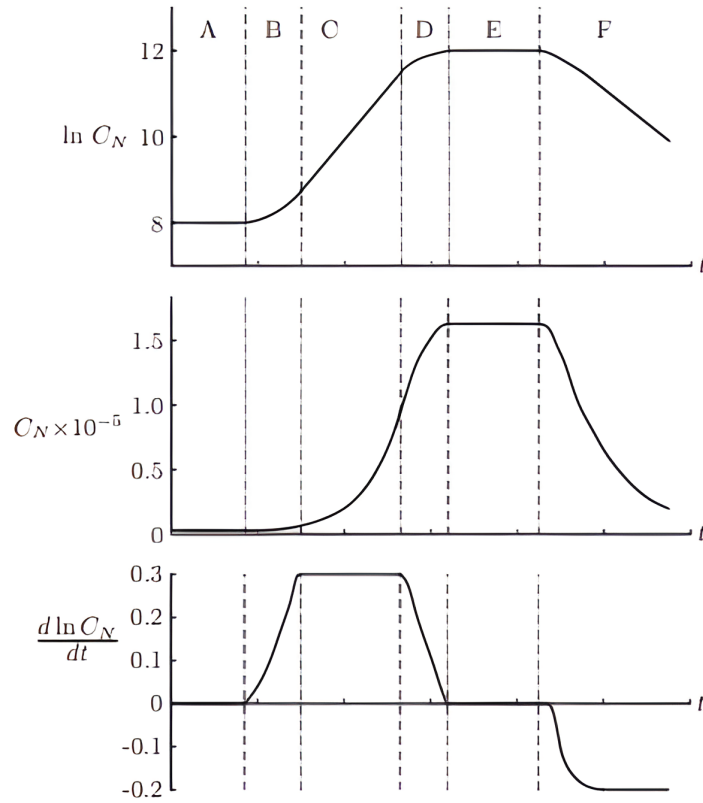


Figura 7: Curva de crecimiento respecto a la concentración de células (C_N) en el tiempo (t). Se observan las fases de (A) retardo, (B) aceleración, (C) exponencial, (D) desaceleración, (E) estacionaria y (F) de muerte celular (Lee, 2001)

En esta expresión, la constante μ es la tasa específica de crecimiento, que representa el cambio del logaritmo natural de la concentración celular respecto al tiempo. Esta constante es afectada por la concentración de sustrato, y su efecto se describe con el modelo de Monod, el cual es una simplificación del crecimiento celular para la descripción de modelos cinéticos de fermentación, en la cual la concentración de componentes inhibidores es baja. En la ecuación de Monod (Ecuación 5), C_S representa la concentración del sustrato limitante en el medio y K_S es la constante de afinidad al sustrato. El valor de esta constante es igual a la concentración del sustrato cuando la tasa de crecimiento es la mitad del valor máximo (μ_{max}), que se alcanza cuando la concentración celular se encuentra en un valor máximo constante, y ya no es afectado por incrementos en la concentración del sustrato, como se observa en la Figura 8 (Lee, 2001).

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_S}{K_S + C_S} \quad (5)$$

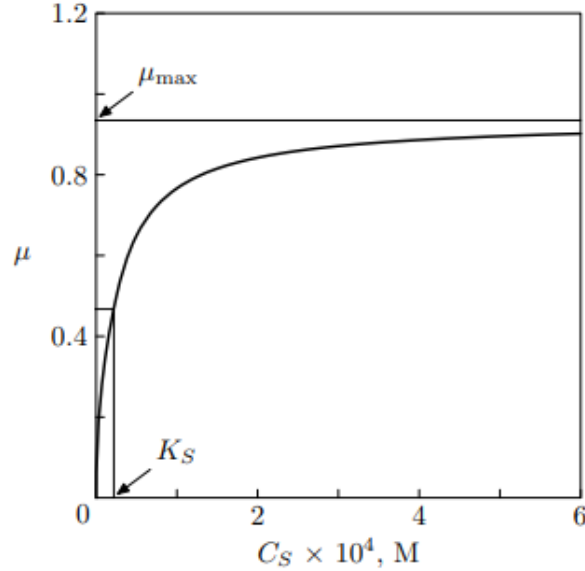


Figura 8: Dependencia de la tasa específica de crecimiento en la concentración del sustrato limitante

(Lee, 2001)

A partir de la ecuación de la velocidad de crecimiento celular y el modelo de Monod puede obtenerse la expresión para la velocidad de consumo de sustrato. Esta expresión se obtiene a partir del producto del inverso negativo del rendimiento de crecimiento de biomasa (Y_{XS}) respecto al consumo de sustrato por la velocidad de crecimiento celular, como se expresa en la Ecuación 6. Esto es posible pues se sabe que la velocidad neta de la reacción se puede relacionar con las velocidades de las especies intervinientes de la reacción a través de valores constantes (Torres, 1996; Castañeda, 2019).

$$r_S = -\frac{1}{Y_{XS}} r_N = \frac{-\mu C_N}{Y_{XS}} \quad (6)$$

Por otro lado, la cinética de formación de producto puede describirse con base en la ecuación de Leudeking-Piret (Ecuación 7), que relaciona la generación del producto con el crecimiento celular. Esta ecuación describe los parámetros α y β , que representan los coeficientes de formación de producto asociado y no asociado al crecimiento, respectivamente. El parámetro α representa, además, el rendimiento de formación de producto respecto a la formación de biomasa (Y_{PX}). La formación asociada al crecimiento se da mientras ocurre el crecimiento celular, principalmente durante la fase exponencial en la cual se maximiza la reproducción celular. Por el contrario, la formación no asociada ocurre de forma independiente a dicho crecimiento, únicamente por la disponibilidad de sustratos en el medio fermentativo, y ocurre en su mayoría durante la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo. En *B. subtilis*, la formación de PHA ocurre tanto de manera asociada en condiciones balanceadas de nutrientes como no asociada al crecimiento por la limitación de nutrientes como nitrógeno, fósforo, magnesio u oxígeno y exceso de carbono durante la fase estacionaria (Garnier y Gaillet, 2015; Mounira, *et al.*, 2017; Mohapatra, *et al.*, 2017).

$$r_P = \alpha r_N + \beta C_N = C_N (\alpha \mu + \beta) \quad (7)$$

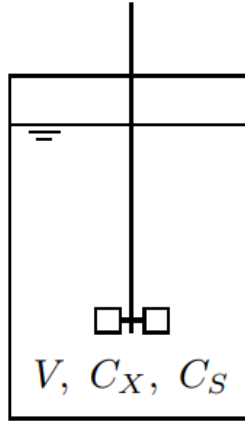
El modelo de sistemas estáticos y dinámicos puede analizarse y llevarse a cabo a través de software que resuelvan ecuaciones diferenciales, entre los que destaca Berkeley Madonna. Desarrollado por Robert Macey y George Oster en la Universidad de California en Berkeley, este software permite el modelamiento de sistemas estáticos y dinámicos complejos a través de la solución de ecuaciones diferenciales. Permite además el ajuste cinético de datos experimentales a modelos teóricos que representen sistemas dinámicos biológicos, como las fermentaciones. Está diseñado para operar a través de tres métodos de integración: método de Euler, Runge-Kutta 2 y Runge-Kutta 4, siendo este último el método más común. A partir de la programación de las expresiones de las velocidades de crecimiento celular, consumo de sustrato limitante y formación de producto y los datos experimentales, es posible la estimación de los parámetros constantes del modelo escogido para la fermentación realizada a las condiciones determinadas (Shiflet y Shiflet, 2006; Ballesteros, *et al.*, 2014).

H. Reactor tipo SRT

Los bioreactores son dispositivos en los cuales se llevan a cabo transformaciones bioquímicas mediante reacciones biológicas de enzimas o células de microorganismos para la transformación de materia orgánica en productos de interés. En estos es posible el control y manipulación de distintas condiciones de fermentación con las cuales se optimiza la conversión, según el tipo de reactor utilizado. Existen tres grandes tipos: tanque agitado o batch (STR por sus siglas en inglés), tanque agitado continuo (CSTR) y reactor de flujo pistón (PFR), siendo el primero el más utilizado (Levenspiel, 1999; Lee, 2001).

En un reactor STR (Figura 9) los reactivos son agregados al contenedor en donde son mezclados hasta alcanzar un estado homogéneo, para luego permitir que reaccionen por un tiempo. En el caso de una fermentación microbiana, se agrega al reactor el medio de cultivo estéril con los sustratos fermentables y el microorganismo a utilizar para llevar a cabo la transformación. Esta operación se da en estado estacionario, pues mientras se desarrolla la reacción, no hay entradas o salidas al sistema, y las variables como la densidad celular, concentración de sustrato y la de producto cambian con el tiempo. No obstante, en cualquier instante, la composición a lo largo del reactor es uniforme (Levenspiel, 1999; Lee, 2001).

Los reactores tipo STR son utilizados para una amplia variedad de células, tanto de microorganismos, como animales y vegetales. En estos es posible mantener el control de la velocidad de agitación para permitir una suspensión adecuada de las células en el medio, así como una mejor oxigenación y transferencia de masa y calor. También pueden monitorearse condiciones como la aireación y pH a lo largo de la fermentación. Usualmente son fabricados de acero inoxidable debido a la inocuidad del material, necesaria para este tipo de reacciones. Cuentan con un sistema de control de temperatura, que puede ser desde el uso de resistencias hasta la implementación de una chaqueta en su exterior para la transferencia de calor. Además, suelen contar con deflectores internos que permiten la homogeneización del medio a partir de la formación de turbulencia en el flujo generado por el agitador (Lee, 2001).



$$\begin{aligned} C_X &= C_{X_0} \\ C_S &= C_{S_0} \end{aligned} \quad \text{a} \quad t = t_0$$

Figura 9: Esquema de un reactor agitado (STR)

(Lee, 2001)

I. Análisis químico

La caracterización de los productos de una fermentación mediante análisis químico es indispensable para determinar la efectividad de la operación, así como monitorear su comportamiento y detectar posibles faltas cometidas durante los procesos experimentales. Aunque existen múltiples técnicas de análisis de muestras, resaltan la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectroscopía infrarroja (IR) que se describen a continuación:

1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es una técnica de separación de los componentes de una mezcla en dos fases, una estacionaria y una móvil, inmiscibles entre sí. La separación se da al hacer pasar una mezcla de compuestos disuelta en la fase móvil a través de la fase estacionaria. La detección de los componentes de la mezcla se basa en las distintas interacciones que los analitos tienen con ambas fases, según su naturaleza, estructura química y masa molecular y, por lo tanto, su elección para el tipo de muestra a analizar es determinante en la efectividad de la técnica. Los compuestos con mayor afinidad a la fase estacionaria tienden a moverse más lentamente que los que tienen menor o ninguna afinidad con dicha fase, y por ende, su tiempo de retención es mayor. Esto se cuantifica pues al final de la columna se encuentra un detector que identifica la salida de un compuesto de la columna, y envía una señal que indica la lectura del mismo. Los resultados se obtienen en un esquema llamado cromatograma, en el que se describe la intensidad de las señales detectadas respecto al tiempo. Las cimas en la gráfica corresponden a un compuesto distinto, pues para una determinada composición de fases, cada compuesto tiene un tiempo de retención específico, y la altura de las mismas indica su magnitud, es decir que, a mayor altura, mayor es la concentración del analito en la muestra (Lozano-Sánchez, *et al.*, 2018)

2. Espectroscopía infrarroja (IR)

La espectroscopía infrarroja (IR) es un método de absorción utilizado para análisis cualitativos y cuantitativos. Se caracteriza por operar en la región infrarroja del espectro electromagnético, en la cual la luz presenta mayor longitud de onda pero menor frecuencia que la luz visible. En esta región, la radiación altera los estados de vibración y rotación de los enlaces covalentes de las moléculas orgánicas. Únicamente las moléculas que sufren de un cambio en su momento dipolo en varios estados de vibración y rotación pueden ser identificados por esta técnica. Estas vibraciones pueden ser por torsión, es decir por un cambio en el ángulo del enlace, o por tensión, que se refiere al cambio de la distancia entre los dos átomos que lo conforman. Debido a que cada tipo de enlace absorbe a distintas frecuencias en la región de infrarrojo, se obtienen espectros únicos para cada especie molecular. El espectro IR que el esquema representativo obtenido de la absorbancia de luz de los distintos enlaces que conforman la molécula respecto a la frecuencia es una propiedad física de cada compuesto, y puede utilizarse para la identificación de compuestos en muestras desconocidas. En la Figura 10 se resumen las absorciones características del espectro IR de algunos grupos funcionales (Tyner & Francis, 2017).

Grupo funcional	Absorción (cm ⁻¹)	Intensidad	Grupo funcional	Absorción (cm ⁻¹)	Intensidad
Alcano			Amina		
C-H	2850-2960	Media	N-H	3300-3500	Media
Alqueno			C-N	1030-1230	Media
=C-H	3020-3100	Media	Compuesto carbonilo		
C=C	1640-1680	Media	C=O	1670-1780	Fuerte
Alquino			Aldehído	1730	Fuerte
≡C-H	3300	Fuerte	Cetona	1715	Fuerte
C≡C	2100-2260	Media	Éster	1735	Fuerte
Halogenuro de alquilo			Amida	1690	Fuerte
C-Cl	600-800	Fuerte	Ácido carboxílico	1710	Fuerte
C-Br	500-600	Fuerte	Ácido carboxílico		
Alcohol			O-H	2500-3100	Fuerte, amplia
O-H	3400-3650	Fuerte, amplia	Nitrilo		
C-O	1050-1150	Fuerte	C≡N	2210-2260	Media
Areno			Nitro		
C-H	3030	Débil	NO ₂	1540	Fuerte
Anillo aromático	1660-2000	Débil			
	1450-1600	Media			

Figura 10: Absorciones características del espectro IR de grupos funcionales (Tyner y Francis, 2017)

La metodología fue adaptada del protocolo de fermentación desarrollado por Peñajurado, *et al.*, 2019 y del protocolo de extracción de PHA de Salmiati, *et al.*, 2009. En el Anexo A se muestran imágenes de algunos de los procedimientos principales descritos a continuación. Además, en el Anexo E se detallan las especificaciones de los reactivos, materiales y equipos utilizados para la experimentación. Por último, el análisis de los datos obtenidos durante el desarrollo de la experimentación fue realizado en la herramienta Microsoft Excel versión 2019 y los datos finales para el modelo cinético se determinaron mediante el Software Berkeley Madonna:

A. Obtención de suero de leche

1. Obtener aproximadamente 50 L de suero de leche de la empresa Lácteos de Oriente ubicada en Jalapa, Guatemala. Se requieren 15 L de suero de leche crudo y 35 L de suero de leche cocido.
2. Esterilizar en autoclave el suero de leche a 121°C por 15-20 minutos y enfriar a temperatura ambiente para evitar contaminación.
3. Centrifugar a velocidad máxima por 20 minutos y filtrar suero de leche a utilizar para eliminar restos sólidos.
4. Almacenar el suero de leche a 4°C en recipientes esterilizados hasta su uso.

B. Evaluación de propiedades del suero de leche

1. Medir pH del suero con un potenciómetro previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4.0 y 7.1.
2. Determinar contenido de lactosa en muestras de suero de leche mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de índice de refracción utilizando una columna Hi-plex H (Ver sección I.1).
3. Determinar el contenido de nitrógeno y fosfatos inicial en el suero de leche a diluciones de 1:10 y 1:1000, respectivamente, según el rango de sensibilidad de cada prueba, mediante el colorímetro de Hach (Ver sección I.2)

C. Preparación de cepas bacterianas y medios de cultivo

1. Cada dos semanas, preparar 50 mL de agar nutritivo y 200 mL de caldo nutritivo según indicaciones de los proveedores para el cultivo de la cepa *B. subtilis* ATCC 6051.
2. Esterilizar los medios de cultivo en una autoclave a 121 °C por 15 minutos.
3. Dejar enfriar el caldo nutritivo a temperatura ambiente, sellarlo y almacenarlo a 4°C hasta su uso.
4. Permitir que el agar nutritivo alcance una temperatura de aproximadamente 40°C y bajo mechero, verter en cajas de Petri estériles.
5. Dejar que el medio solidifique, sellar las placas y almacenar a 4°C hasta su uso.
6. Sembrar el cultivo de *B. subtilis* de un cultivo primario en cajas de Petri con agar nutritivo identificadas con el nombre de la bacteria, fecha de inoculación, tipo de medio de cultivo y nombre de la investigadora.
7. Incubar las placas a 30-35°C por 48h en incubadora sin agitación. Este será el cultivo secundario.
8. Sacar las placas de la incubadora, sellarlas adecuadamente y almacenarlas a 4°C.
9. Repetir la siembra del cultivo secundario de forma mensual para mantener su integridad y evitar mutaciones no deseadas.
10. Obtener un cultivo semanal a partir del cultivo secundario en cajas de Petri nuevas con agar nutritivo fresco.
11. Incubar cada cultivo semanal por 48h a 30-35°C en incubadora sin agitación y almacenarlo posteriormente a 4°C. De este cultivo semanal se obtendrán los cultivos a utilizar en cada prueba

D. Preparación de inóculos de bacterias en caldo nutritivo y suero de leche

1. De las placas con el cultivo semanal, tomar una asada de una colonia de *B. subtilis* e inocular en 50 mL de caldo nutritivo previamente esterilizado.
2. Incubar por 24 h a 37°C con agitación a 200 rpm.
3. Tomar una alícuota de cultivo y agregarla al suero de leche estéril, crudo o cocido según la prueba, a razón de 1:15 (1 mL de inóculo en 14 mL de suero de leche). Este será el inóculo primario previo a la fermentación.
 - El tamaño del inóculo de suero de leche dependerá de la prueba desarrollada. Para análisis de condiciones a volumen de 80 mL, se requieren en total 100 mL, mientras que para la fermentación a 10 L, se requieren 500 mL.
4. Incubar a 37°C por 36-48 h a 150 rpm.
5. Para cada inóculo preparado semanalmente, obtener una muestra y realizar una dilución 1:1000 con agua estéril para conteo de células vivas en el inóculo por el método de Neubauer.
6. Mezclar volúmenes iguales, aproximadamente 10 μ L, de la muestra diluida con solución de azul de tripano en etanol al 6 %.
7. Colocar 10 μ L de la mezcla en la cámara de Neubauer. Asegurarse que la muestra llena el espacio entre el portaobjetos y la cámara, agregando la muestra por un costado y permitiendo que por capilaridad cubra el área hacia el centro de la cámara.
8. Colocar la cámara con la muestra en el microscopio a un aumento de 10X y enfocar hasta encontrar la cuadrícula adecuada para el conteo.
9. Realizar el conteo de células viables totales en los 4 cuadrantes laterales, tomando en cuenta las que se encuentran en el centro del cuadro y sobre los lados superior y derecho. De ser necesario, utilizar el lente de aumento de 40X.
10. Obtener el número total de células en inóculo a partir de la Ecuación 13 en el Anexo C.

E. Determinación de las condiciones de fermentación a 80 mL

1. Fuente de nitrógeno y tamaño del inóculo

- a. Ajustar pH del suero de leche crudo y cocido a 7.0 con una solución de NaOH 1.0 M.
- b. En 12 Erlenmeyers de 250 mL con deflectores, agregar suero de leche crudo y cocido esterilizado para un volumen final de 80 mL según la prueba a realizar, como se describe en el Cuadro 9 en el Anexo B.

- c. Agregar 0.4 g de la fuente de nitrógeno a cada sistema de fermentación, para una concentración final de 0.5 % (m/v). Se analizan urea y sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno.
- d. Añadir inóculos de 1 %, 5 % y 10 % (v/v) del inóculo primario de *B. subtilis* en suero de leche a los distintos Erlenmeyers, según el Cuadro 9 en el Anexo B.
- e. Incubar a 37°C por 48 h y con agitación de 200 rpm.
- f. Finalizada la fermentación, realizar extracción y cuantificación de biomasa y PHA a partir de la metodología descrita en la sección H.
- g. Cuantificar el contenido de lactosa en el sobrenadante de cada fermentación mediante HPLC según el protocolo descrito en la sección I.1
- h. Obtener el rendimiento de generación de biomasa y producto para cada condición evaluada, según las Ecuaciones 16, 17 y 18 en el Anexo C.
- i. Realizar esta prueba en duplicado para cada condición evaluada.

2. Relación carbono:nitrógeno

- a. Ajustar pH del suero de leche a 7.0 con una solución de NaOH 1.0 M
- b. En 12 Erlenmeyers de 250 mL con deflectores, agregar suero de leche crudo y cocido esterilizado para un volumen final de 80 mL, según la prueba a realizar, como se describe en los Cuadros 10 y 11 en el Anexo B.
- c. Añadir la cantidad de cada fuente de nitrógeno (urea y sulfato de amonio), para alcanzar relaciones molares de carbono:nitrógeno de 10:1, 15:1, 20:1 y 40:1, según la concentración de lactosa en el suero y la relación molar necesaria (ver Cálculo de muestra 2 en Anexo C), como se describe en los Cuadros 10 y 11 en el Anexo B.
- d. Añadir 4 mL del inóculo primario de *B. subtilis* en suero de leche previamente preparado, para un tamaño de inóculo del 5 % (v/v) según lo obtenido en la sección anterior.
- e. Incubar a 37°C por 48 h y con agitación de 200 rpm.
- f. Finalizada la fermentación, realizar extracción y cuantificación de biomasa y PHA a partir de la metodología descrita en la sección H.
- g. Cuantificar el contenido de lactosa en el sobrenadante de cada fermentación mediante HPLC según el protocolo descrito en la sección I.1.
- h. Obtener el rendimiento de generación de biomasa y producto para cada condición evaluada, según las Ecuaciones 16, 17 y 18 en el Anexo C.
- i. Realizar esta prueba en duplicado para cada condición evaluada.

3. Análisis estadístico de diferencia significativa de medias

- a. Tabular los datos obtenidos de los rendimientos de generación de biomasa respecto al sustrato Y_{XS} , de producto respecto a la biomasa Y_{PX} , y de producto respecto al sustrato Y_{PS} , y la concentración de producto en g/L para cada condición evaluada en duplicado.
- b. Utilizar la función =PRUEBA.T (matriz1;matriz2;colas;tipo) de Microsoft Excel para realizar un análisis estadístico de diferencia significativa de medias como una prueba t de Student.

- c. Seleccionar como *matriz1* y *matriz2*, los valores en duplicado de las muestras para cada par de conjuntos de datos a comparar.
- d. Seleccionar el argumento *colas* = 2 para un análisis con una distribución de dos colas con mayor exactitud en la determinación de diferencia de medias.
- e. Seleccionar el argumento *tipo* = 2 para el análisis de dos muestras con varianzas iguales. Se asumen varianzas iguales para un análisis más preciso pues el número de datos en las muestras es reducido.
- f. Esta función utiliza un valor de significancia (α) predeterminado de 0.05 y un valor de diferencia hipotético de 0. Esta es la hipótesis nula, que indica que la diferencia de medias es igual a cero.
- g. Comparar el valor p obtenido, que indica la probabilidad asociada a la prueba t de Student, con el valor de α . Si $\text{valor-p} < \alpha = 0.05$, rechazar la hipótesis nula y concluir que sí existe una diferencia estadísticamente significativa. Si $\text{valor-p} > \alpha = 0.05$, no puede rechazarse la hipótesis nula y no puede concluirse de una diferencia significativa.
- h. Realizar este análisis para los rendimientos obtenidos para cada variable evaluada en las secciones E.1 y E.2.

F. Fermentación de suero de leche en bioreactor a escala 10 L

1. Agregar 8 L de suero de leche a un pH entre 7-7.5 previamente ajustado con una solución de NaOH 1.0 M en un reactor SRT New *Brunswick*TM BioFlo® 115 de capacidad de 15 L previamente esterilizado.
2. Añadir 24.87 g de urea en el suero a 37.88 g/L para una razón molar carbono-nitrógeno de 15:1, determinada previamente a escala de 80 mL (ver Cálculo de muestra 2 en Anexo C).
3. Agregar 500 mL de inóculo de suero de leche a una proporción de volumen de inóculo del 5 % (v/v) determinado previamente a escala de 80 mL.
4. Establecer temperatura de operación a 37°C y agitación a 200 rpm e incubar durante 72 horas.
5. Obtener muestras de 50 mL cada hora durante las primeras 24 h, y luego cada dos horas hasta finalizar la reacción.
6. Drenar el resto de la fermentación en recipientes esterilizados para posterior extracción y análisis.
7. Realizar la extracción y cuantificación de biomasa y PHA de cada muestra a partir de la metodología descrita en la sección H.
8. Cuantificar el contenido de lactosa en el sobrenadante de cada muestra mediante HPLC según el protocolo descrito en la sección I.1
9. Obtener el rendimiento de generación de biomasa y producto para cada condición evaluada, según las Ecuaciones 16, 17 y 18 en el Anexo C.
10. Realizar este procedimiento en duplicado.

G. Determinación del balance de masa de la fermentación

1. De la fermentación en biorreactor a escala de 10 L, tomar una muestra inicial y final de medio fermentativo de 50 mL.
2. Cuantificar el contenido de lactosa en el sobrenadante de cada muestra mediante HPLC según el protocolo descrito en la sección I.1.
3. Extraer y cuantificar biomasa y producto de cada muestra según lo descrito en la sección H.
4. Cuantificar el contenido de nitrógeno y fosfatos del sobrenadante de la fermentación mediante el colorímetro Hach según los protocolos descritos en la sección I.2.
5. Realizar el balance de masa y materia a partir de los cambios de concentraciones de carbono, oxígeno, nitrógeno y fósforo consumidos durante el crecimiento celular y la fermentación de PHA.

H. Extracción y cuantificación de biomasa y PHA producido

1. Cuantificación de biomasa

- a. Tomar el volumen total del producto de la fermentación y centrifugar a velocidad máxima por 15 minutos a 4 °C.
- b. Tomar una muestra de 5 mL del sobrenadante para análisis en HPLC, según la sección I.1.
- c. Decantar el resto del sobrenadante y resuspender el pellet con agua destilada.
- d. Volver a centrifugar a máxima velocidad por 15 min a 4°C para obtener el pellet lavado.
- e. Decantar sobrenadante y resuspender el pellet en 5 mL de agua.
- f. Agregar en beakers previamente tarados y secar el pellet por 24 h en horno a 60°C.
- g. Pesar la cantidad de células producidas una vez se alcance peso constante.

2. Extracción de PHA

- a. Agregar volúmenes iguales de hipoclorito de sodio 5% y cloroformo a las células secas.
- b. Sellar adecuadamente los recipientes e incubar a 37°C por 3 horas con agitación a 300 rpm.
- c. Centrifugar suspensión a 3000 rpm por 20 minutos. Se forman tres fases luego de centrifugar: hipoclorito de sodio en la fase superior, restos celulares en la fase intermedia y cloroformo con extracto en la fase inferior.
- d. Extraer con jeringa la fase inferior del centrifugado, cuidando no contaminar con los restos celulares, y colocar en recipientes previamente tarados.

- e. Evaporar el solvente hasta obtener el producto sólido. Remover restos en horno a 60°C por 30 minutos hasta peso constante.
3. Calcular rendimiento de biomasa y de producto en g/L y rendimientos respecto al consumo de sustrato y crecimiento de biomasa, según las Ecuaciones 16, 17 y 18 el Anexo C.
4. Obtener el producto sólido y analizar mediante espectroscopía infrarrojo en el espectrofotómetro IR Perkin Elmer Frontier.

I. Análisis de muestras

1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

- a. La columna por utilizar es Hi-plex H, específica para azúcares y ácidos orgánicos, cuya fase móvil es agua filtrada con filtros de 0.45 μm .
- b. Preparar una curva de calibración con lactosa monohidrato a concentraciones de 1 a 5% (m/v)
- c. Filtrar las muestras con filtros de 0.22 μm hacia viales de cromatografía y colocar en el automuestrador.
- d. Programar secuencia de muestreo en el equipo con el nombre y número de vial.
- e. El equipo toma e inyecta 20 μL de la muestra, que se bombean a 0.6 mL/min, durante 21 min a 40 °C.
- f. La fase móvil empuja la muestra hacia la columna, donde ocurre la separación de compuestos.
- g. Luego se hace pasar la muestra separada por el detector de índice de refracción a 40°C, donde se reconocen los compuestos por señales eléctricas que se transforman en picos en las curvas de cromatogramas.
- h. Obtener los resultados de la cuantificación de las especies requeridas con base en los resultados de los cromatogramas, en % (p/v) según las curvas de calibración descritas en el Anexo A.

2. Colorímetro HACH

- a. Nitrógeno
 - 1) Ajustar en el colorímetro HACH el programa 58 para medición de nitrógeno total en mg/L en un rango entre 0.0-25.0 mg/L N.
 - 2) Encender el reactor DRB 200 y ajustar a 105 °C.
 - 3) Agregar a los viales con Reactivo de Hidróxido para Nitrógeno Total, un sobre del Reactivo de Persulfato de Nitrógeno Total.
 - 4) Agregar 2 mL de la muestra a analizar, a una dilución de 1:100 con agua destilada.
 - 5) Para el blanco, agregar 2 mL de agua en lugar de la muestra.
 - 6) Agitar vigorosamente durante 15 s para mezclar adecuadamente.
 - 7) Colocar en el reactor y dejar que ocurra la reacción durante 30 min.

- 8) Retirar del reactor y dejar enfriar a temperatura ambiente.
 - 9) Agregar a los viales con digestión un sobre del Reactivo A TN, agitar por 15s y dejar reaccionar durante 3 min.
 - 10) Agregar a los viales con digestión un sobre del Reactivo B TN, agitar por 15s y dejar reaccionar durante 2 min.
 - 11) Agregar 2 mL de cada muestra y el blanco de los viales de digestión hacia los viales del Reactivo C TN.
 - 12) Cerrar e invertir tubos 10 veces para mezclar, y dejar reaccionar durante 5 min.
 - 13) Colocar el adaptador para viales en el colorímetro programado, limpiar el vial del blanco y colocar en el equipo.
 - 14) Cubrir el vial con la tapa del instrumento y presionar el botón ZERO para ajustar el blanco en 0.0 mg/L N.
 - 15) Colocar cada una de las muestras en el adaptador, cubrir con la tapa y presionar el botón READ para realizar la lectura.
 - 16) Anotar el valor dado por el equipo y corregir según el factor de dilución.
- b. Fosfatos
- 1) Ajustar en el colorímetro HACH el programa 82 para medición de fósforo total en mg/L en un rango entre 0.0-3.5 mg/L PO_4^-3 .
 - 2) Encender el reactor DRB 200 y ajustar a 150 °C.
 - 3) Agregar 5.0 mL de la muestra a analizar, a una dilución de 1:100 con agua destilada, en un vial de Prueba Total y Ácida Hidrolizable.
 - 4) Agregar un sobre de Reactivo de Persulfato de Potasio al vial con la muestra.
 - 5) Agitar vigorosamente durante 15 s para mezclar adecuadamente.
 - 6) Colocar en el reactor y dejar que ocurra la reacción durante 30 min.
 - 7) Retirar del reactor y dejar enfriar a temperatura ambiente.
 - 8) Agregar 2.0 mL de la solución de hidróxido de sodio 1.54 N al vial. Cerrar y mezclar.
 - 9) Colocar el adaptador para viales en el colorímetro programado, limpiar el vial con la muestra y colocar en el equipo.
 - 10) Cubrir el vial con la tapa del instrumento y presionar el botón ZERO para ajustar en 0.0 mg/L PO_4^-3 .
 - 11) Agregar al vial un sobre del Reactivo de Fosfatos PhosVer 3.
 - 12) Cerrar y mezclar durante 10-15s y dejar que ocurra la reacción durante 2 min.
 - 13) Colocar cada una de las muestras en el adaptador, cubrir con la tapa y presionar el botón READ para realizar la lectura.
 - 14) Anotar el valor dado por el equipo y corregir según el factor de dilución.

J. Planteamiento del modelo cinético en Berkeley Madonna®

1. El modelo de Monod resulta el más adecuado para describir el crecimiento celular de *B. subtilis* con respecto al consumo de sustrato según los datos experimentales, a

las condiciones definidas que mejoran el rendimiento de producto. Además, el modelo de Luedeking-Piret describe adecuadamente la formación de producto asociada y no asociada al crecimiento celular, a modo de ajustar la producción de PHA en las condiciones definidas (Ver Ecuaciones 5 y 7 en Marco teórico).

2. En el software Berkeley Madonna[®] versión 10.1.2 importar los datos para crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y generación de producto en g/L generados mediante el análisis de datos de la fermentación a escala de 10 L con suero de leche cocido a una concentración de lactosa de 37.43 g/L inicial, una relación molar de carbono:nitrógeno de 15:1 y un tamaño de inóculo de 5 % (v/v). Estos valores corresponden a las variables X, S y P, respectivamente.
3. Definir el método de aproximación Runge-Kutta 4, el tiempo inicial de 0, tiempo final de 72 y un incremento diferencial de 0.02

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME = 72

DT = 0.02

4. Establecer las expresiones del modelo de Monod modificada para sustrato limitante i y el modelo de Luedeking-Piret. Definir además las expresiones de las velocidades de reacción para biomasa (RX), sustrato (RS) y producto (RP).

$u = u_{max} \cdot (S-i) / (K_s + (S-i))$

$RX = u \cdot X$

$RS = -RX / Y_x$

$RP = ((a \cdot u) + b) \cdot X$

$d/dt (X) = RX$

$d/dt (S) = RS + K_a \cdot (e^{-(k \cdot TIME)})$

$d/dt (P) = RP$

5. Definir los valores iniciales de biomasa, concentración de sustrato y de producto.

INIT S=37.425

INIT X=1.124

INIT P =0.005

i=24.35

6. Definir las variables descritas en los modelos en valores de 0 para su posterior ajuste. Estas son μ_{max} que corresponde a la velocidad máxima de crecimiento, K_s es la constante de afinidad al sustrato, Y_x es el rendimiento de biomasa respecto al sustrato, K_a es la constante que ajusta el modelo exponencial en la expresión de velocidad de consumo de sustrato, k es la constante de transformación, e es la constante de Euler, a es la constante alfa del modelo de generación de producto asociado a crecimiento, o bien el rendimiento de producto respecto al sustrato, y b es la constante de generación de producto no asociado a crecimiento.

$\mu_{max}=0$
 $K_s=0$
 $Y_x=0$
 $K_a=0$
 $k=0$
 $e=2.718281828459$
 $a=0$
 $b=0$

7. Ajustar las variables de μ_{max} , K_s y Y_x respecto con los valores experimentales de crecimiento de biomasa X con la función Curve Fit. Anotar los datos que devuelve el software. Estos serán los parámetros del modelo de Monod y de la expresión de velocidad de formación de biomasa.
8. Ajustar las variables de K_a y k respecto con los valores experimentales de consumo de sustrato S con la función Curve Fit. Anotar los datos devueltos por el software, que serán los parámetros para la expresión de velocidad de consumo de sustrato.
9. Ajustar las variables a y b respecto con los valores experimentales de formación de producto P con la función Curve Fit. Anotar los datos devueltos por el software, que serán los parámetros para la expresión de velocidad de generación de producto.
10. En caso de ser necesario, definir Sliders de las variables analizadas (μ_{max} , K_s , Y_x , K_a , k , a y b), rangos e incrementos para cada variable evaluada y modificar los valores a los datos experimentales para un mejor ajuste del modelo.
11. Determinar las ecuaciones desarrolladas para formación de biomasa (RX), consumo de sustrato (RS) y generación de producto (RP).

Resultados

Cuadro 1: Propiedades evaluadas del suero de leche respecto al pH y concentraciones de lactosa, nitrógeno y fosfatos a utilizar en las fermentaciones por *B. subtilis* para la producción de PHA.

Tipo de suero	pH (± 0.01)	Concentración de lactosa (+0.01 g/L)	Concentración de nitrógeno (+0.1000 g/L)	Concentración de fosfatos (± 0.100 g/L)
Crudo	4.22	54.92	0.087	0.85
Cocido	3.52	46.53	0.083	0.68

Cuadro 2: Identificación de grupos funcionales en la estructura del producto de fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a 37°C y 200 rpm a escala de 10 L y razón molar C:N de 15:1 a partir de las señales características del espectro IR para la evaluación de la producción de PHA

Grupos funcionales	Intervalo de frecuencias (cm^{-1})	Transmitancia (%)
Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	60-70 y 80-85
Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	65
Hidroxilo: tensión C-O	1100-1050	70-75

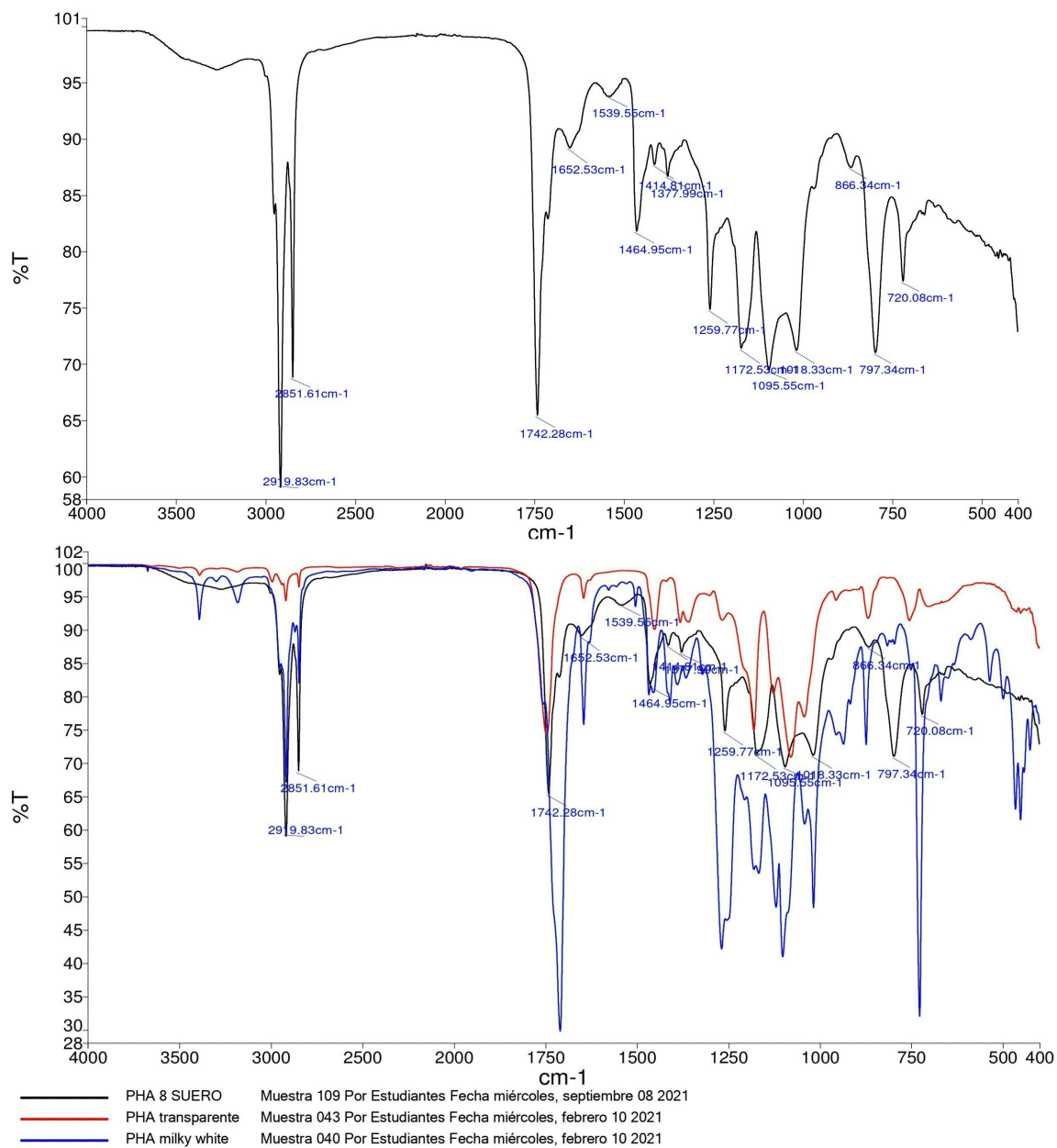
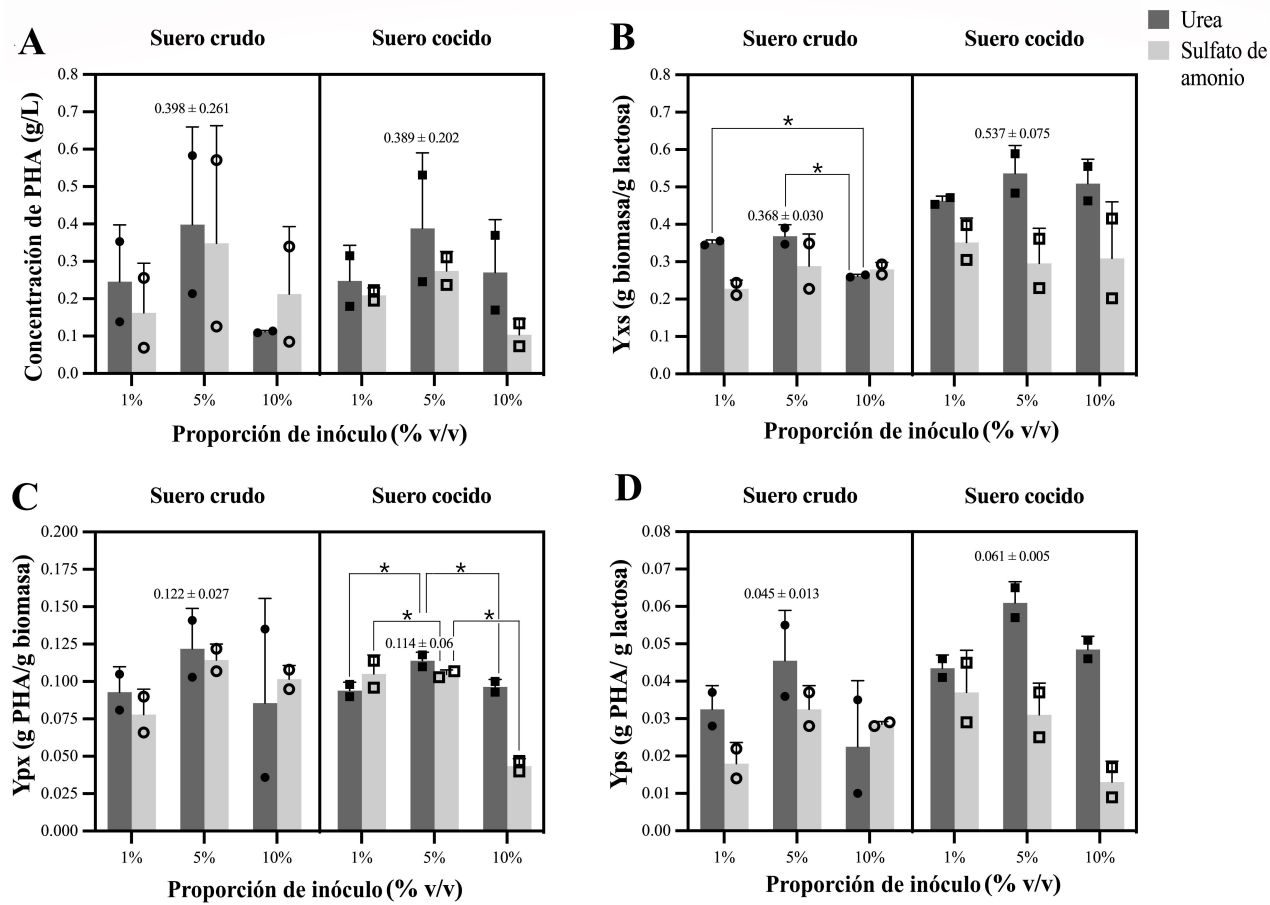


Figura 11: Espectro infrarrojo del producto de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a 37°C y 200 rpm a escala de 10 L y razón molar C:N de 15:1 para la evaluación de la producción de PHA con referencia a los estándares comerciales.



*Diferencia de medias estadísticamente significativa

Figura 12: Efecto de la proporción de volumen de inóculo en % v/v y el tipo de suero de leche en los valores promedio de (A) la concentración de producto en g/L, (B) el rendimiento de biomasa respecto al sustrato Y_{XS} , (C) el rendimiento de producto con respecto a la biomasa, Y_{PX} y (D) el rendimiento de producto con respecto al sustrato Y_{PS} en la fermentación de lactosa en suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA.

Se trabajó a escala de 80 mL por 48 h a pH 7.1, 37°C y 200 rpm, con proporciones de volumen de inóculo variables entre 1, 5 y 10% (v/v) una presión atmosférica de 0.844 atm.

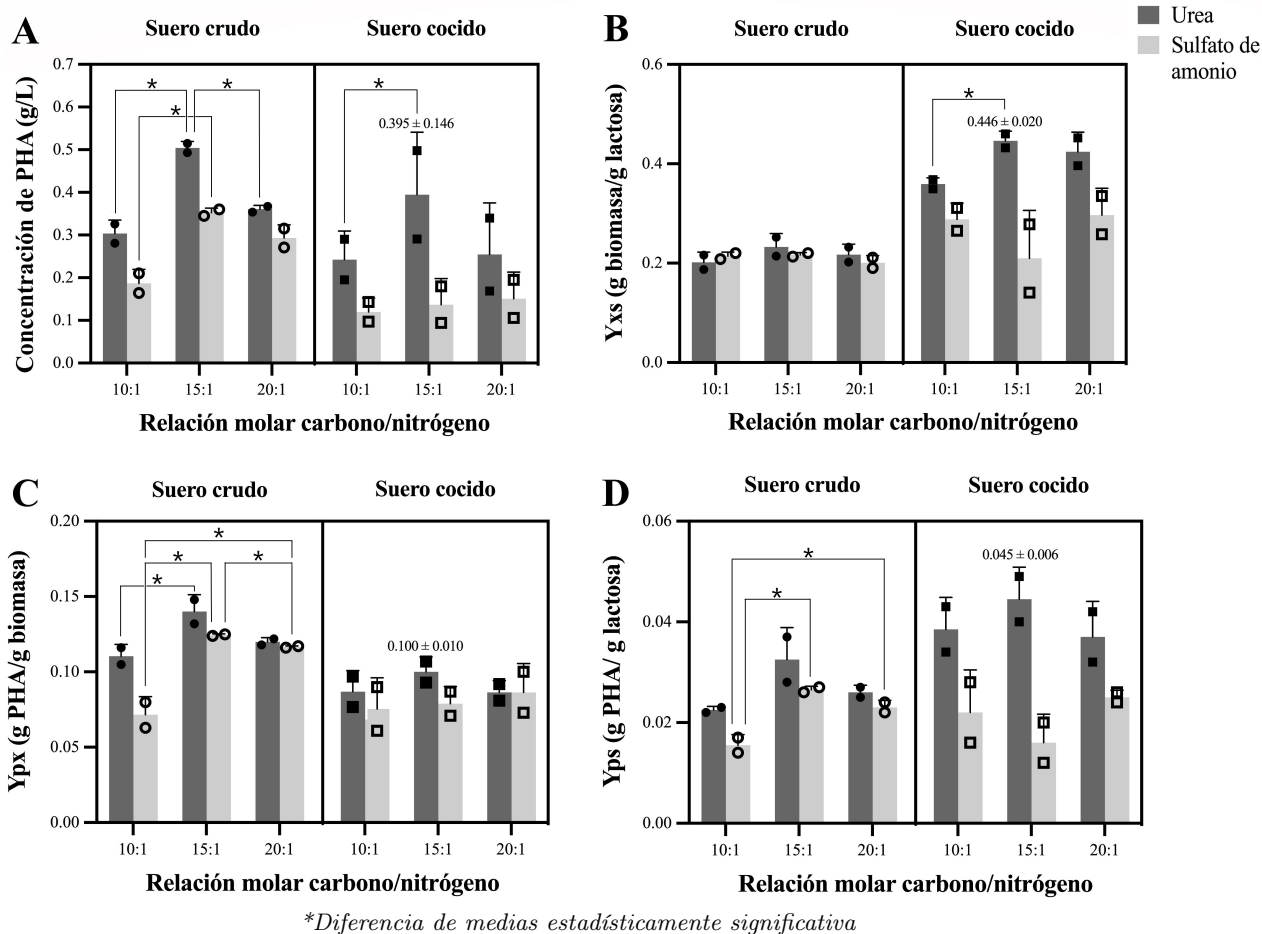
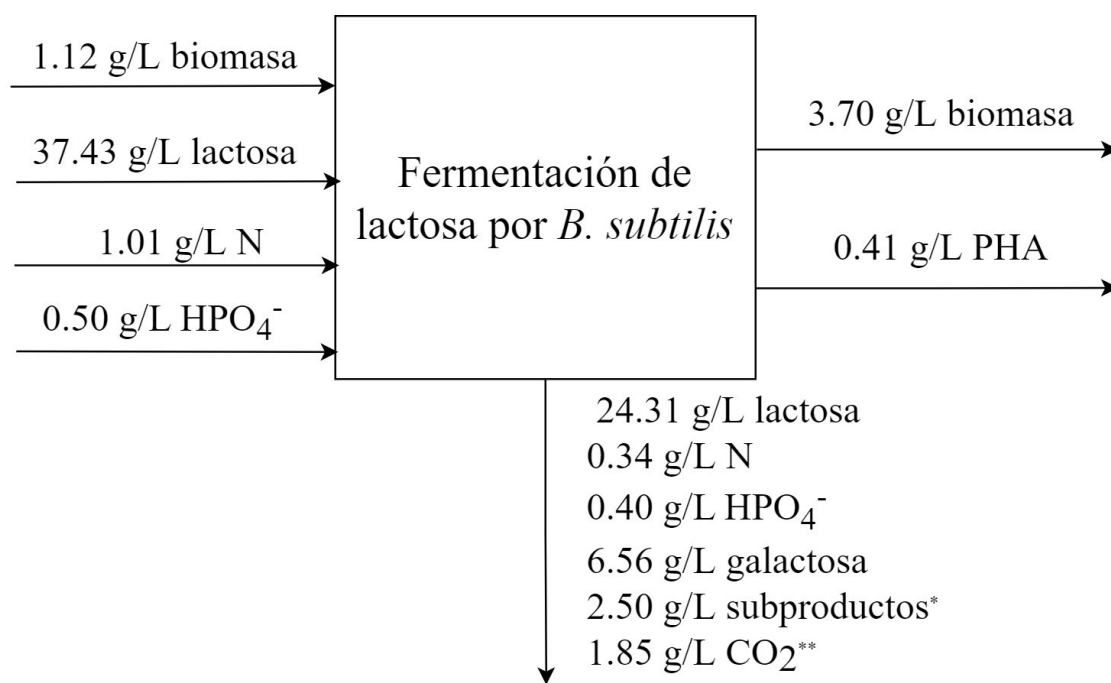


Figura 13: Efecto de la relación molar de carbono y nitrógeno y el tipo de suero de leche en los valores promedio de (A) la concentración de producto en g/L, (B) el rendimiento de biomasa respecto al sustrato Y_{XS} , (C) el rendimiento de producto con respecto a la biomasa, Y_{PX} y (D) el rendimiento de producto con respecto al sustrato Y_{PS} en la fermentación de lactosa en suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA.

Se trabajó a una escala de 80 mL por 48 h a pH 7.1, 37°C y 200 rpm, con una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v) y a presión atmosférica de 0.844 atm.



*Subproductos cuantificados: etanol y ácido láctico,

* Indicativo del mantenimiento celular y producción de subproductos no cuantificados

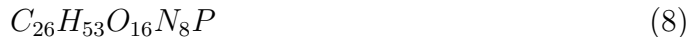
Figura 14: Balance de masa global de la fermentación de lactosa en suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a escala de 10 L durante 72 h a pH 7.1, 37°C y 200 rpm, con una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v) y a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 3: Rendimientos promedio de formación de biomasa, producto y subproductos respecto al consumo de lactosa, Y_L y glucosa Y_G en la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA

Componente	Y_L (g/g entradas totales)	Y_G (g/g entradas reales)
Biomasa	0.185 ± 0.008	0.351 ± 0.019
Productos	0.031 ± 0.003	0.063 ± 0.007
Subproductos	0.190 ± 0.076	0.380 ± 0.153
Mantenimiento celular	0.593 ± 0.077	0.206 ± 0.154

Donde: Y_L : Rendimiento usando lactosa como fuente de carbono, Y_G : Rendimiento usando glucosa como fuente de carbono. Los rendimientos respecto al consumo de glucosa se derivaron de los rendimientos respecto al consumo de lactosa, considerando que un 50% de la lactosa consumida corresponde a glucosa disponible en el medio. Los datos fueron obtenidos a escala de 10 L durante 72 h a pH 7.1, 37°C y 200 rpm, con una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v) y a presión atmosférica de 0.844 atm.

Fórmula estequiométrica de *B. subtilis* producto de la fermentación de suero de leche para la generación intracelular de PHA



Ecuación estequiométrica de la reacción de fermentación de suero de leche en *B. subtilis* utilizando glucosa hidrolizada de lactosa para la producción intracelular de PHA

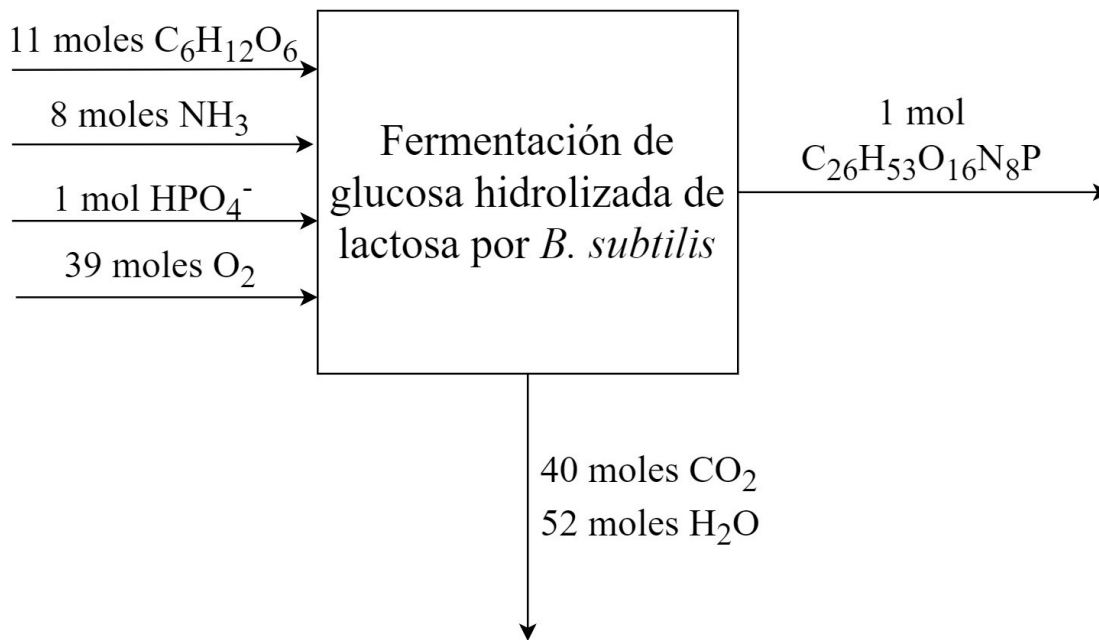
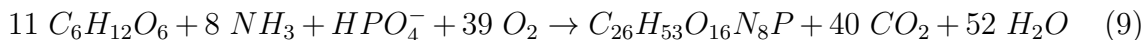


Figura 15: Balance de materia con las especies indicativas de la ecuación estequiométrica que representa la fermentación de lactosa en suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a escala de 10 L durante 72 h a pH 7.1, 37°C y 200 rpm, con una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v) y a presión atmosférica de 0.844 atm.

Expresión de la velocidad de formación de biomasa de *B. subtilis*

$$r_X = X \left(\frac{\mu_{max} (S - i)}{K_s + (S - i)} \right) \quad (10)$$

Expresión de la velocidad de consumo de lactosa

$$r_S = \frac{-X \left(\frac{\mu_{max} (S - i)}{K_s + (S - i)} \right)}{Y_{XS}} + K_A e^{kt} \quad (11)$$

Expresión de la velocidad de formación de PHA

$$r_P = X \left(\alpha \left(\frac{\mu_{max} (S - i)}{K_s + (S - i)} \right) + \beta \right) \quad (12)$$

Donde:

X = Concentración de células (g/L)

S = Concentración de sustrato (g/L)

i = Concentración limitante de sustrato (g/L)

Cuadro 4: Descripción de los parámetros del modelo cinético obtenidos del ajuste de datos experimentales por el software Berkeley Madonna para la fermentación de suero de leche por *B.subtilis* para la producción de PHA a una razón molar C:N 15:1

Parámetro cinético	Definición	Valor	Unidades
μ_{max}	Velocidad máxima de crecimiento celular	0.022	h^{-1}
K_s	Constante de afinidad al sustrato	0.151	g/L
Y_{XS}	Rendimiento de biomasa respecto al sustrato	0.224	g biomasa/g lactosa
K_A	Constante de ajuste de modelo exponencial	-0.311	h^{-1}
k	Constante de transformación	-0.251	h^{-1}
α	Constante de formación de producto asociada a crecimiento celular	0.057	g PHA/g biomasa
β	Constante de formación de producto no asociada a crecimiento celular	0.001	h^{-1}

Los datos fueron obtenidos del duplicado de la fermentación de suero de leche cocido a escala de 10 L durante 72 h a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, con una proporción de volumen de inóculo del 5% (v/v) y una razón molar C:N de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno, a presión atmosférica de 0.844 atm.

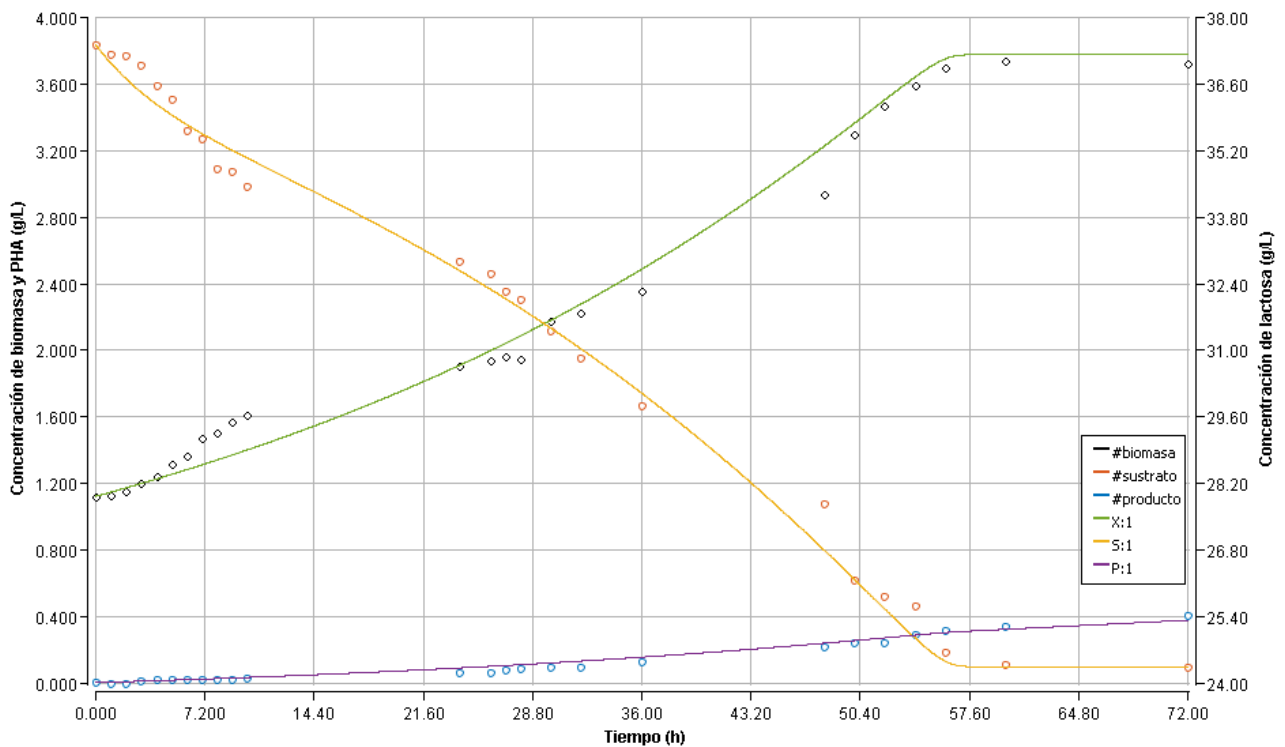


Figura 16: Ajuste de datos experimentales para la determinación de parámetros de modelo cinético de la fermentación de lactosa en suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a una razón molar de carbono:nitrógeno de 15:1 en el software Berkeley Madonna®.

Los datos fueron obtenidos de la cuantificación de biomasa, lactosa y PHA en el tiempo durante la fermentación de suero de leche cocido a razón molar de 15:1, a una escala de 10 L a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm. Se utilizó urea como fuente de nitrógeno y una proporción de volumen de inóculo del 5% (v/v). Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.

Código:

Puntos negros: Datos experimentales de concentración celular respecto al tiempo

Puntos naranjas: Datos experimentales de concentración de lactosa respecto al tiempo

Puntos azules: Datos experimentales de concentración de PHA respecto al tiempo

Curva verde: Modelo de ajuste de crecimiento celular

Curva naranja: Modelo de ajuste de consumo de sustrato

Curva morada: Modelo de ajuste de formación de producto

Discusión de resultados

Se llevó a cabo la evaluación de la producción de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de la fermentación de suero de leche por la cepa bacteriana *Bacillus subtilis*, determinando si este residuo de la industria láctea es una materia prima útil para la producción del biopolímero. Se analizaron dos tipos de suero, crudo y cocido, que fueron caracterizados en cuanto a pH y concentraciones de lactosa, nitrógeno y fosfatos, nutrientes relevantes para la fermentación (Cuadro 1). El principal sustrato fermentable en el suero, y el que genera el estrés metabólico necesario para la formación de PHA, es la lactosa, cuantificada en 54.92 g/L en el suero crudo y 46.53 g/L en el suero cocido. Ambos valores se encuentran en el rango previsto para estos tipos de suero, entre 30-50 g/L, y por lo tanto pudieron evaluarse como fuentes ricas en carbono. Asimismo, se determinó la concentración de nitrógeno para ambos tipos de suero, de 0.087 g/L en el suero crudo y 0.083 g/L en el suero cocido. Estos resultados indicaron la necesidad de agregar al medio una fuente de nitrógeno que favoreciera el crecimiento del microorganismo y permitiera controlar las condiciones que propician la formación del biopolímero (Motta-Correa y Mosquera, 2015; Amaro, *et al.*, 2019).

A partir de las pruebas experimentales pudo determinarse que la lactosa en el suero de leche es un sustrato que puede utilizarse para la generación de PHA, comprobado mediante el análisis del espectro IR del producto de la fermentación a escala de 10 L (ver Figura 11). Se identificaron en el espectro las señales correspondientes a los grupos funcionales que conforman la estructura característica de los PHA, principalmente el polihidroxi-butirato, un tipo de PHA producido en su mayoría por la cepa *B. subtilis* (Ver Figuras 2 y 4). Además, dicho espectro se comparó con estándares comerciales de PHA (Figura 11), con lo que pudo confirmarse la formación del biopolímero. Entre las señales identificadas, destacan las vibraciones dadas por la torsión y tensión de enlaces C-H de alcanos en los intervalos descritos en el Cuadro 2, mostrando la formación de un polímero por la formación de cadenas de carbono. Asimismo, se observan las señales correspondientes a la tensión del enlace C=O del grupo carbonilo, y la torsión del enlace C-O del hidroxilo, que conforman el enlace éster saturado

-O-C=O cercano a una frecuencia de 1750 cm^{-1} , generado por la polimerización de un ácido carboxílico y un hidroxilo de los monómeros de hidroxibutirato, mostrando nuevamente la formación de un polímero. Estos mismos enlaces y por lo tanto la estructura del producto pudieron identificarse en todas las pruebas realizadas, cuyos espectros y descripción se encuentran en las Figuras 17, 18, 19 y 20 y sus respectivos cuadros en el Anexo A (González, 2008; Molina, 2016).

Se observan en la Figura 11 ciertas variaciones de las señales características del producto respecto a los estándares comerciales en cuanto a la transmitancia. Dichas variaciones, principalmente en las señales que corresponden al enlace carbonilo característico del biopolímero, pueden deberse a la formación de cadenas de menor tamaño o bien, a la acumulación de alguno de los intermediarios de la síntesis, que pudo darse por las condiciones del medio y el tiempo de fermentación, al no permitir la formación adecuada de cadenas largas del polímero o bien, al provocar su degradación. Asimismo, la presencia de impurezas y residuos del medio fermentativo también pudieron generar el fenómeno observado en los espectros IR, pues el producto extraído no se encontraba completamente puro, debido al proceso de separación. No obstante, a pesar de los fenómenos observados, que serán discutidos más adelante, es posible mostrar que se formó el producto esperado del presente trabajo (González, 2008; Molina, 2016).

Determinando que el suero de leche es un sustrato del cual pueden producirse PHA, se evaluaron las siguientes condiciones relacionadas a los rendimientos de la fermentación: el efecto de la proporción de volumen de inóculo de la bacteria, la fuente de nitrógeno disponible para su uso y la razón molar de carbono:nitrógeno que propicie esta formación, que se da en condiciones de estrés metabólico ante un exceso de carbono y deficiencia de otros nutrientes, como nitrógeno. Se buscó mantener las condiciones físicas para todas las fermentaciones, definidas por el estudio previo realizado por Peña-Jurado y colegas (2019) con los siguientes valores: temperatura de 37°C , pH de 7.0- 7.5 y agitación a 200 rpm, en condiciones de oxígeno limitado en recipientes sellados sin flujo de oxígeno durante 48 h a la presión atmosférica de la Ciudad de Guatemala de 0.844 atm.

En la primera parte se llevó a cabo la evaluación del efecto del tipo de suero, proporción de volumen de inóculo, fuente de nitrógeno y relación carbono:nitrógeno que mejoran la producción de PHA (Figuras 12 y 13). Se evaluaron estas variables debido a que su efecto es determinante en este tipo de fermentación. En cuanto al tipo de suero de leche, se evaluó suero crudo y suero cocido. El suero crudo se genera después de la precipitación de la caseína de la leche durante la producción de quesos y se caracteriza por tener un contenido proteico de alrededor del 1-3% (m/v). Por otro lado, el suero cocido contiene menos del 1% (m/v), pues pasa por un proceso posterior de precipitación de proteínas como las lactoalbúminas y lactoglobulinas, durante la producción de otros derivados. Aunque el contenido de lactosa en ambos tipos de suero es similar, entre 3-5% (m/v), la presencia de proteínas solubles puede generar una diferencia en los resultados de la fermentación (Motta-Correa y Mosquera, 2015).

Inicialmente, debido al proceso de esterilización al cual se somete el suero de leche, que suele darse mediante incrementos de temperatura hasta los 121°C en una autoclave, se genera una precipitación no deseada de proteínas, que pueden provocar el impedimento del crecimiento de la bacteria pues se reduce la probabilidad de contacto con el sustrato. Además, este contenido de proteínas altera la composición del medio, principalmente por los niveles de nitrógeno disponibles, por lo que se reduce la diferencia con el contenido de

carbono necesario para generar el estrés metabólico en el cual se producen los PHA. Se determinó para ambas pruebas (Figuras 12 y 13) un mayor crecimiento de biomasa (Y_{xs}) y una mayor generación del producto (Y_{ps}), ambos respecto al consumo de lactosa de suero cocido, evidenciando su efecto en la disponibilidad de sustratos en el medio (Motta-Correa y Mosquera, 2015; Amaro, *et al.*, 2019).

Por otro lado, se evaluó la fuente de nitrógeno empleada debido a que, por su naturaleza, puede tener un efecto distinto en los rendimientos de la fermentación. Además de ser un sustrato indispensable para el crecimiento de las bacterias debido al requerimiento de este elemento para la síntesis de proteínas y otros compuestos nitrogenados, es también un factor influyente en la síntesis de PHA, sobre todo para cepas del género *Bacillus*. Una limitación de nitrógeno en el medio, aunado a un exceso de carbono, es decir de fuente de energía, genera una limitación en la duplicación del número de bacterias y conduce a la acumulación del carbono en compartimentos intracelulares llamados cuerpos de inclusión, en la forma de polímeros como los PHA. Por tanto, se evaluaron la urea y el sulfato de amonio, como fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, respectivamente, pues en estudios previos como el de Peña-Jurado y colegas (2019), se demostró que generan un estrés metabólico adecuado para la producción del biopolímero. Ambos son sustratos metabolizables por *B. subtilis* y contienen la misma cantidad de nitrógeno en moles, por lo que son materias comparables (Chai, *et al.*, 2012; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Se observó que en la mayor parte de las pruebas realizadas a escala de 80 mL (Figuras 12 y 13) la urea demostró mejores resultados en cuanto a crecimiento de biomasa y generación de producto, en comparación con el sulfato de amonio. Esto se debe a que la urea, por su naturaleza orgánica y por ser una molécula polar sin carga, es asimilada de mejor manera por la bacteria, pues se difunde a través de la membrana con mayor facilidad que el sulfato de amonio, mediante transportadores transmembranales. La urea es entonces metabolizada en la bacteria por una enzima ureasa, que a través de hidrólisis genera dos moléculas de amoníaco disponibles para el consumo su consumo. Por el contrario, el sulfato de amonio es una sal iónica que al entrar en contacto con el medio se disocia en iones amonio y sulfato, cuya asimilación por la célula a través de la membrana es más complicada por el diferencial de cargas generado. Además, su disociación también puede alterar los niveles de pH en el medio, y usualmente genera la precipitación de proteínas debido a que provoca un cambio en las fuerzas iónicas de la solución de fermentación. Dado que el suero contiene proteínas solubles como la albúmina y globulinas, como se menciona anteriormente, el sulfato de amonio puede provocar su precipitación no deseada, y por lo tanto ser un factor influyente en la fermentación (Chai, *et al.*, 2012; Pang, *et al.*, 2019; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Se evaluó inicialmente la proporción del volumen de inóculo agregado al medio fermentativo, junto a las dos variables previamente mencionadas: el tipo de suero y la fuente de nitrógeno, y los resultados se observan en la Figura 12. Se analizaron la concentración de PHA en g/L, y los rendimientos globales de generación de biomasa y formación de producto respecto al consumo de lactosa (Y_{xs} y Y_{ps} , respectivamente), así como la generación de producto con respecto a la formación de biomasa (Y_{px}), para proporciones de 1, 5 y 10%(v/v) de inóculo. Esta propiedad fue evaluada pues en las fermentaciones de formación de biopolímeros de tipo PHA a partir de sustratos con altas concentraciones de carbono, es indispensable mantener un crecimiento celular adecuado y limitado que permita la acumulación del producto deseado. Es decir, el sistema biológico a emplear debe ser capaz de

adaptarse adecuadamente al medio y crecer a una tasa determinada que favorezca el producto, sin verse afectada su viabilidad y por lo tanto efectividad. Las proporciones de inóculo evaluadas son utilizadas con frecuencia para distintos procesos fermentativos, y por lo tanto es necesario seleccionar la que mejore los resultados en el sistema evaluado (Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Para estandarizar los inóculos y que pudieran ser comparables en todas las pruebas, se realizaron los conteos celulares por el método de Neubauer para la determinación de células viables. Fueron evaluados los inóculos iniciales en caldo nutritivo y las primeras adaptaciones realizadas en ambos tipos de suero, crudo y cocido (Cuadros [12](#) y [13](#) en Anexo B). En todos los casos se mantuvo un conteo de células viables en la magnitud de 10^7 , lo cual indica no solo una densidad de células viables adecuada para llevar a cabo las fermentaciones, sino también permite la comparación de las proporciones de volumen de inóculo a evaluar a partir de resultados precisos (Sharma y Bajaj, 2015).

Se observa que para los parámetros mencionados, tanto en el caso del suero de leche crudo como cocido y para ambas fuentes de nitrógeno, se obtuvieron los mejores resultados de rendimiento de biomasa y producto utilizando un inóculo del 5 % (v/v) (Figura [12](#)). La obtención de un mayor crecimiento celular y formación de producto a esta proporción de volumen de inóculo se debe a que posee la viabilidad adecuada que favorece el consumo de sustratos y por lo tanto el crecimiento celular, sin verse alterado por algún impedimento en el medio. Un inóculo del 1 % (v/v) puede resultar como una densidad de células baja con respecto al volumen total de la fermentación, llevando a cabo un crecimiento lento y por lo tanto afectando la efectividad de la operación. Asimismo, debido a que se trabaja con un exceso del sustrato, en este caso lactosa, las enzimas que lo asimilan no son sintetizadas inmediatamente y puede darse una inhibición del crecimiento por el sustrato. Por el contrario, al utilizar un inóculo del 10 % (v/v) de la bacteria, además de implicar un mayor consumo de materiales y energía previo a la fermentación como tal, su efecto puede llegar a ser contraproducente pues es posible que inhiba el crecimiento. Esto se da pues las células compiten por los sustratos limitados para generar el estrés metabólico necesario, principalmente nitrógeno y oxígeno, por lo que se reduce su disponibilidad (Sharma y Bajaj, 2015; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

A continuación, se evaluó la variación de la fuente de nitrógeno y el tipo de suero a utilizar, con respecto a la relación molar de carbono:nitrógeno en el medio, utilizando un inóculo del 5 % (v/v) según lo determinado previamente. Como se menciona, el nitrógeno es un sustrato indispensable para el crecimiento bacteriano, pero también es un factor determinante en la producción de PHA. Se eligieron las razones molares de 10:1, 15:1 y 20:1 con base en lo reportado por Peña-Jurado y colegas (2019), cuya experimentación y análisis estadísticos determinaron los mejores resultados a una razón másica de 17.5:1. Realizando las correcciones para un análisis a nivel molar, debido a que una relación másica puede no ser representativa en cuanto al contenido real de carbono y nitrógeno, se obtuvo que las relaciones molares se encuentran en el rango de 10:1-20:1 y por lo tanto fueron evaluadas. Bajo este criterio, se buscó simular una condición con exceso de nitrógeno en la relación 10:1, un valor intermedio en 15:1 y una limitación de nitrógeno en 20:1.

Se observó en los resultados (Figura [13](#)) que se obtuvo un mayor rendimiento de la biomasa y de PHA respecto al consumo de lactosa y una mayor concentración de PHA en g/L a la razón de C:N de 15:1, en comparación con las relaciones 20:1 y 10:1, tanto para

el suero crudo como cocido y en ambas fuentes de nitrógeno. Esto muestra que existió una diferencia entre el contenido de carbono respecto al de nitrógeno en el medio que propició la formación del producto deseado. Las diferencias encontradas en la concentración de PHA en g/L y de PHA respecto a la biomasa fueron, en su mayoría, significativamente mayores entre las relaciones 15:1 y 10:1. Esto demuestra que fue posible alcanzar la condición de exceso de nitrógeno en la cual se reduce la acumulación del biopolímero con la relación molar de 10:1, y, por lo tanto, es la que menos favorece su producción. No obstante, no fue posible determinar significativamente una diferencia entre los rendimientos a las relaciones 15:1 y 20:1, y por ende no puede concluirse cuál es la condición que favorece más el crecimiento. Es posible que la sensibilidad de la formación de producto a la relación C:N en el sistema evaluado sea baja, y se requiere de un rango más amplio para la determinación precisa de su efecto en los rendimientos de producción del biopolímero (Cui, *et al.*, 2017; Mohapatra, *et al.*, 2017; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Se observa además en la Figura 13 que los rendimientos de producción de PHA en relación con la biomasa (Y_{px}), se mantienen más o menos constantes, con valores cercanos 0.100 g PHA/g biomasa para el suero cocido y utilizando urea como fuente de nitrógeno, y siendo ligeramente mayor para la relación 15:1 en el suero crudo. Por otro lado, el rendimiento de biomasa respecto al sustrato (Y_{xs}) en el suero cocido y utilizando urea fue mayor a la razón de 15:1, con un valor de 0.446 g biomasa/ g lactosa, seguido de la razón 20:1 y la razón 10:1. Esto provoca que el rendimiento de PHA respecto al consumo de lactosa (Y_{ps}) sea mayor para la razón 15:1, de 0.045 g PHA/g lactosa. Se ha reportado en otros estudios que un exceso de nitrógeno a razón C:N de 5:1 provoca un mayor crecimiento celular a una producción de PHA constante, por lo que se reduce el rendimiento de producto respecto a biomasa, como se esperaba evidenciar en la razón 10:1 estudiada. Por otro lado, ante razones molares C:N entre 20-35, se ha comprobado un mejoramiento en la producción de PHA a un crecimiento de biomasa limitado, dado por el contenido también limitado de nitrógeno, como se esperaba encontrar en las relaciones 15:1 y 20:1. Este fenómeno no se observó en los resultados, pues la formación de PHA respecto a la biomasa se mantuvo constante, y por lo tanto su producción respecto al consumo de sustrato dependió únicamente del crecimiento celular. Aunque pudo generarse la mayor concentración de producto en las relaciones 15:1 y 20:1, no fue posible determinar con exactitud el efecto de la limitación de nitrógeno en la capacidad de producción del biopolímero, pues no se limitó el crecimiento celular (Cui, *et al.*, 2017; Mohapatra, *et al.*, 2017).

Es recomendable continuar evaluando dicho efecto en un rango más amplio de relación C:N, de 5-50 mol C/mol N por ejemplo, que permitan demostrar cómo ocurre la formación del producto y a qué condiciones es favorecido, sobre todo para determinar la cantidad de nitrógeno en la cual el crecimiento celular se limite y se favorezca la acumulación del exceso de carbono como el biopolímero, con la cual se alcanzan los mayores rendimientos. Esto además permitiría concluir si la relación 15:1 realmente es la más adecuada para el sistema evaluado o si puede incrementarse aún más el rendimiento. No obstante, no es recomendable que sean superiores a 50 mol C/mol N, que usualmente se dan en el suero de leche sin la adición de una fuente de carbono adicional, debido a que, en estas condiciones, se puede generar una inhibición del crecimiento celular dada por la baja disponibilidad de nitrógeno para la síntesis de proteínas (Cui, *et al.*, 2017; Mohapatra, *et al.*, 2017).

Como se propuso para esta investigación, al determinar que es posible la síntesis de PHA a partir de la fermentación de lactosa en suero de leche por *B. subtilis*, y con base en los resultados previos, se llevó a cabo la fermentación a una escala de 10 L en el reactor tipo STR New Brunswick Bioflo 415, manteniendo las condiciones físicas previamente mencionadas (T: 37°C, pH: 7.1, agitación: 200 rpm, oxígeno limitado). Se utilizó suero de leche cocido con el fin de simular un suero procesado para la fermentación, al cual se le han retirado la mayoría de las proteínas que puedan impedir la asimilación del sustrato y por lo tanto reducir los rendimientos, como se mostró previamente. De este proceso, en el cual ingresa suero de leche crudo y se obtiene suero cocido por una serie de precipitaciones, se obtiene como residuo aproximadamente el 65 % de las proteínas en dicha materia, que pueden ser utilizadas en otros productos, principalmente alimentos como el queso ricotta y suplementos como la proteína hidrolizada. Al escalar el proceso, el aprovechamiento de este nuevo residuo corresponde a un modelo de economía circular, y por lo tanto agrega aún más valor a esta materia de desecho, además del valor que le otorga la formación del biopolímero (Motta-Correa y Mosquera, 2015; Amaro, *et al.*, 2019).

Para este proceso a escala de 10 L, se utilizó un tamaño de inóculo del 5 % (v/v) pues se mostró que permite un crecimiento celular adecuado para la fermentación. También se utilizó a la urea como principal fuente de nitrógeno, pues además de generar los mejores rendimientos de producción de biomasa y producto entre ambas fuentes de nitrógeno, también es un material con un costo menor al del sulfato de amonio y de mayor disponibilidad, lo cual favorecería el proceso al incrementar la escala de trabajo. Por último, dado que no se observó una diferencia significativa entre las relaciones molares C:N de 15:1 y 20:1, se escogió la relación 15:1 para la evaluación de la estequiometría y cinética de la fermentación al alcanzar una mayor concentración de PHA de 0.395 g/L.

Se generó el balance de masa global y molar de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis*, analizando las entradas y salidas cuantificables del proceso. El balance de masa global para este proceso se demuestra en la Figura 14, en la cual se observan como entradas a la biomasa inicial de la bacteria, la lactosa del suero de leche, nitrógeno elemental proveniente de la urea y los fosfatos como fuente de fósforo en el medio. Como producto, se obtienen a la biomasa bacteriana formada y al PHA, cuantificados de forma separada con el motivo de evaluar el rendimiento de su formación respecto al consumo de sustratos. Con este pudo cuantificarse una concentración máxima de producto de 0.41 g/L. Por último, se demuestran las salidas de sustratos no utilizados, es decir el nitrógeno, fosfatos, lactosa y galactosa, uno de los monosacáridos que conforman la lactosa. Se cuantificaron, además, como subproductos el etanol y ácido láctico, los principales productos de las fermentaciones alcohólica y láctica, respectivamente, que ocurren en esta cepa bacteriana bajo las condiciones limitadas de oxígeno a las cuales se evaluó la producción de PHA. Por último, se indica el mantenimiento celular, que según la expresión de la fermentación se traduce en la producción de CO_2 , agua y otros compuestos no cuantificados, dados en la respiración celular y los procesos metabólicos secundarios de la bacteria (Chai, *et al.*, 2012; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

A partir de este balance, se determinaron los rendimientos de formación de biomasa, productos y subproductos con base en el consumo de sustratos (Cuadro 3). Se evaluaron el rendimiento respecto al consumo de lactosa (Y_L), el sustrato cuantificado, y respecto al consumo de glucosa (Y_G), determinado como el 50 % del consumo de lactosa, siendo esta su única fuente en el suero de leche. La glucosa es el sustrato que realmente está siendo utilizado

para la formación de biomasa y generación de producto, pues *B. subtilis* carece del gen *galE*, que sintetiza a la enzima GalE, una epimerasa que convierte la galactosa en glucosa para que sea metabolizada. Por tanto, fue indispensable su evaluación para determinar cómo se aprovecha la lactosa en la fermentación, con lo que se determinaron rendimientos 2 veces mayores a los cuantificados con lactosa. Se observaron rendimientos de producción de PHA de 0.031 y 0.063 respecto al consumo de lactosa y glucosa, respectivamente. Este valor es significativamente menor en comparación con los rendimientos de formación de biomasa (0.185 g/g lactosa, N y P y 0.351 g/g glucosa, N, P) y de generación de subproductos (0.190 g/g lactosa y 0.380 g/g glucosa), lo cual indica que la mayoría del consumo de sustrato no es aprovechado para la formación de producto (Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019).

Asimismo, este valor fue significativamente menor a los valores del mantenimiento celular, de 0.593 y 0.206 respecto al consumo de lactosa y glucosa, respectivamente. En este se consideran los subproductos generados durante el proceso de respiración celular de la bacteria, dado por las rutas metabólicas de descomposición de los carbohidratos, principalmente dióxido de carbono y agua. También implican la formación de otros productos de metabolismo secundario no cuantificados. Aunque un alto rendimiento de biomasa es favorable, pues el contenido de PHA suele ser proporcional a la cantidad de células, es preferible que el sustrato se dirija a la acumulación del biopolímero en la célula, más que a su crecimiento y mantenimiento. Asimismo, se observa que gran parte del sustrato es utilizado para la generación de subproductos, que además de no ser lo que se busca en esta fermentación, pueden afectar las condiciones del medio, pues el etanol puede llegar a ser tóxico para la bacteria si se acumula, mientras que la producción de ácido láctico u otros ácidos orgánicos pueden provocar su acidificación y por lo tanto, alterar el crecimiento bacteriano y las condiciones de formación de PHA (Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019).

Se buscó bajo este principio la determinación del balance de materia de la fermentación, que, a diferencia del global, involucra únicamente a las especies que actúan en la formación de PHA, considerando a la bacteria como un catalizador de la reacción y cuantificando únicamente su formación debido al cambio de la concentración de sustratos. A diferencia del balance de masa global, esta simplificación permite obtener una ecuación que identifique los consumos exactos de sustratos y la formación de productos derivada de los mismos a nivel estequiométrico. Bajo este criterio, como se observa la Figura 15, se evaluó como entradas a la glucosa como la fuente de carbono, generada de la hidrólisis de lactosa y cuantificada como el 50% de su consumo, al amoníaco como fuente de nitrógeno formado a partir de la hidrólisis de la urea, a los fosfatos como fuente de fósforo y se evaluó también el oxígeno, que aunque se encontraba en cantidades limitadas, es un compuesto fundamental para el metabolismo celular. A partir de esto, se obtiene como principal producto a la célula de la bacteria, con una modificación dada por la acumulación intracelular de PHA, y como subproductos del proceso metabólico, al dióxido de carbono y agua (Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019).

Con base en el balance de materia y los rendimientos de consumo de sustratos respecto al consumo de glucosa, se obtuvo la ecuación estequiométrica representativa de la fermentación de suero de leche para la formación de PHA de forma intracelular en *B. subtilis*, descrita en la Ecuación 9. Además, a partir de este balance, se obtuvo la fórmula estequiométrica de la bacteria utilizada con producción intracelular de PHA a partir de la fermentación de suero de leche a las condiciones determinadas, según la Ecuación 8. Esta

ecuación, en la forma de $C_{26}H_{53}O_{16}N_8P$, cuya forma simplificada respecto al carbono es $CH_{2.08}O_{0.60}N_{0.32}P_{0.04}$ difiere de la ecuación estequiométrica promedio de las bacterias, que suele ser $CH_{1.81}O_{0.52}N_{0.21}P_{0.023}$. La diferencia en las fórmulas se da por la acumulación esperada de PHA, debido a que, como se mencionó anteriormente, se forman en inclusiones intracelulares dentro de la bacteria, protegidos por membranas formadas principalmente de proteínas y lípidos. Esta acumulación altera la composición general de la bacteria, pues se encuentra en condiciones de estrés metabólico, y por lo tanto el comportamiento celular es anormal. Esto se muestra por un mayor contenido de carbono, hidrógeno y oxígeno, los principales elementos que componen la estructura de los PHA, así como niveles mayores de nitrógeno y fósforo dados por la formación tanto de las enzimas necesarias para llevar a cabo la ruta metabólica, como para la formación de las inclusiones (Lee, 2001; Bajali, 2013; Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019).

A partir de este modelo elemental y un balance de materia global, es posible determinar si las condiciones de la fermentación fueron las adecuadas para llevar a cabo el proceso. Puede observarse que se están utilizando cantidades en exceso de las entradas, principalmente de la fuente de carbono, en este caso la lactosa. Como se observa en la Figura 14, la lactosa no se aprovecha adecuadamente pues se obtiene en la salida alrededor del 65 % de lo que ingresa, además de la galactosa que no puede ser fermentada. Esto implica que únicamente una fracción del sustrato fermentable es utilizada realmente. Para reducir su desecho y aprovechar el alto contenido de carbono, es posible la reutilización del medio fermentado, luego de un proceso adecuado de separación de la biomasa y los subproductos. Puesto que contiene la mayor cantidad del sustrato inicial, pueden evaluarse a esta concentración las condiciones que generen el estrés metabólico necesario para la formación de PHA, es decir que alcancen la relación C:N que mejore los rendimientos y, por lo tanto, se continúa con la producción. Asimismo, la galactosa en el medio puede ser tratada por procesos enzimáticos para transformarla a glucosa por la reacción de la enzima epimerasa, o bien, lo más recomendable es modificar a la bacteria para que pueda asimilar en su totalidad el principal sustrato evaluado (Shuler, *et al.*)

Por otro lado, también pudo observarse un rendimiento significativamente mayor de subproductos respecto con el del producto deseado, pues como se menciona anteriormente, el exceso de glucosa metabolizado a piruvato a través de la ruta de la glucólisis, bajo condiciones de oxígeno limitado, se dirige hacia otras rutas de metabolismo secundario, entre las que destacan las fermentaciones alcohólica y láctica. Esta derivación del piruvato hacia otras rutas perjudica los rendimientos de su producción, pues se reduce la acumulación de Acetil-CoA, formado de dicho producto de la glicólisis mediante la enzima piruvato deshidrogenasa, y que es el principal precursor de la formación de PHA (Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019).

Es recomendable llevar a cabo un estudio a nivel genómico que determine en qué condiciones se da una mayor expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de PHA, para que prevalezcan sobre las rutas fermentativas mencionadas. Por ejemplo, puede evaluarse la modificación de las rutas metabólicas para silenciar las enzimas que convierten el piruvato en etanol y ácido láctico (alcohol deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa, respectivamente). Además, para evitar condiciones anóxicas que provocan estas fermentaciones secundarias, y debido a que en la ecuación estequiométrica se observa un consumo significativo de oxígeno, puede evaluarse su aplicación en concentraciones determinadas para que se favorezca un mayor crecimiento celular, siempre teniendo en cuenta que debe ser limitado para propiciar

las condiciones en las cuales se genera el biopolímero deseado. Por último, es recomendable evaluar la modificación de la cantidad de entradas de nutrientes ingresadas al sistema fermentativo, principalmente de carbono y nitrógeno, que generan el estrés metabólico necesario sin agregar un exceso de nutrientes que podría generar pérdidas de materia prima utilizable, con el fin de incrementar la producción de PHA. (Shuler, *et al.*, 2017; Castañeda, 2019).

Por último, en esta misma fermentación a escala de 10 L, se evaluó la cinética de la fermentación de lactosa en suero de leche para la producción de PHA, al ser la fuente de carbono principal en esta materia residual. Con base en los datos experimentales de consumo de lactosa, consumo de nitrógeno, generación de biomasa y formación de producto con respecto al tiempo, se evaluaron las condiciones determinantes para la producción del biopolímero. Como se observa en la Figura 21 en Anexo A, al evaluar el consumo de lactosa y nitrógeno, pudo determinarse que el sustrato limitante es la lactosa, pues a partir de las 50 h de fermentación, este se mantiene constante con respecto al crecimiento celular, mientras que el nitrógeno no demuestra este comportamiento y continúa siendo consumido durante la fermentación. A pesar de que se esperaba que el sustrato limitante fuera el nitrógeno por ser la condición que genera el estrés metabólico, se observó la limitación del crecimiento dada por el alto contenido de lactosa en el medio, entre 30-50 g/L. No obstante, se determinó que el modelo era representativo para la generación del producto dado que se comprobó la formación de PHA por análisis químico.

Bajo este criterio, se evaluaron mediante los datos experimentales y el ajuste con el software Berkeley Madonna las velocidades de generación de biomasa de *B. subtilis* (Ec. 10), consumo de lactosa como sustrato limitante (Ec. 11), y generación de producto (Ec. 12). Estos modelos se obtuvieron a partir de los modelos de Monod y de Leudeking-Piret, pues demostraron un ajuste adecuado a los datos experimentales, indicando que son representativos del sistema de fermentación evaluado. Con base en dicho ajuste, se obtuvieron los parámetros cinéticos descritos en el Cuadro 4. Se evaluaron inicialmente los parámetros relacionados con el crecimiento celular y consumo de sustrato, es decir μ_{max} , K_s y Y_{XS} . Se obtuvo una velocidad máxima de crecimiento con un valor de alrededor de $0.022 h^{-1}$, así como una constante de afinidad al sustrato de 0.15 g/L de lactosa. Ambas variables son afines al modelo obtenido del ajuste de los datos experimentales, observado en la curva de crecimiento celular en la Figura 16, donde se demuestra una fase de crecimiento exponencial prolongada, de aproximadamente 50 h, cuando en realidad la fermentación a menor escala fue posible en 48 h. Esto además demuestra que una escala mayor de trabajo implica condiciones de crecimiento no consideradas anteriormente, como la disponibilidad y contacto con el sustrato, cambios en las condiciones físicas del medio y el efecto de esfuerzos mecánicos dados por el tipo de agitación, que por lo tanto prolongan la fase de crecimiento (Lee, 2001, Castañeda, 2019, Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Los valores de la afinidad al sustrato y la tasa de crecimiento máxima obtenidos demuestran que la cepa de *B. subtilis* evaluada no asimila adecuadamente a la lactosa, y requiere de un tiempo prolongado de fermentación para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, donde se esperaba que ocurriera la mayor producción de PHA. Asimismo, se refleja este fenómeno en el rendimiento de biomasa, pues aunque es fundamental que gran parte del sustrato se dirija al producto, también es indispensable que se aprovechen de manera efectiva los sustratos para el crecimiento celular, fenómeno que no se observó pues se obtuvo un

rendimiento de aproximadamente 0.22 g biomasa/g lactosa, un valor similar al obtenido en los análisis del balance de masa, pero en un tiempo significativamente mayor (Castañeda, 2019, Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Se buscó modelar este fenómeno del consumo de sustrato elevado y por un tiempo prolongado, que fue logrado a partir de la modificación del modelo de Monod para consumo de sustrato con la adición de un ajuste exponencial en la velocidad de consumo de lactosa (Ec. 11). Las variables evaluadas en este ajuste, K_A y k , representan la constante de ajuste y de transformación, respectivamente. Ambos valores fueron negativos, como se demuestra en el Cuadro 4, lo cual se observa como una concavidad hacia abajo al inicio de la línea de ajuste al modelo (Figura 16) y en la curva de velocidades de consumo de sustrato (RS) y del modelo exponencial (RE) respecto al tiempo descrita en la Figura 22 en el Anexo A. Este tipo de comportamiento en la curva representa el alto consumo de lactosa necesario para iniciar el crecimiento bacteriano. Como se mencionó anteriormente, la lactosa es hidrolizada en monómeros de glucosa y galactosa para que este primero pueda ser consumido por el microorganismo. Dado que solo es posible el aprovechamiento de la glucosa en el medio, la hidrólisis de la lactosa debe ser elevada y ocurre en un mayor nivel al inicio de la fermentación, para alcanzar los requerimientos nutricionales de la bacteria, que le permitan un crecimiento adecuado. Por lo tanto, se propuso esta modificación del modelo para predecir de mejor manera el fenómeno de hidrólisis de lactosa como fuente de carbono fermentable por la cepa estudiada, con el que además se pueden identificar posibles mejoras para su consumo (Torres, 1996; Lee, 2001, Castañeda, 2019, Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Se evaluó además la velocidad de la formación de PHA con base en el modelo de Leudeking-Piret, como se demuestra en la Ecuación 12, pues en el caso de las cepas del género *Bacillus*, es formado tanto asociado como no asociado al crecimiento celular, por lo que se evaluaron ambos factores. La constante α que representa la formación de PHA asociada al crecimiento y que además representa el rendimiento de producto respecto la biomasa, demostró un valor de 0.057. En comparación con los rendimientos alcanzados previamente, de hasta 0.100 g PHA/g biomasa, este valor puede considerarse bajo debido a que la formación de PHA ocurrió en su mayoría en la fase estacionaria, y en menor medida asociado al crecimiento durante la fase exponencial, debido a que no se dan las limitaciones de sustrato en esta etapa. Por otro lado, en cuanto a la formación de producto no asociado, se obtuvo un valor de la constante β de $0.001 h^{-1}$, un valor que indica una rápida formación del producto cuando esta alcanza la fase estacionaria, como se observa en la curva de generación de producto en la Figura 16. A pesar de que no se alcanzó el estrés metabólico necesario debido a la limitación de nitrógeno, sí se propició la producción de PHA durante la fase estacionaria de crecimiento, dado que el carbono se encontraba en exceso, a una concentración de aproximadamente 24 g/L respecto a la de nitrógeno, de alrededor de 0.34 g/L, y que la disponibilidad de oxígeno, ya limitado por definición, fue significativamente menor (Garnier y Gaillet, 2015; Mounira, *et al.*, 2017; Mohapatra, *et al.*, 2017).

Así como el balance de masa y elemental permitió determinar las posibles mejoras que se pueden tener en el sistema de fermentación, el modelo cinético permite no solo que se propicien las condiciones de fermentación más adecuadas, sino también puede llegar a determinar el escalamiento del proceso. Ante los resultados obtenidos, puede decirse que la fermentación realizada no es efectiva en el tiempo evaluado, de hasta 72 h, pues la fase exponencial fue prolongada hasta aproximadamente las 50 h, como se observa en la Figura

16, debido a la baja afinidad por el sustrato. Se evaluaron hasta 72 h de fermentación pues se esperaba alcanzar la fase estacionaria en un menor tiempo, con lo cual podía alcanzarse el momento en el que se observara una reducción en la velocidad de formación de producto. Este fenómeno ocurre pues los biopolímeros como los PHA son sintetizados en las células por el estrés metabólico y se almacenan como suministro de energía, por lo que en situaciones de nutrientes limitados pueden consumirlos nuevamente. Es indispensable determinar y modelar cuando esto ocurre, pues se reducen los rendimientos de producto y la fermentación es menos eficiente (Chai, *et al.*, 2012; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Una forma efectiva de mejorar el consumo del sustrato en esta fermentación, y que podría reducir los costos de operación si se busca escalar el proceso, podría ser una modificación de la cepa de trabajo, a modo que se exprese una mayor cantidad de la enzima β -galactosidasa que lleva a cabo la reacción de hidrólisis de la lactosa. Esto permitiría una mayor disponibilidad del sustrato fermentable, la glucosa, ante el exceso de lactosa existente en el medio. No es recomendable que se lleve a cabo un proceso previo químico o enzimático, pues además de que no se tiene información para determinar si es efectivo o no, puede implicar mayores gastos de tiempo y energía. Otra alternativa, aunque menos efectiva, es llevar a cabo más de una adaptación previa al medio, con un incremento gradual de la concentración de lactosa, que permita a la bacteria acostumbrarse al sustrato y se consuma de mejor manera. Por último, otra alternativa mencionada previamente que permita un mejor consumo de sustrato puede ser la expresión del gen *galE* que permite la conversión de galactosa a glucosa, a modo que se aproveche el sustrato en el suero de leche en su totalidad (Chai, *et al.*).

Al modelo cinético también puede incluirse la evaluación de otros factores que influyen en la fermentación, como el pH, temperatura y los fenómenos de transferencia de masa, por ejemplo, que no se encontraban en el alcance de este trabajo. Su implementación en el modelo permitiría una representación del efecto de los fenómenos físicos en el sistema fermentativo, y no solo los relacionados al crecimiento celular, para una descripción más precisa y exacta del proceso (Lee, 2001; Chai, *et al.*, 2012; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron un primer acercamiento de la evaluación de suero de leche como materia prima fermentable para la producción de PHA a partir de *B. subtilis*. Aunque permitieron concluir sobre la viabilidad del proceso y las condiciones que favorecen el crecimiento, se observó una variabilidad en datos y resultados en los valores promedio de las pruebas realizadas, principalmente a escala de 80 mL. Esta se debe en su mayoría a los métodos de cuantificación, principalmente de PHA. Se llevó a cabo el procedimiento descrito por Salmiati, *et al.*, (2009), que se basó en una digestión celular por hipoclorito de sodio al 5% y la solubilización simultánea del biopolímero generado. Sin embargo, debido a la complejidad del método y a que la digestión puede ser incompleta, es posible que no se haya dado una cuantificación exacta del producto, generando variaciones en la exactitud de los resultados. Es recomendable que, si se requiere un análisis más detallado del sistema de fermentación empleado, se plantee una metodología de extracción y cuantificación de la producción del biopolímero producido por *B. subtilis*, para obtener un modelo más representativo de la operación. Sin embargo, dado que el alcance de este trabajo era evaluar la producción de PHA a partir de la fermentación de suero de leche, los resultados se consideraron adecuados para llevar a cabo el análisis de las condiciones de fermentación y los modelos elementales y cinéticos previamente discutidos (Chai, *et al.*, 2012; Peña-Jurado, *et al.*, 2019).

A partir de lo determinado en este trabajo, es posible evaluar la posibilidad del escalamiento del proceso a volúmenes de trabajo mayores, incluso a escala industrial, pues mediante los modelos elemental y cinético puede dimensionarse el reactor necesario para la fermentación y por ende, otros equipos requeridos para una producción determinada. No obstante, los factores observados que redujeron los rendimientos de producto al incrementar la escala a 10 L, nuevamente afectarán el proceso a una dimensión mayor, que podría reducir su efectividad. Entre estos resalta el consumo reducido y prolongado de sustrato, que a mayor escala implicaría mayores tiempos de fermentación y por lo tanto costos innecesarios, así como una mayor generación de residuos con altas cantidades de materia fermentable. Asimismo, deben considerarse los factores físicos mencionados previamente, sobre todo los fenómenos de transferencia de masa, pues se relacionan directamente con el rendimiento (Lee, 2001; Chai, *et al.*, 2012).

Se obtuvo una concentración de PHA máxima de 0.41 g/L, valor que puede considerarse bajo respecto a la cantidad de sustrato en el medio, que puede llegar hasta los 50 g/L. Aunque realizar una evaluación de las implicaciones económicas del proceso no era una línea de investigación, es probable que, con un rendimiento similar, la productividad no sea adecuada. Es indispensable continuar con el estudio y mejoramiento de los factores mencionados para incrementar los rendimientos y modelar el proceso fermentativo adecuadamente, como un mayor consumo de sustratos, una relación C:N adecuada que genere el estrés metabólico necesario y el análisis de fenómenos físicos, los resultados de los modelos elemental y cinético podrían permitir el escalamiento del proceso a una escala industrial (Lee, 2001; Chai, *et al.*, 2012).

El estudio presentado podría tener una implicación importante en la industria de los polímeros, pues a las condiciones de fermentación adecuadas y con rendimientos altos, mejorados a partir de extensos estudios de investigación, un residuo se revalorizaría en un material útil. A un nivel productivo competitivo, este material podría incluso sustituir a los plásticos desechables debido a sus características. Los biopolímeros presentan la ventaja ante los polímeros derivados de petroquímicos de ser biodegradables en agua y dióxido de carbono, lo que reduciría la acumulación de plásticos tóxicos en los ecosistemas. Asimismo, son resistentes a las condiciones ambientales como radiación UV y humedad a la que se exponen estos tipos de materiales, por lo que son versátiles y pueden aplicarse en, por ejemplo: envases, pajillas y botellas, entre otros materiales de único uso, cuya acumulación tiene un efecto menor a los plásticos tradicionales. A pesar de que, a largo plazo, su degradación puede llegar a impactar al ambiente por la emisión de gases de efecto invernadero, principalmente CO_2 , la ventaja que le da al proceso el reusar una materia que usualmente es desechada e incluso contaminante en aguas, y convertirla en uno o varios productos de valor por un modelo de economía circular, implica mejora para problemática ambiental actual y, por lo tanto, a futuro, su estudio es altamente relevante (Lemos y Cordoba, 2015; Nagalakshmaiah, *et al.*, 2019).

- Se evaluó la producción de polihidroxicanoatos a partir de la fermentación de lactosa en suero de leche por *Bacillus subtilis* a escala laboratorio, a una concentración máxima de 0.41 g/L, comprobado mediante la observación de las señales características en el análisis del espectro IR del producto extraído.
- Se evaluó la influencia de la relación molar carbono/nitrógeno en la producción de PHA utilizando lactosa en suero de leche cocido como fuente de carbono y urea como fuente de nitrógeno al alcanzar el mayor rendimiento de 0.045 g PHA/g lactosa con la relación 15:1, con diferencias poco significativas con la relación 20:1 a escala de 80 mL.
- Se realizó el balance de masa de la síntesis de PHA para generar modelo elemental del sistema fermentativo mediante la ecuación estequiométrica característica del sistema de fermentación de suero de leche por *B. subtilis* con lo que se obtuvo rendimientos de 0.031 g PHA/g lactosa y 0.063 g PHA/g glucosa a escala de 10 L.
- Se generó el modelo cinético que representa producción de PHA en las condiciones evaluadas a partir de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* mediante una modificación del modelo de Monod para un ajuste exponencial del consumo de lactosa y del modelo de formación de PHA de Leudeking-Piret.
- Se determinó que el suero de leche subproducto de la industria de lácteos puede ser utilizado para la síntesis de biopolímeros tipo PHA mediante la fermentación de *B. subtilis* a una relación molar de C:N de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno.

Recomendaciones

- Proponer el uso alternativo de los subproductos de la fermentación de suero de leche para la producción de PHA como la proteína, galactosa, etanol y ácido láctico.
- Evaluar la modificación genética de *B. subtilis* para la expresión del gen *galE* que permita el aprovechamiento de la galactosa como fuente de carbono para la producción de PHA.
- Sobreexpresar el operón *phbCAB* en el genoma de *B. subtilis* para incrementar la concentración de las enzimas encargadas de la síntesis de PHB y el gen *yesZ* para una mayor concentración de β -galactosidasa que mejore el consumo de lactosa por la bacteria.
- Determinar el efecto de otras condiciones de fermentación como la temperatura, el pH y la velocidad de agitación en el rendimiento de producción de PHA por *B. subtilis*.
- Evaluar el efecto de los fenómenos de transferencia de masa y calor en el modelo cinético de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis*.
- Evaluar la implementación de dos o más adaptaciones previas de *B. subtilis* para determinar su efecto en la curva de crecimiento bacteriano y por lo tanto en el tiempo de fermentación que maximice el crecimiento celular y la formación del producto.
- Proponer una metodología para la extracción, cuantificación y caracterización del PHA producidos por la fermentación de suero de leche por *B. subtilis*.
- Determinar el efecto de la presencia de subproductos a distintas concentraciones, principalmente de etanol y ácido orgánicos, en el rendimiento de producción de PHA.
- Determinar el efecto de llevar a cabo una hidrólisis previa de la lactosa en sus monómeros glucosa y galactosa en el rendimiento de producto en *B. subtilis*.
- Aislar bacterias productoras de PHA del suero de leche no estéril y evaluar su proceso fermentativo bajo los mismos criterios que fueron utilizados para *B. subtilis*

- Aljuraifani, A. A., Berekaa, M. M., & Ghazwani, A. A. (2018). Bacterial biopolymer (polyhydroxyalkanoate) production from low-cost sustainable sources. *Microbiology Open*, *e755*.
- Amaro, T., Rosa, D., Comi, G., Iacumin, L. (2019). Prospects for the Use of Whey for Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Frontiers in Microbiology*, *10*.
- Azzari, M. E. (2014). *Análisis de factibilidad para la fabricación de una bebida refrescante de lactosuero* [Trabajo de graduación]. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- Bailey, J. E., Ollis, D. F. (1977). *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw Hill.
- Balaji, S., Gopi, K., Muthuvelan, B. (2013). A review on production of poly- β -hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bioplastics. *Algal Research*, *2* (2013), 278-285.
- Ballesteros, M. M., Moral, A., Tijero, A., Sánchez, J. A. (2014). Uso del programa Berkeley Madonna para el desarrollo de modelos en la docencia en Ingeniería Química. *Revista d'innovació educativa*, *13*, 41-48.
- Barbosa, M., Espinosa, A., Malagón, D., Moreno, N. (2005). Producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Universitas Scientiarum*, *10* (1), 45-54.
- Castañeda, M. T. (2019). *Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano*. Universidad Tecnológica Nacional, Buenos Aires, Argentina.
- Chai, Y., Beauregard, P. B., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2012). Galactose Metabolism Plays a Crucial Role in Biofilm Formation by *Bacillus subtilis*. *mBio*, *4* (1).
- Cui, Y., Shi, Y., Gong, X. (2017). Effects of C/N in the substrate on the simultaneous pro-

- duction of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. *RSC Advances*, 7, 18953.
- Dos Santos, A., Dalla, L., Hidalgo, A., Tomaz, M. (2017). From Obtaining to Degradation of PHB:Material Properties. Part I. *Ing. Cienc.*, 13 (26), 269-298.
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S. (2018). Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* (2018). DOI: 10.1002/bbb.1944
- Fundación Heinrich Böll. (2019). *Atlas del plástico, Datos y cifras sobre el mundo de los polímeros sintéticos*. (2^a ed.). Heinrich Böll Foundation.
- Garnier, A., Gaillet, B. (2015). Analytical solution of Luedeking-Piret equation for a batch fermentation obeying Monod growth kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(12), 2468–2474.
- González, M. G. (2008). *Producción de poli-hidroxicanoatos por bacterias del género Bacillus de origen marino* [Tesis de maestría]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., Baja California Sur, México.
- Kavitha, G., Rengasamy, R., Inbakandan, D. (2017). Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application. *Biological Macromolecules*, 111, 102–108.
- Koller, M., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlić, A., & Braunegg, G. (2007). Potential of Various Archae- and Eubacterial Strains as Industrial Polyhydroxyalkanoate Producers from Whey. *Macromolecular Bioscience*, 7 (2), 218–226. doi:10.1002/mabi.200600211
- Lee, J. M. (2001). *Biochemical Engineering*. Prentice Hall. Lemos, A., Cordoba, A. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico (Colombia)*, 79 (1), 93-101.
- Levenspiel, O. (1999). *Chemical Reaction Engineering*. (3rd ed.). John Wiley & Sons.
- Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., & Segura-Carretero, A. (2018). Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Modern Techniques for Food Authentication*, 459–526.
- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H., Pattnaik, S., Charan, C. Samantaray, D. (2017). *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12, 206-213.
- Molina, J. (2016). *Evaluación de desechos marinos como sustrato de bajo costo para la producción de biomasa bacteriana y polihidroxicanoatos (PHA)* [Tesis de Maestría]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Baja California Sur, México.
- Motta-Correa, Y., Mosquera, W. (2015). Aprovechamiento del lactosuero y sus componentes como materia prima en la industria de alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 13 (2015), 81-91.
- Mounira, K. A., Serge, H., Nawel, O., Radia, C., & Noredine. (2017). Kinetic models and parameters estimation study of biomass and ethanol production from inulin by *Pichia*

- caribbica* (KC977491). *African Journal of Biotechnology*, 16 (3), 124–131.
- Nagalakshmaiah, M., Afrin, S., Malladi, R. P., Elkoun, S., Robert, M., Ansari, M. A., Svedberg, A., Karim, Z. (2019). Biocomposites. *Green Composites for Automotive Applications*, 197–215.
- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S., & Desai, A. J. (2008). Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresource Technology*, 99 (13), 5749–5755.
- Pais, J., Farinha, I., Freitas, F., Serafim, L. S., Martínez, V., Martínez, J. C., . . . Reis, M. A. M. (2014). Improvement on the yield of polyhydroxyalkanoates production from cheese whey by a recombinant *Escherichia coli* strain using the proton suicide methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 55, 151–158.
- Pang, H., Wang, G., Yang, H., Wu, H., Wang, X., Chen, Y. (2019). Identification of Ureolytic Bacteria for Concrete Formation and Antifungal Activity from the Soil with Long-Term Application of Urea Fertilizer. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 252.
- Peña-Jurado, E., Pérez-Vega, S., Zavala-Días de la Serna, J., Pérez-Reyes, I., Gutiérrez-Méndez, N., Vazquez-Castillo, J., Salmerón, I., (2019). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from a dairy industry wastewater using *Bacillus subtilis* EPAH18: Bioprocess development and simulation. *Biochemical Engineering Journal*, 151 (2019), 107324
- Salmiati, Z. U, Salim, M. R., Olsson, G. (2009). *Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHA) from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion and Saponification*. Proceedings of the 3rd International Water Association-ASPIRE, Conference and Exhibition, 8-15.
- Sharma, P., Bajaj, B.K. (2017). Cost-effective substrates for production of poly-beta-hydroxybutyrate by a newly isolated *Bacillus cereus* PS-10. *J. Environ. Biol.*, 36 (2015), 1297-1304.
- Shiflet, A. B., Shiflet, G. W. (2006). *System Dynamics Tool: Berkeley Madonna Tutorial 1. Introduction to Computational Science: Modeling and Simulation for the Sciences*. Princeton University Press.
- Shuler, M. L., Kargi, F., DeLisa, M. (2017). *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. Prentice Hall.
- Torres, A. D. (1996). Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. *Ingeniería e Investigación*, 33, 123-138.
- Tyner, T., Francis, J. (2017). Infrared Spectroscopy. Analytical Procedures and General Directions. *ACS Reagent Chemicals*.
- Valero-Valdivieso, M., Ortegón, Y., Uscategui, Y. (2011). Biopolímeros: Avances y Perspectivas. *Dyna*, 181, 171-180.
- Yellore, V. & Desai, A. (1998). Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24. *Letters in Applied Microbiology*, 26 (6), 391–394.

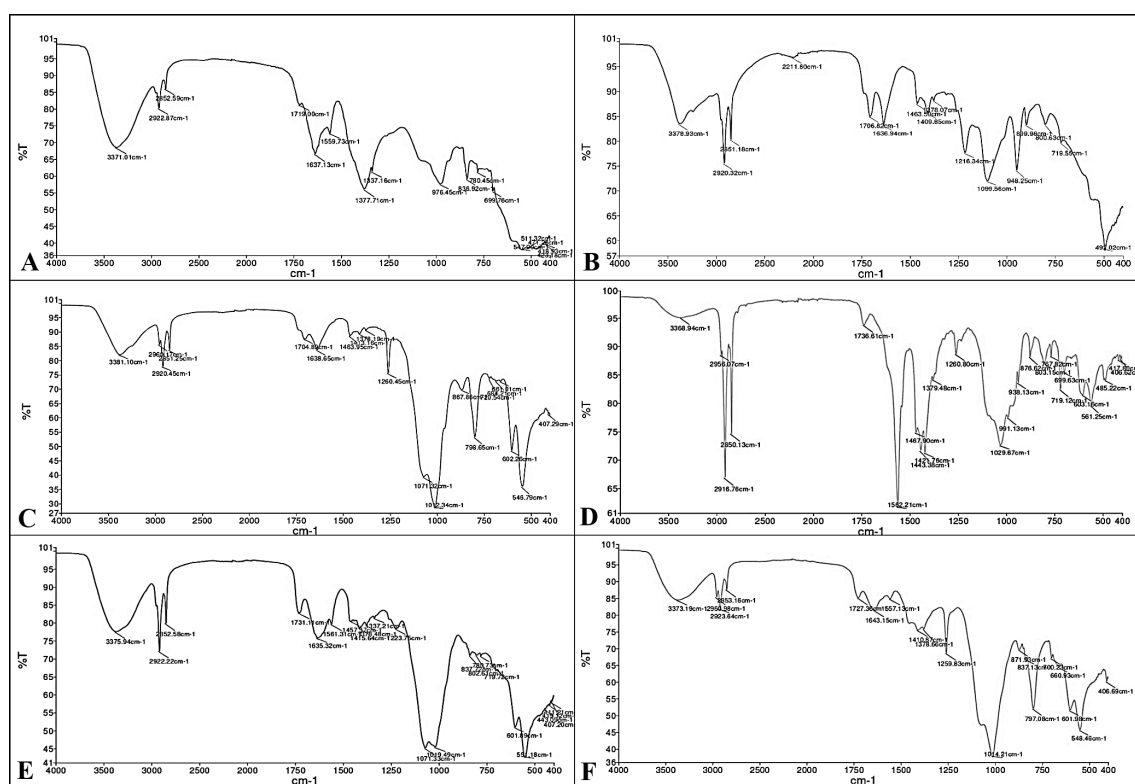


Figura 17: Espectro infrarrojo del producto de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la proporción de volumen de inóculo en la producción de PHA con urea como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 1% (v/v), (C) 5% (v/v) y (E) 10% (v/v) y en suero cocido a (B) 1% (v/v), (D) 5% (v/v) y (F) 10% (v/v).

Cuadro 5: Identificación de grupos funcionales en la estructura del producto de fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la proporción de volumen de inóculo en la producción de PHA con urea como fuente de nitrógeno en suero crudo y cocido (Figura 17).

Prueba	Grupos funcionales	Intervalo de frecuencias (cm^{-1})	Transmitancia (%)
A	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	80-85 y 55
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	80
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	60 y 65-70
B	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	75-80 y 85
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	85-90
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80-85 y 70
C	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	75-80 y 55
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	75-80
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80-85 y 35-40
D	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	65-75 y 70-75
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	90-95
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	90-95 y 70-75
E	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	70-75 y 80
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	80
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	75-80 y 45-50
F	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	80-85 y 70
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	80-85
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80-85 y 40

Las pruebas corresponden a la evaluación de la proporción de volumen de inóculo con urea como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 1% (v/v), (C) 5% (v/v) y (E) 10% (v/v) y en suero cocido a (B) 1% (v/v), (D) 5% (v/v) y (F) 10% (v/v).

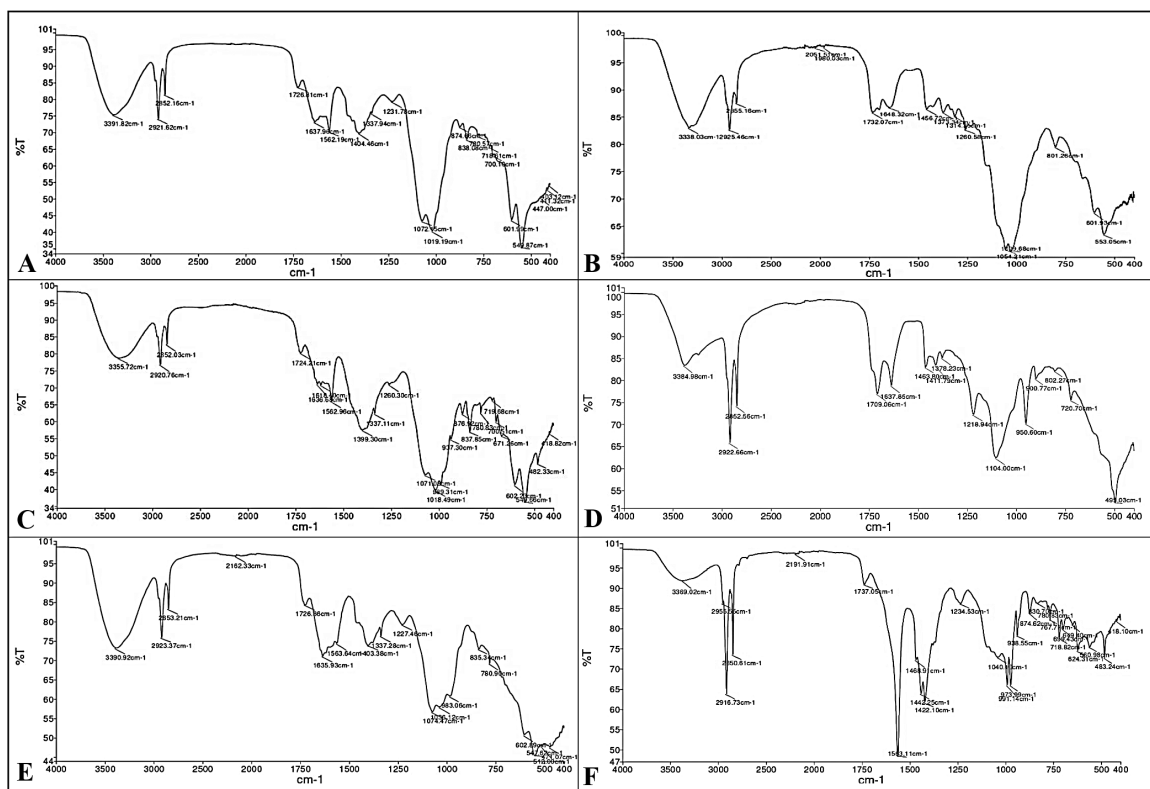


Figura 18: Espectro infrarrojo del producto de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la proporción de volumen de inóculo en la producción de PHA con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 1% (v/v), (C) 5% (v/v) y (E) 10% (v/v) y en suero cocido a (B) 1% (v/v), (D) 5% (v/v) y (F) 10% (v/v).

Cuadro 6: Identificación de grupos funcionales en la estructura del producto de fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la proporción de volumen de inóculo en la producción de PHA con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en suero crudo y cocido (Figura 18).

Prueba	Grupos funcionales	Intervalo de frecuencias (cm^{-1})	Transmitancia (%)
A	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	75-80 y 65-70
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	85
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	75 y 40-45
B	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	80-85 y 85
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	85
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80-85 y 60
C	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	75-80 y 55-60
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	80
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80 y 40-45
D	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	65-75 y 80-85
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	74
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80-85 y 60
E	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	75-80 y 70-75
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	85
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	70-75 y 55-60
F	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	65-70 y 60-65
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	90
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	90-95 y 65-70

Las pruebas corresponden a la evaluación de la proporción de volúmen de inóculo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 1% (v/v), (C) 5% (v/v) y (E) 10% (v/v) y en suero cocido a (B) 1% (v/v), (D) 5% (v/v) y (F) 10% (v/v).

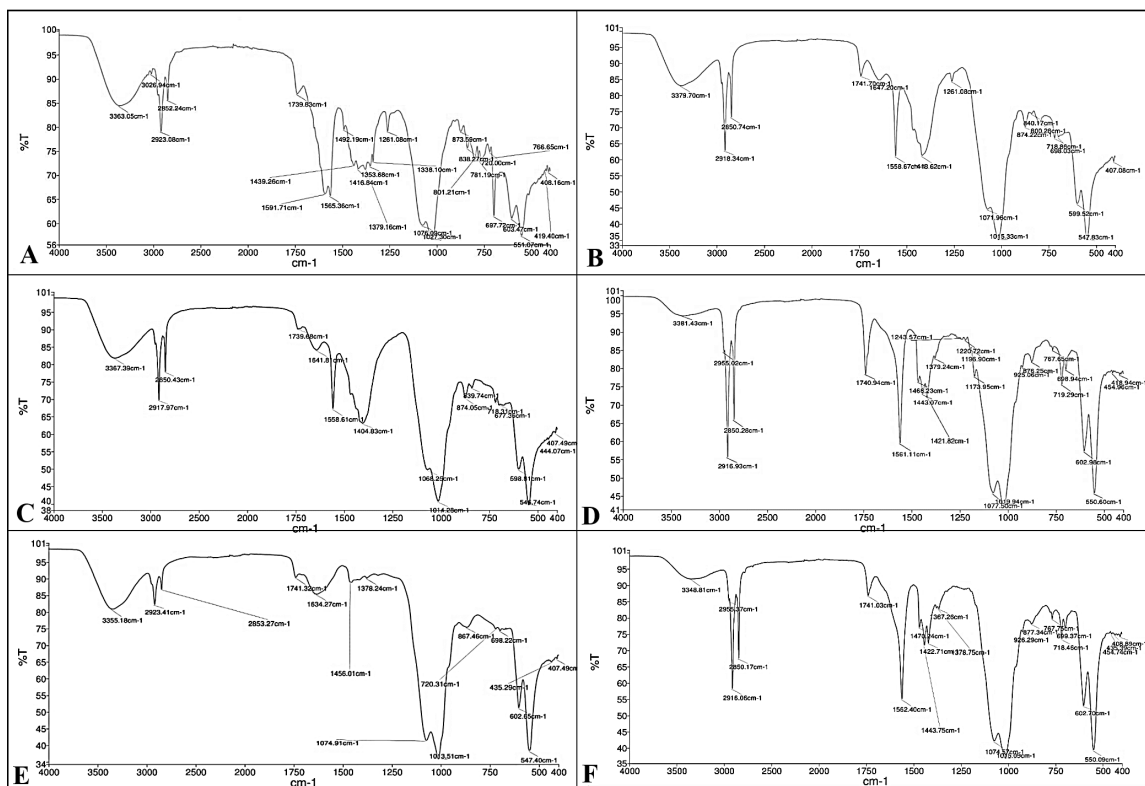


Figura 19: Espectro infrarrojo del producto de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la relación molar C:N en la producción de PHA con urea como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 10:1, (C) 15:1 y (E) 20:1 y en suero cocido a (B) 10:1 (D) 15:1 y (F) 20:1.

Cuadro 7: Identificación de grupos funcionales en la estructura del producto de fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la relación molar C:N en la producción de PHA con urea como fuente de nitrógeno en suero crudo y cocido (Figura 19).

Prueba	Grupos funcionales	Intervalo de frecuencias (cm^{-1})	Transmitancia (%)
A	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	75-85 y 70
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	85
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80-85 y 55-60
B	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	60-70 y 60
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	85
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80-85 y 35-40
C	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	65-75 y 65
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	90
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80-85 y 40-45
D	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	55-65 y 70-75
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	75
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	90-95 y 45-50
E	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	80-85 y 85
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	90
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80-85 y 35-40
F	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	55-65 y 70-75
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	80
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	90-95 y 40-45

Las pruebas corresponden a la evaluación de la relación molar C:N con urea como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 10:1, (C) 15:1 y (E) 20:1 y en suero cocido a (B) 10:1, (D) 15:1 y (F) 20:1.

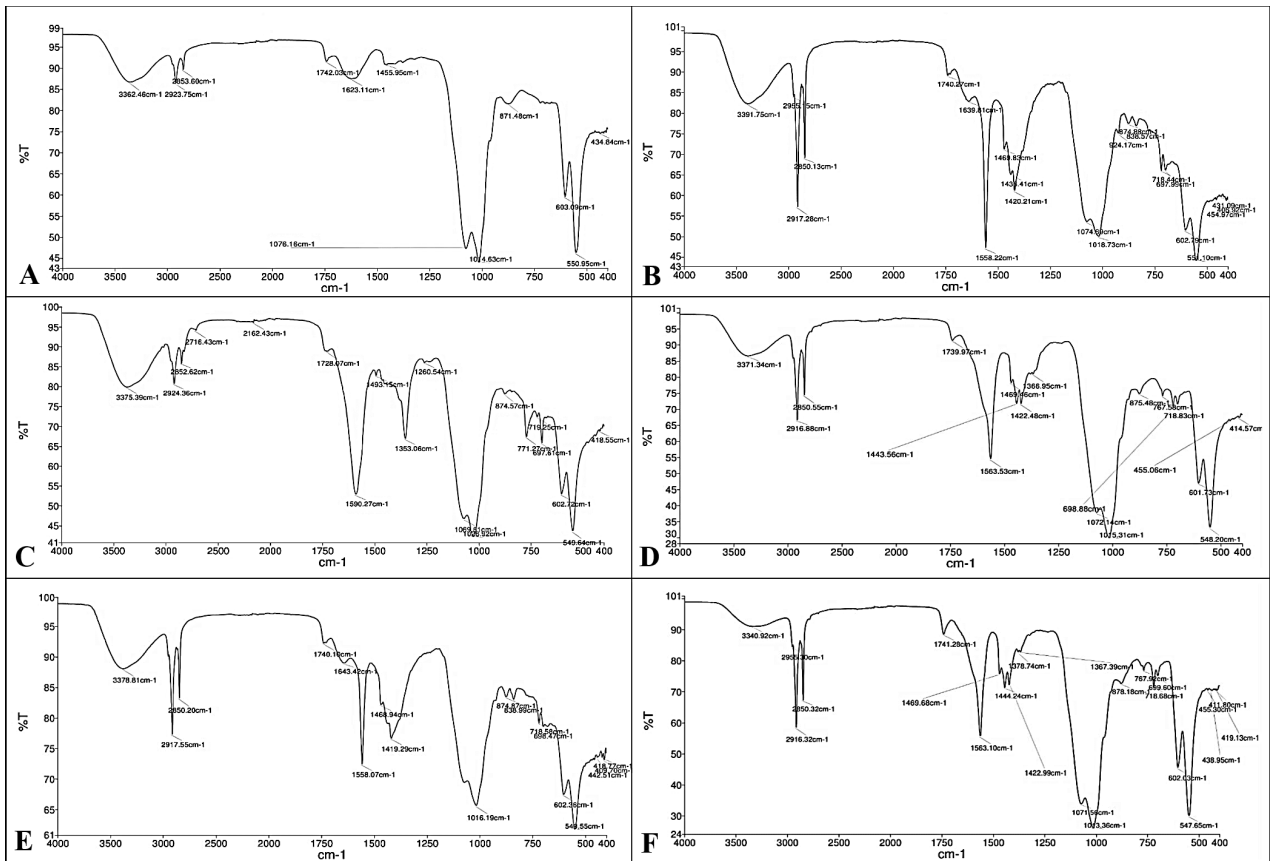


Figura 20: Espectro infrarrojo del producto de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la relación molar C:N en la producción de PHA con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 10:1, (C) 15:1 y (E) 20:1 y en suero cocido a (B) 10:1 (D) 15:1 y (F) 20:1.

Cuadro 8: Identificación de grupos funcionales en la estructura del producto de fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a 37°C y 200 rpm a escala de 80 mL evaluando la influencia de la relación molar C:N en la producción de PHA con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en suero crudo y cocido (Figura 20).

Prueba	Grupos funcionales	Intervalo de frecuencias (cm^{-1})	Transmitancia (%)
A	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	85-90 y 90
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	90
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	85-90 y 45-50
B	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	55-65 y 60-65
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	85
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80-85 y 45-50
C	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	80-85 y 80
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	85
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	80 y 45-50
D	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	65-70 y 75
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	90
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	85-90 y 30-40
E	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	75-80 y 75-80
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	90
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	85-90 y 65
F	Alcano: tensión y torsión C-H	2962-2853 y 1430-1340	55-65 y 70
	Éster saturado: tensión O-C=O	1750-1700	85
	Hidroxilo: tensión C-H y tensión C-O	3650-3400 y 1100-1050	90 y 30-35

Las pruebas corresponden a la evaluación de la relación molar C:N con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en suero crudo a (A) 10:1, (C) 15:1 y (E) 20:1 y en suero cocido a (B) 10:1, (D) 15:1 y (F) 20:1.

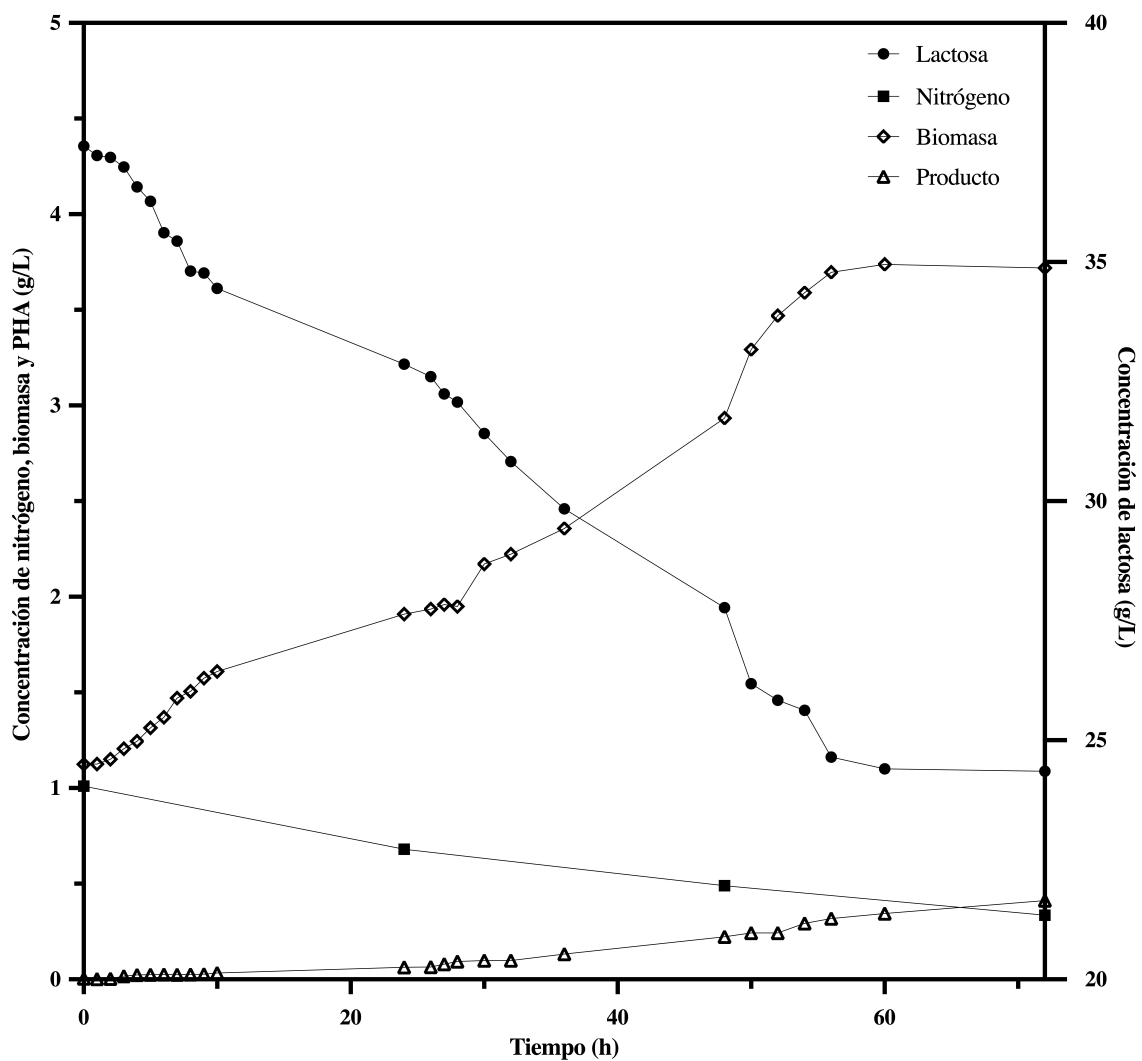


Figura 21: Curva de consumo de sustratos (lactosa y nitrógeno) y generación de biomasa y producto durante la fermentación de suero de leche cocido por *B. subtilis* para la producción de PHA a una razón molar de carbono/ nitrógeno 15:1 a escala de 10 L, a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, con urea como fuente de nitrógeno y una proporción de volumen de inóculo del 5% (v/v), y a presión atmosférica de 0.844 atm.

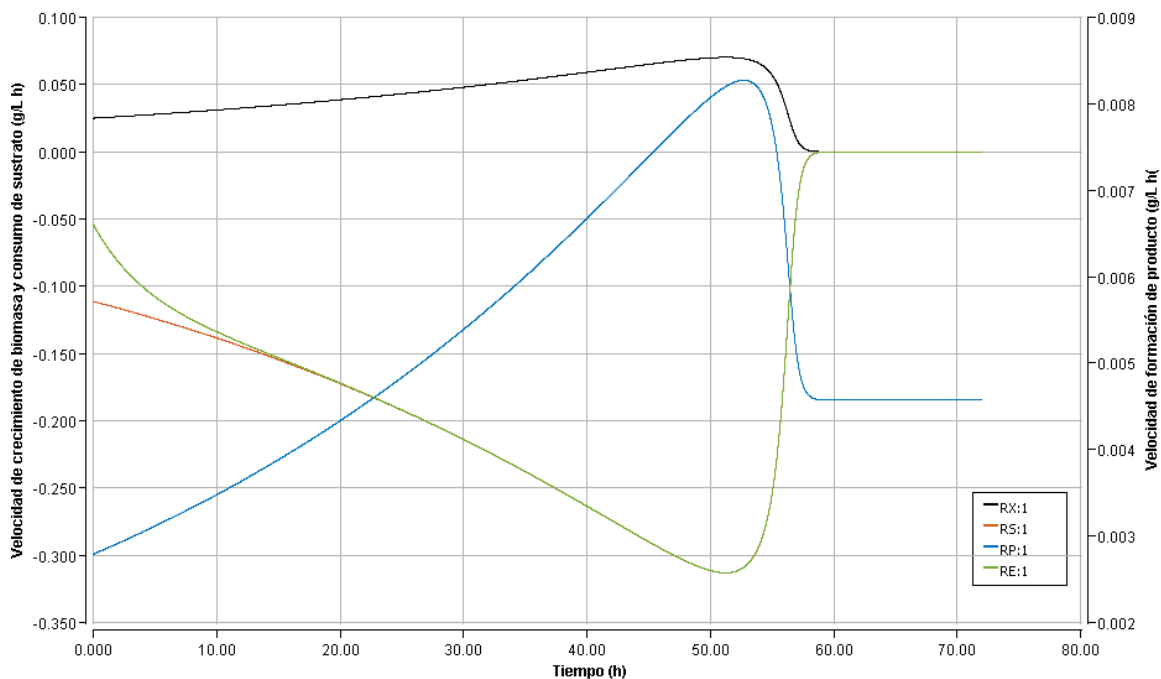


Figura 22: Curva de velocidades de reacción de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de producto respecto al tiempo de la fermentación de lactosa en suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a una razón molar de carbono/nitrógeno de 15:1. Los datos se obtuvieron a una escala de 10 L a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, utilizando urea como fuente de nitrógeno y una proporción de volumen de inóculo del 5% (v/v). Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.

Código:

Curva negra: Velocidad de crecimiento microbiano de *B. subtilis*

Curva roja: Velocidad de consumo de lactosa como sustrato

Curva verde: Velocidad del ajuste exponencial del consumo de sustrato

Curva azul: Velocidad de formación de PHA

Curva de calibración Acido Láctico

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
14.072	1	1	1.67500e6	5.97016e-7	Acido Lactico
		2	3.43783e6	5.81763e-7	
		3	5.52513e6	5.42974e-7	
		4	7.55569e6	5.29402e-7	
		5	9.43052e6	5.30193e-7	

Curva de calibración Acido Láctico

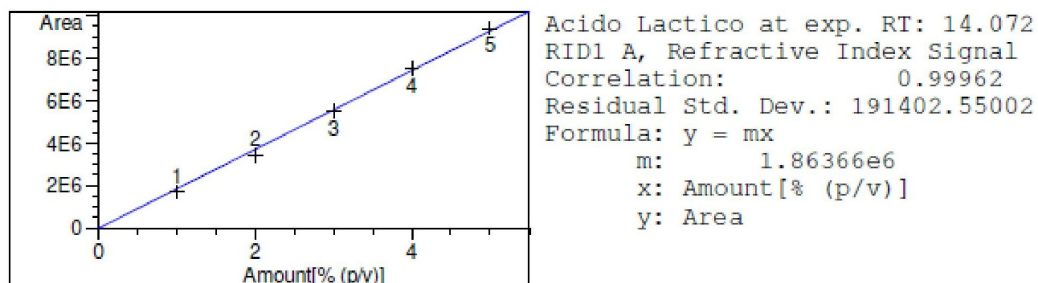


Figura 23: Curva de calibración para la cuantificación de ácido láctico mediante HPLC en % (p/v)

Curva calibración Etanol

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
21.806	1	1	1.18289e6	1.69077e-6	Etanol
		2	2.00571e6	1.99430e-6	
		3	2.48900e6	2.00884e-6	

Curva de calibración etanol

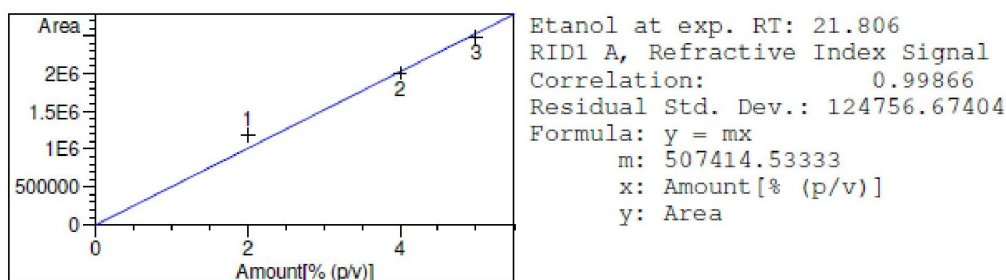


Figura 24: Curva de calibración para la cuantificación de etanol mediante HPLC en % (p/v)

Tabla de curva de calibración lactosa

RetTime [min]	Sig	Lvl	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
9.230	1	1	1.00000	2.89855e6	3.45000e-7	Lactosa
		2	2.00000	5.66188e6	3.53240e-7	
		3	3.00000	8.46133e6	3.54554e-7	
		4	4.00000	1.12305e7	3.56174e-7	
		5	5.00000	1.41024e7	3.54549e-7	

Curva de calibración de lactosa

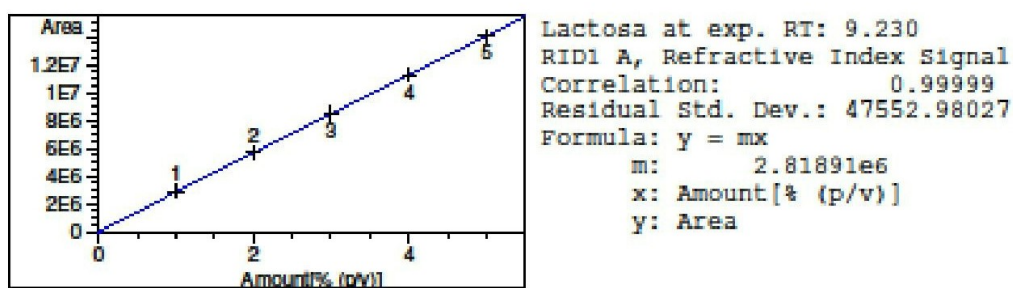


Figura 25: Curva de calibración para la cuantificación de lactosa mediante HPLC en % (p/v)

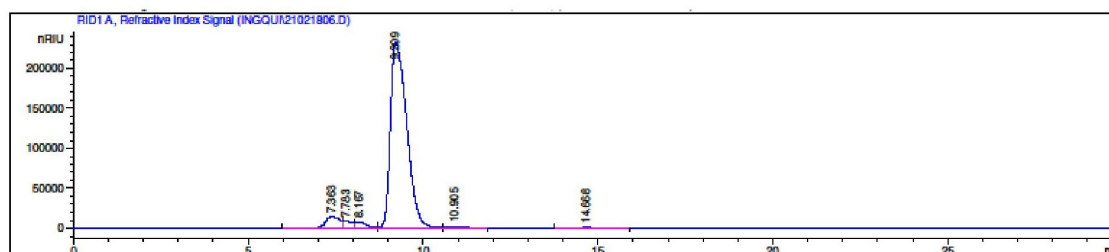


Figura 26: Cromatograma de la cuantificación de lactosa en una muestra de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis*.



Figura 27: Fermentaciones de suero de leche por *B. subtilis* a 80 mL para evaluación de efecto de relación molar C:N en el rendimiento de PHA durante 48 h a pH 7.1, 37°C y 200 rpm y a presión atmosférica de 0.844 atm.



Figura 28: Reactor New Brunswick Scientific BioFlo 415 del Centro de Procesos Industriales del Departamento de Ingeniería Química utilizado para la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* a escala de 10L a razón molar C:N de 15:1 a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm y a presión atmosférica de 0.844 atm.



Figura 29: Muestra de 50 mL tomada de la fermentación de suero de leche cocido por *B. subtilis* a escala de 10L a razón molar C:N de 15:1, a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm y a presión atmosférica de 0.844 atm.

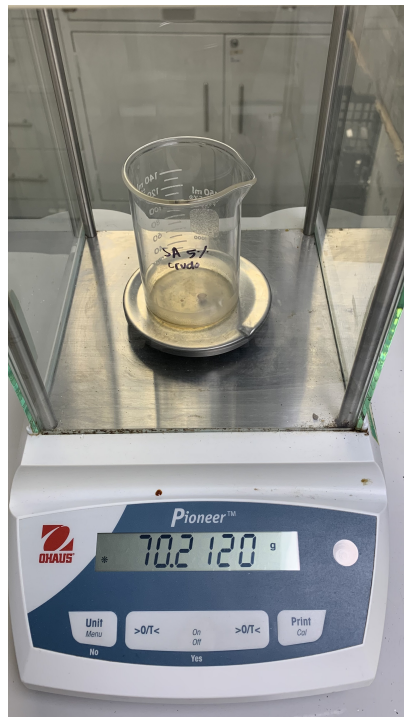


Figura 30: Determinación del peso seco de biomasa de *B. subtilis* producida durante la fermentación de suero de leche para la producción de PHA en la balanza analítica OHAUS Pioneer del Laboratorio de Operaciones Unitarias.

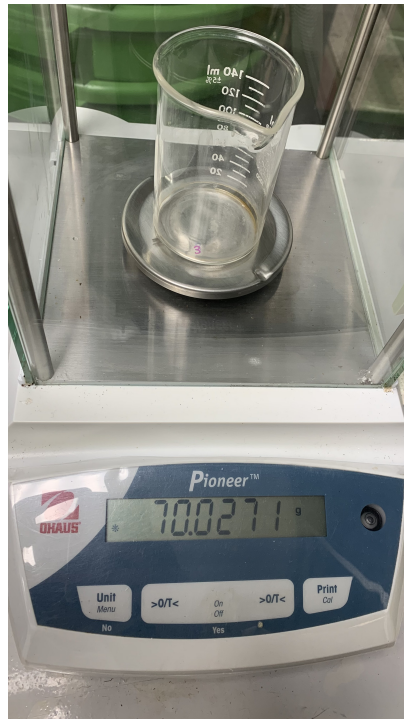


Figura 31: Determinación del peso seco de PHA producido durante la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* en la balanza analítica OHAUS Pioneer del Laboratorio de Operaciones Unitarias.



Figura 32: Espectrofotómetro FT-IR PerkinElmer Frontier del Laboratorio de Analítica Instrumental Avanzada utilizado para la obtención de los espectros IR de los productos de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis*



Figura 33: Cromatógrafo de alta resolución del Laboratorio de Análítica Instrumental Avanzada utilizado para la cuantificación de lactosa, etanol y ácido láctico de las muestras de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis*



Figura 34: Colorímetro HACH del Centro de Procesos Industriales del Departamento de Ingeniería Química utilizado para la cuantificación de nitrógeno y fosfatos de las muestras de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis*

 Datos originales y calculados

Cuadro 9: Composición de la solución de fermentación a volumen final de 80 mL para la determinación del efecto de la proporción de volumen de inóculo en la generación de PHA a partir de suero de leche crudo y cocido por *B. subtilis* evaluando dos fuentes de nitrógeno.

Fuente de nitrógeno	Proporción de inóculo (% v/v)	Volumen de suero (mL)	Masa de fuente de N (g)
Urea	1	79.2	0.400
	5	76.0	0.400
	10	72.0	0.400
Sulfato de amonio	1	79.2	0.400
	5	76.0	0.400
	10	72.0	0.400

Cuadro 10: Composición de la solución de fermentación a volumen final de 80 mL para la determinación del efecto de la relación molar C:N en la generación de PHA a partir de suero de leche crudo por *B. subtilis* evaluando dos fuentes de nitrógeno.

Fuente de nitrógeno	Relación molar C:N	Volumen de suero (mL)	Masa de fuente de N (g)
Urea	10:1	76.0	0.4476
	15:1	76.0	0.3434
	20:1	76.0	0.2163
Sulfato de amonio	10:1	76.0	0.8448
	15:1	76.0	0.6485
	20:1	76.0	0.4782

Cuadro 11: Composición de la solución de fermentación a volumen final de 80 mL para la determinación del efecto de la relación molar C:N en la generación de PHA a partir de suero de leche cocido por *B. subtilis* evaluando dos fuentes de nitrógeno.

Fuente de nitrógeno	Relación molar C:N	Volumen de suero (mL)	Masa de fuente de N (g)
Urea	10:1	76.0	0.3776
	15:1	76.0	0.2470
	20:1	76.0	0.1817
Sulfato de amonio	10:1	76.0	0.8307
	15:1	76.0	0.5458
	20:1	76.0	0.4015

Cuadro 12: Conteos celulares de inóculos de caldo nutritivo y suero de leche crudo y cocido para pruebas a escala de 80 mL de la fermentación de lactosa por *B.subtilis* mediante el método de Neubauer.

Tipo de suero	Condición evaluada	Inóculo	Número de células				Conteo celular ($\pm 0.18 \times 10^7$ UFC/mL)
Crudo	Tamaño de inóculo	Caldo nutritivo	32	34	33	35	3.35
			29	27	29	28	2.83
		Suero	36	34	36	37	3.58
			32	43	39	36	3.75
	Relación carbono/nitrógeno	Caldo nutritivo	28	28	29	27	2.80
			27	28	26	24	2.63
		Suero	27	24	29	24	2.60
			22	21	24	24	2.28
Cocido	Tamaño de inóculo	Caldo nutritivo	29	27	29	28	2.83
			28	28	29	27	2.80
		Suero	30	32	31	38	3.28
			26	28	29	27	2.75
	Relación carbono/nitrógeno	Caldo nutritivo	27	28	26	24	2.63
			31	36	29	30	3.15
		Suero	25	28	24	27	2.60
			28	29	31	26	2.85

Cuadro 13: Conteos celulares de inóculos de caldo nutritivo y suero de leche cocido para pruebas a escala de 10 L de la fermentación de lactosa por *B.subtilis* mediante el método de Neubauer.

Corrida	Inóculo	Número de células				Conteo celular ($\pm 0.18 \times 10^7$ UFC/mL)
1	Caldo nutritivo	35	34	31	28	3.20
	Suero cocido	21	19	20	23	2.08
2	Caldo nutritivo	31	35	28	36	3.25
	Suero cocido	21	27	19	22	2.23

Cuadro 14: Datos originales de la cuantificación de la concentración de lactosa, nitrógeno y fosfatos en el suero de leche para fermentaciones por *B.subtilis* para la producción de PHA.

Tipo de suero	Concentración de lactosa (± 0.001 % m/v)	Concentración de nitrógeno (± 0.1 mg/L)	Concentración de fosfatos (± 0.01 mg/L)
Crudo	5.492	8.7	0.85
Cocido	4.653	8.3	0.68

Cuadro 15: Cuantificación de lactosa por HPLC y de biomasa y el producto en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la proporción de volumen de inóculo en la fermentación de lactosa por *B. subtilis* para producción de PHA.

Tipo de suero	Fuente de nitrógeno	Proporción de inóculo (% v/v)	Concentración de lactosa (± 0.001 % m/v)	Masa de biomasa (± 0.0001 g)	Masa de producto (± 0.0001 g)
Crudo	Urea	1	5.124	0.1049	0.0110
			4.234	0.3473	0.0282
		5	5.103	0.1213	0.0171
			3.870	0.4504	0.0466
		10	5.180	0.0646	0.0087
			4.299	0.2527	0.0091
	Sulfato de amonio	1	5.179	0.0612	0.0055
			3.662	0.3084	0.0205
		5	5.153	0.0946	0.0101
			3.445	0.3736	0.0457
		10	5.187	0.0714	0.0068
			4.314	0.2508	0.0272
Cocido	Urea	1	3.879	0.2809	0.0252
			4.265	0.1464	0.0144
		5	3.834	0.3861	0.0425
			4.223	0.1664	0.0197
		10	3.934	0.3195	0.0296
			4.287	0.1355	0.0136
	Sulfato de amonio	1	3.893	0.1856	0.0178
			4.223	0.1368	0.0156
		5	3.385	0.2338	0.0249
			4.015	0.1848	0.0190
		10	3.244	0.2281	0.0107
			4.222	0.1434	0.0058

Los datos fueron obtenidos a escala de 80 mL a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm. Se evaluaron distintas proporciones de volumen de inóculo a 1, 5 y 10%(v/v) y dos fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y urea, para suero crudo y cocido. Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 16: Cuantificación de lactosa por HPLC y de biomasa y el producto en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto la relación molar de carbono y nitrógeno en la fermentación de lactosa por *B. subtilis* para producción de PHA.

Tipo de suero	Fuente de nitrógeno	Relación molar C:N	Concentración de lactosa (± 0.001 % m/v)	Masa de biomasa (± 0.0001 g)	Masa de producto (± 0.0001 g)
Crudo	Urea	10:1	4.256	0.2133	0.0225
			3.990	0.2242	0.0261
		15:1	4.170	0.2664	0.0294
			3.673	0.3117	0.0382
		20:1	4.199	0.2398	0.0283
			3.995	0.2418	0.0294
	Sulfato de amonio	10:1	4.227	0.2108	0.0168
			4.314	0.2069	0.0131
		15:1	4.184	0.2224	0.0276
			4.180	0.2306	0.0288
Cocido	Urea	10:1	4.196	0.1345	0.0156
			3.789	0.1813	0.0174
		15:1	3.925	0.2516	0.0223
			3.639	0.2799	0.0297
		20:1	4.129	0.1660	0.0135
			3.839	0.2210	0.0204
	Sulfato de amonio	10:1	4.306	0.0863	0.0078
			3.770	0.1404	0.0086
		15:1	4.176	0.1062	0.0075
			3.190	0.1237	0.0108
20:1	4.219	0.1162	0.0085		
	3.894	0.1174	0.0117		

Los datos fueron obtenidos a escala de 80 mL a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm. Se evaluaron distintas relaciones molares C:N de 10:1, 15:1 y 20:1 a una proporción de volumen de inóculo de 5%(v/v) y dos fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y urea, para suero crudo y cocido. Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 17: Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y concentración de producto en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la proporción de volumen de inóculo en la fermentación de lactosa por *B. subtilis* para producción de PHA.

Tipo de suero	Fuente de nitrógeno	Proporción de inóculo (% v/v)	Concentración de lactosa (± 0.017 g/L)	Peso seco de biomasa (± 0.05 g/L)	Concentración de producto (± 0.05 g/L)
Crudo	Urea	1	51.24	1.31	0.14
			42.34	4.34	0.35
		5	51.03	1.52	0.21
			38.70	5.63	0.58
		10	51.80	0.81	0.11
			42.99	3.16	0.11
	Sulfato de amonio	1	51.79	0.76	0.07
			36.62	3.85	0.26
		5	51.53	1.18	0.13
			34.45	4.67	0.57
		10	51.87	0.89	0.08
			43.14	3.13	0.34
Cocido	Urea	1	38.79	3.51	0.31
			42.65	1.83	0.18
		5	38.34	4.83	0.53
			42.23	2.08	0.25
		10	39.34	3.99	0.37
			42.87	1.69	0.17
	Sulfato de amonio	1	38.93	2.32	0.22
			42.23	1.71	0.19
		5	33.85	2.92	0.31
			40.15	2.31	0.24
		10	32.44	2.85	0.13
			42.22	1.79	0.07

Los datos fueron obtenidos a escala de 80 mL a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm. Se evaluaron distintas proporciones de volumen de inóculo a 1, 5 y 10%(v/v) y dos fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y urea, para suero crudo y cocido. Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 18: Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y concentración de producto en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la relación molar de carbono y nitrógeno en la fermentación de lactosa por *B. subtilis* para producción de PHA.

Tipo de suero	Fuente de nitrógeno	Relación molar C:N	Concentración de lactosa (± 0.01 g/L)	Peso seco de biomasa (± 0.05 g/L)	Concentración de producto (± 0.05 g/L)
Crudo	Urea	10:1	42.56	2.67	0.28
			39.90	2.80	0.33
		15:1	41.70	3.33	0.49
			36.73	3.90	0.51
			41.99	3.00	0.35
	20:1	39.95	3.02	0.37	
		42.27	2.64	0.21	
	Sulfato de amonio	10:1	43.14	2.59	0.16
			41.84	2.78	0.35
		15:1	41.80	2.99	0.36
42.06			2.71	0.31	
20:1		42.79	2.31	0.27	
Cocido	Urea	10:1	41.96	1.68	0.19
			37.89	3.02	0.29
		15:1	39.25	3.15	0.29
			36.39	4.66	0.50
			41.29	2.07	0.17
	20:1	38.39	3.68	0.34	
		43.06	1.08	0.10	
	Sulfato de amonio	10:1	37.70	2.34	0.14
			41.76	1.33	0.09
		15:1	31.90	2.06	0.18
42.19			1.45	0.11	
20:1		38.94	1.96	0.20	

Los datos fueron obtenidos a escala de 80 mL a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm. Se evaluaron distintas relaciones molares C:N de 10:1, 15:1 y 20:1 a una proporción de volumen de inóculo de 5%(v/v) y dos fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y urea, para suero crudo y cocido. Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 19: Rendimientos de biomasa con respecto al sustrato (Y_{xs}) y de producto con respecto a la biomasa (Y_{px}) y al sustrato (Y_{ps}) en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la proporción de volumen de inóculo en la fermentación de lactosa por *B. subtilis* para producción de PHA.

Tipo de suero	Fuente de nitrógeno	Tamaño de inóculo (% v/v)	Y _{xs} (± 0.025 g biomasa /g lactosa)	Y _{px} (± 0.025 g PHA /g biomasa)	Y _{ps} (± 0.025 g PHA /g lactosa)
Crudo	Urea	1	0.356	0.105	0.037
			0.345	0.081	0.028
		5	0.390	0.141	0.055
			0.347	0.103	0.036
		10	0.259	0.135	0.035
			0.265	0.036	0.010
	Sulfato de amonio	1	0.244	0.090	0.022
			0.211	0.066	0.014
		5	0.349	0.107	0.037
			0.228	0.122	0.028
		10	0.293	0.095	0.028
			0.266	0.108	0.029
Cocido	Urea	1	0.454	0.090	0.041
			0.472	0.098	0.046
		5	0.589	0.110	0.065
			0.484	0.118	0.057
		10	0.555	0.093	0.051
			0.463	0.100	0.046
	Sulfato de amonio	1	0.305	0.096	0.029
			0.398	0.114	0.045
		5	0.230	0.107	0.025
			0.362	0.103	0.037
		10	0.202	0.047	0.009
			0.416	0.040	0.017

Los datos fueron obtenidos a escala de 80 mL a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm. Se evaluaron distintas proporciones de volumen de inóculo a 1, 5 y 10%(v/v) y dos fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y urea, para suero crudo y cocido. Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 20: Rendimientos de biomasa con respecto al sustrato (Y_{xs}) y de producto con respecto a la biomasa (Y_{px}) y al sustrato (Y_{ps}) en duplicado de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la relación molar de carbono y nitrógeno en la fermentación de lactosa por *B. subtilis* para producción de PHA .

Tipo de suero	Fuente de nitrógeno	Relación molar C:N	Y_{xs} (± 0.025 g biomasa /g lactosa)	Y_{px} (± 0.025 g PHA /g biomasa)	Y_{ps} (± 0.025 g PHA /g lactosa)
Crudo	Urea	10:1	0.216	0.105	0.023
			0.187	0.116	0.022
		15:1	0.252	0.148	0.037
			0.214	0.132	0.028
		20:1	0.232	0.118	0.027
			0.202	0.122	0.025
	Sulfato de amonio	10:1	0.208	0.080	0.017
			0.220	0.063	0.014
		15:1	0.213	0.124	0.026
			0.220	0.125	0.027
		20:1	0.211	0.116	0.024
			0.190	0.117	0.022
Cocido	Urea	10:1	0.368	0.116	0.043
			0.350	0.096	0.034
		15:1	0.432	0.093	0.040
			0.460	0.107	0.049
		20:1	0.396	0.081	0.032
			0.452	0.092	0.042
	Sulfato de amonio	10:1	0.311	0.090	0.028
			0.265	0.061	0.016
		15:1	0.278	0.071	0.020
			0.141	0.087	0.012
		20:1	0.335	0.073	0.024
			0.258	0.100	0.026

Los datos fueron obtenidos a escala de 80 mL a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm. Se evaluaron distintas relaciones molares C:N de 10:1, 15:1 y 20:1 a una proporción de volumen de inóculo de 5%(v/v) y dos fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y urea, para suero crudo y cocido. Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 21: Rendimientos promedio de biomasa con respecto al sustrato y de producto con respecto a la biomasa, al sustrato y concentración en g/L de pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la proporción de volumen de inóculo en la fermentación de lactosa por *B. subtilis* para producción de PHA.

Tipo de suero	Fuente de nitrógeno	Tamaño de inóculo (% v/v)	Y _{xs} (g biomasa /g lactosa)	Y _{px} (g PHA / g biomasa)	Y _{ps} (g PHA/ g lactosa)	Concentración de producto (g PHA/ L)
Crudo	Urea	1	0.351 ± 0.006	0.093 ± 0.017	0.033 ± 0.007	0.245 ± 0.152
		5	0.368 ± 0.030	0.122 ± 0.027	0.045 ± 0.013	0.398 ± 0.261
		10	0.262 ± 0.004	0.085 ± 0.070	0.022 ± 0.018	0.111 ± 0.004
	Sulfato de amonio	1	0.228 ± 0.024	0.078 ± 0.017	0.018 ± 0.006	0.162 ± 0.133
		5	0.288 ± 0.085	0.115 ± 0.011	0.033 ± 0.007	0.349 ± 0.315
		10	0.279 ± 0.019	0.102 ± 0.009	0.028 ± 0.001	0.213 ± 0.180
Cocido	Urea	1	0.463 ± 0.013	0.094 ± 0.006	0.044 ± 0.004	0.247 ± 0.095
		5	0.537 ± 0.075	0.114 ± 0.006	0.061 ± 0.005	0.389 ± 0.202
		10	0.509 ± 0.066	0.097 ± 0.005	0.049 ± 0.004	0.270 ± 0.141
	Sulfato de amonio	1	0.351 ± 0.065	0.105 ± 0.013	0.037 ± 0.011	0.209 ± 0.019
		5	0.296 ± 0.093	0.105 ± 0.003	0.031 ± 0.009	0.274 ± 0.052
		10	0.309 ± 0.151	0.044 ± 0.005	0.013 ± 0.005	0.103 ± 0.043

Los datos fueron obtenidos a escala de 80 mL a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm. Se evaluaron distintas proporciones de volumen de inóculo a 1, 5 y 10%(v/v) y dos fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y urea, para suero crudo y cocido. Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 22: Rendimientos promedio de biomasa con respecto al sustrato y de producto con respecto a la biomasa, al sustrato y concentración en g/L de pruebas a escala de 80 mL para evaluar la relación molar de carbono y nitrógeno en la fermentación de lactosa por *B. subtilis* para producción de PHA.

Tipo de suero	Fuente de nitrógeno	Relación molar C:N	Y _{xs} (g biomasa /g lactosa)	Y _{px} (g PHA / g biomasa)	Y _{ps} (g PHA/ g lactosa)	Concentración de producto (g PHA/ L)
Crudo	Urea	10:1	0.201 ± 0.021	0.111 ± 0.008	0.022 ± 0.001	0.304 ± 0.032
		15:1	0.233 ± 0.027	0.140 ± 0.011	0.033 ± 0.006	0.504 ± 0.087
		20:1	0.217 ± 0.021	0.120 ± 0.003	0.026 ± 0.002	0.361 ± 0.010
	Sulfato de amonio	10:1	0.214 ± 0.008	0.072 ± 0.012	0.015 ± 0.002	0.187 ± 0.033
		15:1	0.216 ± 0.005	0.124 ± 0.001	0.027 ± 0.001	0.353 ± 0.011
		20:1	0.200 ± 0.014	0.117 ± 0.001	0.023 ± 0.002	0.293 ± 0.031
Cocido	Urea	10:1	0.359 ± 0.013	0.106 ± 0.014	0.038 ± 0.006	0.242 ± 0.067
		15:1	0.446 ± 0.020	0.100 ± 0.010	0.045 ± 0.006	0.395 ± 0.146
		20:1	0.424 ± 0.040	0.087 ± 0.008	0.037 ± 0.007	0.254 ± 0.121
	Sulfato de amonio	10:1	0.288 ± 0.032	0.076 ± 0.021	0.022 ± 0.008	0.120 ± 0.032
		15:1	0.210 ± 0.097	0.079 ± 0.012	0.016 ± 0.005	0.137 ± 0.061
		20:1	0.296 ± 0.054	0.086 ± 0.019	0.025 ± 0.001	0.151 ± 0.063

Los datos fueron obtenidos a escala de 80 mL a pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm. Se evaluaron distintas relaciones molares C:N de 10:1, 15:1 y 20:1 a una proporción de volumen de inóculo de 5%(v/v) y dos fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y urea, para suero crudo y cocido. Se trabajó a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 23: Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias de las pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la proporción de volumen de inóculo en la fermentación de lactosa por *B. subtilis* para producción de PHA con significancia de 0.05.

Tipo de suero	Fuente de nitrógeno	Comparación de inóculo	Yxs (g biomasa/ g lactosa)		Ypx (g PHA/ g biomasa)		Yps (g PHA/ g lactosa)		Concentración de producto de producto (g PHA/L)	
			Valor p	Conclusión	Valor p	Conclusión	Valor p	Conclusión	Valor p	Conclusión
Crudo	Urea	1 y 5 %	0.506	DENS	0.319	DENS	0.353	DENS	0.548	DENS
		5 y 10 %	0.038	DES	0.557	DENS	0.280	DENS	0.260	DENS
		1 y 10 %	0.005	DES	0.893	DENS	0.518	DENS	0.340	DENS
	Sulfato de amonio	1 y 5 %	0.433	DENS	0.122	DENS	0.140	DENS	0.521	DENS
		5 y 10 %	0.896	DENS	0.339	DENS	0.465	DENS	0.648	DENS
		1 y 10 %	0.137	DENS	0.220	DENS	0.122	DENS	0.782	DENS
Cocido	Urea	1 y 5 %	0.302	DENS	0.048	DENS	0.066	DENS	0.465	DENS
		5 y 10 %	0.734	DENS	0.039	DENS	0.117	DENS	0.566	DENS
		1 y 10 %	0.429	DENS	0.711	DENS	0.290	DENS	0.869	DENS
	Sulfato de amonio	1 y 5 %	0.563	DENS	0.976	DENS	0.594	DENS	0.237	DENS
		5 y 10 %	0.928	DENS	0.004	DES	0.137	DENS	0.070	DENS
		1 y 10 %	0.751	DENS	0.024	DENS	0.112	DENS	0.088	DENS

*DES: diferencia estadísticamente significativa; DENS: diferencia estadísticamente no significativa (no puede concluirse DES)

Cuadro 24: Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias de las pruebas a escala de 80 mL para evaluar el efecto de la relación molar de carbono y nitrógeno en la fermentación de lactosa por *B. subtilis* para producción de PHA con significancia de 0.05.

Tipo de suero	Fuente de nitrógeno	Comparación de inóculo	Yxs (g biomasa/ g lactosa)		Ypx (g PHA/ g biomasa)		Yps (g PHA/ g lactosa)		Concentración de producto de producto (g PHA/L)	
			Valor p	Conclusión	Valor p	Conclusión	Valor p	Conclusión	Valor p	Conclusión
Crudo	Urea	10:1 y 15:1	0.312	DENS	0.049	DES	0.144	DENS	0.015	DES
		15:1 y 20:1	0.571	DES	0.129	DENS	0.282	DENS	0.008	DES
		10:1 y 20:1	0.530	DES	0.264	DENS	0.131	DENS	0.137	DENS
	Sulfato de amonio	10:1 y 15:1	0.773	DENS	0.023	DES	0.015	DES	0.021	DES
		15:1 y 20:1	0.280	DENS	0.008	DES	0.100	DENS	0.124	DENS
		10:1 y 20:1	0.364	DENS	0.031	DES	0.042	DES	0.079	DENS
Cocido	Urea	10:1 y 15:1	0.035	DES	0.266	DENS	0.422	DENS	0.031	DES
		15:1 y 20:1	0.561	DENS	0.287	DENS	0.370	DENS	0.406	DENS
		10:1 y 20:1	0.158	DENS	0.235	DENS	0.880	DENS	0.915	DENS
	Sulfato de amonio	10:1 y 15:1	0.392	DENS	0.869	DENS	0.469	DENS	0.768	DENS
		15:1 y 20:1	0.386	DENS	0.682	DENS	0.134	DENS	0.845	DENS
		10:1 y 20:1	0.870	DENS	0.645	DENS	0.673	DENS	0.607	DENS

*DES: diferencia estadísticamente significativa; DENS: diferencia estadísticamente no significativa (no puede concluirse DES)

Cuadro 25: Mediciones en duplicado de las concentraciones inicial y final de componentes de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para producción de PHA.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Unidades
<i>Lactosa</i>	3.716	2.435	± 0.001 m/v
	3.769	2.426	
<i>Nitrógeno</i>	8.7	2.4	± 0.01 mg/L
	11.5	4.3	
<i>Fosfatos</i>	5.12	4.81	± 0.01 mg/L
	4.83	3.14	
<i>Biomasa</i>	0.0550	0.1864	± 0.001 g células
	0.0574	0.1832	
<i>Producto</i>	0.0001	0.0223	± 0.001 g PHA
	0.0004	0.0194	
<i>Subproducto</i>	0.826	1.043	± 0.001 % m/v
	0.888	1.17	

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5 % (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 26: Concentraciones inicial y final en duplicado de componentes de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para producción de PHA.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Unidades
<i>Lactosa</i>	37.16	24.35	± 0.01 g/L
	37.69	24.26	
<i>Nitrógeno</i>	0.87	0.24	± 0.01 g/L
	1.15	0.43	
<i>Fosfatos</i>	0.51	0.48	± 0.01 g/L
	0.48	0.31	
<i>Biomasa</i>	1.10	3.73	± 0.05 g/L
	1.15	3.66	
<i>Producto</i>	0.002	0.446	± 0.050 g/L
	0.008	0.388	
<i>Subproductos</i>	8.26	10.43	± 0.01 g/L
	8.88	11.70	

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5 % (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 27: inicial y final promedio de componentes de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA y cambio en su concentración según el consumo o formación durante la reacción.

Componente	Concentración inicial (g/L)	Concentración final (g/L)	Cambio (Δ g/L)
<i>Lactosa</i>	37.43 \pm 0.37	24.31 \pm 0.06	13.12 \pm 0.38
<i>Nitrógeno</i>	1.01 \pm 0.20	0.34 \pm 0.13	0.68 \pm 0.24
<i>Fosfatos</i>	0.50 \pm 0.02	0.40 \pm 0.12	0.10 \pm 0.12
<i>Biomasa</i>	1.12 \pm 0.03	3.70 \pm 0.05	2.57 \pm 0.06
<i>PHA</i>	0.005 \pm 0.004	0.417 \pm 0.041	0.41 \pm 0.04
<i>Subproductos</i>	8.57 \pm 0.44	11.07 \pm 0.90	2.50 \pm 1.00

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5 % (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 28: Coeficientes exactos de la fórmula estequiométrica de *B. subtilis* producto de la fermentación de suero de leche para la generación intracelular de PHA obtenidos de la ecuación estequiométrica representativa de la fermentación.

Coefficiente	Valor
a	1.00
b	2.08
c	0.60
d	0.32
e	0.04

Cuadro 29: Coeficientes exactos de la ecuación estequiométrica de la fermentación de suero de leche en *B. subtilis* utilizando glucosa hidrolizada de lactosa para la producción intracelular de PHA obtenidos a partir de los rendimientos de consumo de sustratos y generación de biomasa y productos.

Coeficiente	Valor
Y_N	0.125
$Y_{HPO_4^-}$	0.015
Y_{O_2}	0.589
Y_{XS}	0.392
Y_{CO_2}	0.608
Y_{H_2O}	0.788

Cuadro 30: Medición de la concentración de nitrógeno en duplicado durante la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA.

Tiempo (h)	Concentración de nitrógeno (± 0.1 mg/L)	
	Corrida 1	Corrida 2
0	8.7	11.5
24	5.8	7.8
48	4.3	5.5
72	2.4	4.3

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 31: Medición de la concentración de nitrógeno en duplicado y valor promedio obtenido durante la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA.

Tiempo (h)	Concentración de nitrógeno (± 0.10 g/L)		Concentración de nitrógeno (± 0.10 g/L)
	Corrida 1	Corrida 2	
0	0.87	0.12	1.01 \pm 0.20
24	0.58	0.78	0.68 \pm 0.14
48	0.43	0.55	0.49 \pm 0.08
72	0.24	0.43	0.34 \pm 0.13

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 32: Cuantificación de lactosa por HPLC y de la masa de biomasa y el producto de la primera corrida de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.

Tiempo (h)	Concentración de lactosa (± 0.001 %m/v)	Masa de biomasa (± 0.0001 g)	Masa de producto (± 0.0001 g)
0	3.716	0.0550	0.0001
1	3.703	0.0563	0.0001
2	3.822	0.0575	0.0002
3	3.663	0.0619	0.0001
4	3.678	0.0650	0.0002
5	3.603	0.0689	0.0004
6	3.563	0.0745	0.0005
7	3.568	0.0789	0.0003
8	3.467	0.0801	0.0004
9	3.560	0.0858	0.0004
10	3.416	0.0899	0.0005
24	3.436	0.0982	0.0017
26	3.278	0.0982	0.0029
28	3.641	0.0949	0.0033
30	3.589	0.0977	0.0034
32	3.128	0.1022	0.0041
36	2.826	0.1098	0.0046
48	2.731	0.1506	0.0089
50	2.521	0.1694	0.0112
52	2.646	0.1776	0.0131
54	2.456	0.1895	0.0143
56	2.451	0.1883	0.0156
60	2.432	0.1878	0.0183
72	2.435	0.1864	0.0223

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 33: Cuantificación de lactosa por HPLC y de la masa de biomasa y el producto de la segunda corrida de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.

Tiempo (h)	Concentración de lactosa (± 0.001 %m/v)	Masa de biomasa (± 0.0001 g)	Masa de producto (± 0.0001 g)
0	3.769	0.0574	0.0004
2	3.647	0.0600	0.0003
4	3.624	0.0602	0.0041
6	3.477	0.0617	0.0038
8	3.322	0.0631	0.0042
10	3.243	0.0605	0.0052
24	3.050	0.0927	0.0053
27	3.170	0.0978	0.0051
30	2.848	0.0993	0.0051
32	2.487	0.1425	0.0081
48	2.853	0.1571	0.0136
50	2.700	0.1692	0.0173
56	2.502	0.1734	0.0182
72	2.426	0.1832	0.0194

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5 % (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 34: Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y rendimiento del producto de la primera corrida de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.

Tiempo (h)	Concentración de lactosa (± 0.01 g/L)	Peso seco de biomasa (± 0.05 g/L)	Concentración de producto (± 0.05 g/L)
0	37.16	1.10	0.002
1	37.03	1.13	0.002
2	38.22	1.15	0.004
3	36.63	1.24	0.002
4	36.78	1.30	0.004
5	36.03	1.38	0.008
6	35.63	1.49	0.010
7	35.68	1.58	0.006
8	34.67	1.60	0.008
9	35.60	1.72	0.008
10	34.16	1.80	0.010
24	34.36	1.96	0.034
26	32.78	1.96	0.058
28	36.41	1.90	0.066
30	35.89	1.95	0.068
32	31.28	2.04	0.082
36	28.26	2.20	0.092
48	27.31	3.01	0.178
50	25.21	3.39	0.224
52	26.46	3.55	0.262
54	24.56	3.79	0.286
56	24.51	3.77	0.312
60	24.32	3.76	0.366
72	24.35	3.73	0.446

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 35: Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y rendimiento del producto de la segunda corrida de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.

Tiempo (h)	Concentración de lactosa (± 0.01 g/L)	Peso seco de biomasa (± 0.05 g/L)	Concentración de producto (± 0.05 g/L)
0	37.69	1.15	0.008
2	36.47	1.20	0.006
4	36.24	1.20	0.082
6	34.77	1.23	0.076
8	33.22	1.26	0.084
10	32.43	1.21	0.104
24	30.50	1.85	0.106
27	31.70	1.96	0.102
30	28.48	1.99	0.102
32	24.87	2.85	0.162
48	28.53	3.14	0.272
50	27.00	3.38	0.346
56	25.02	3.47	0.364
72	24.26	3.66	0.388

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 36: Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y rendimiento del producto como media aritmética del duplicado de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.

Tiempo (h)	Concentración de lactosa (± 0.20 g/L)	Peso seco de biomasa (± 0.10 g/L)	Concentración de producto (± 0.040 g/L)
0	37.43	1.12	0.005
1	37.03	1.13	0.002
2	37.35	1.17	0.005
3	36.63	1.24	0.002
4	36.51	1.25	0.043
5	36.03	1.38	0.008
6	35.20	1.36	0.043
7	35.68	1.58	0.006
8	33.95	1.43	0.046
9	35.60	1.72	0.008
10	33.30	1.50	0.057
24	32.43	1.91	0.070
26	32.78	1.96	0.058
27	31.70	1.96	0.102
28	32.45	1.94	0.084
30	30.38	2.40	0.115
32	31.28	2.04	0.082
36	28.40	2.67	0.182
48	27.16	3.20	0.262
50	25.21	3.39	0.224
52	26.46	3.55	0.262
54	24.79	3.63	0.325
56	24.51	3.77	0.312
60	24.29	3.71	0.377
72	24.35	3.73	0.446

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

Cuadro 37: Cuantificación de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y rendimiento del producto como media móvil del duplicado de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a una razón molar de carbono-nitrógeno de 15:1 en escala de 10 L.

Tiempo (h)	Concentración de lactosa (± 0.20 g/L)	Peso seco de biomasa (±0.10 g/L)	Concentración de producto (±0.040 g/L)
0	37.43	1.12	0.005
1	37.23	1.13	0.002
2	37.19	1.15	0.003
3	36.99	1.21	0.017
4	36.57	1.24	0.023
5	36.27	1.32	0.025
6	35.62	1.37	0.026
7	35.44	1.47	0.025
8	34.8	1.5	0.026
9	34.77	1.57	0.027
10	34.45	1.61	0.033
24	32.86	1.91	0.063
26	32.61	1.94	0.064
27	32.24	1.96	0.080
28	32.07	1.95	0.093
30	31.41	2.17	0.099
32	30.83	2.22	0.099
36	29.84	2.36	0.132
48	27.78	2.93	0.222
50	26.18	3.29	0.243
52	25.84	3.47	0.243
54	25.63	3.59	0.293
56	24.6	3.70	0.318
60	24.40	3.74	0.344
72	24.35	3.72	0.412

Los datos fueron obtenidos de la fermentación de suero cocido con base en los resultados anteriores a una razón molar de 15:1 utilizando urea como fuente de nitrógeno y a una proporción de volumen de inóculo de 5% (v/v). Se trabajó a escala de 10 L con pH inicial de 7.1, 37°C y 200 rpm, a presión atmosférica de 0.844 atm.

A. Ecuaciones

1. Ecuaciones generales

Concentración de células por el método de Neubauer

$$N = n * d * 1 \times 10^4 \quad (13)$$

Donde:

N = Concentración de células (células/mL)

n = Número promedio de células contadas por cuadrante

d = Factor de dilución

Peso seco de biomasa

$$X = \frac{x}{V} \quad (14)$$

Donde:

X = Concentración de biomasa (g/L)

x = Peso seco de biomasa (g)

V = Volumen de fermentación correspondiente al peso seco (L)

Rendimiento de producto

$$P = \frac{p}{V} \quad (15)$$

Donde:

P = Rendimiento de producto (g/L)

p = Peso seco de producto (g)

V = Volumen de fermentación correspondiente al peso seco de producto (L)

Rendimiento de biomasa respecto del sustrato

$$Y_{XS} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (16)$$

Donde:

Y_{XS} = Rendimiento de biomasa con respecto al sustrato

ΔX = Cambio de concentración de biomasa (g/L)

ΔS = Cambio de concentración de sustrato (g/L)

Rendimiento de producto con respecto a la biomasa

$$Y_{PX} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (17)$$

Donde:

Y_{PX} = Rendimiento de producto con respecto a la biomasa

ΔP = Cambio de concentración de producto (g/L)

ΔX = Cambio de concentración de biomasa (g/L)

Rendimiento de producto con respecto al sustrato

$$Y_{PS} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (18)$$

Donde:

Y_{PS} = Rendimiento de producto con respecto al sustrato

ΔP = Cambio de concentración de producto (g/L)

ΔS = Cambio de concentración de sustrato (g/L)

Balance de masa simplificado

$$E = A + S \quad (19)$$

Donde:

E = Entradas al sistema (g/L)

S = Salidas del sistema (g/L)

A = Acumulación en el sistema (g/L)

Rendimiento de biomasa y productos con respecto a lactosa

$$Y_L = \frac{n}{\Delta S_L} \quad (20)$$

Donde:

n = Concentración de productos o biomasa generados (g/L)

ΔS_L = Cambio de concentración de lactosa* (g/L)

**En el caso del rendimiento para biomasa, se suman los cambios de concentración de nitrógeno y fosfatos.*

Rendimiento de biomasa y productos respecto con glucosa

$$Y_G = \frac{n}{\Delta S_G} \quad (21)$$

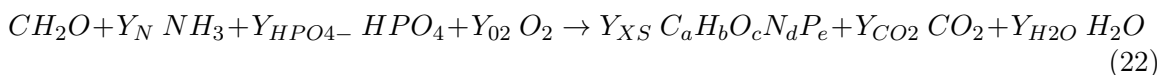
Donde:

n = Concentración de productos o biomasa generados (g/L)

ΔS_G = Cambio de concentración de glucosa* (g/L)

**En el caso del rendimiento para biomasa, se suman los cambios de concentración de nitrógeno y fosfatos.*

Ecuación estequiométrica de la fermentación de glucosa obtenida de lactosa en suero de leche por *B. subtilis* para la producción intracelular de PHA



Donde:

Y_N = Consumo de fuente de nitrógeno/Consumo de fuente de carbono

$Y_{HPO_4^-}$ = Consumo de fuente de fósforo/Consumo de fuente de carbono

Y_{O_2} = Consumo de oxígeno/Consumo de fuente de carbono

Y_{XS} = Formación de biomasa/Consumo de fuente de carbono

Y_{CO_2} = Generación de dióxido de carbono/Consumo de fuente de carbono

Y_{H_2O} = Generación de agua/ Consumo de fuente de carbono

Coefficiente de respiración celular

$$CR = 1.033 = \frac{Y_{CO_2}}{Y_{O_2}} \quad (23)$$

Donde:

CR = Coeficiente de respiración celular

Y_{CO_2} = Generación de dióxido de carbono/Consumo de fuente de carbono

Y_{O_2} = Consumo de oxígeno/Consumo de fuente de carbono

Relación molar oxígeno/hidrógeno en células bacterianas

$$O/H = 0.2873 = \frac{\text{mol } O}{\text{mol } H} \quad (24)$$

Donde:

O/H = Relación molar de oxígeno e hidrógeno en células bacterianas

$\text{mol } O$ = Moles de oxígeno por mol de biomasa

$\text{mol } H$ = Moles de hidrógeno por mol de biomasa

2. Análisis estadístico y de error

Media aritmética

$$m = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (25)$$

Donde:

m = Promedio

x_i = Datos de la muestra

N = Número total de datos

Media móvil

$$M = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{i-1} \quad (26)$$

Donde:

M = media móvil

x_{i-1} = Datos de la muestra en períodos anteriores

N = Número total de datos

Desviación estándar de muestras

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - m)^2}{N - 1}} \quad (27)$$

Donde:

σ = Desviación estándar

x_i = Datos de la muestra

m = Media aritmética

N = Número total de datos

Error estándar de muestras

$$SE = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (28)$$

Donde:

SE = Error estándar de la muestra

σ = Desviación estándar de la muestra

n = Número total de datos

Propagación de error por suma o resta

$$s_y = \sqrt{(s_a)^2 + (s_b)^2 + \dots} \quad (29)$$

Donde:

s_y = Incertidumbre del resultado de la suma o resta

s_i = Incertidumbre de cada medición

Propagación de error por multiplicación o división

$$\frac{s_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{s_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{s_b}{b}\right)^2 + \dots} \quad (30)$$

Donde:

s_y/y = Incertidumbre del resultado de la multiplicación o división

s_i = Incertidumbre de cada medición

i = Valor de cada medición

B. Cálculos

Cálculo 1: Determinación de la composición de los medios de fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA.

Para un tamaño de inóculo de 1 % v/v y una concentración de fuente de nitrógeno de 0.5 % m/v a un volumen final de 80 mL:

Volumen de inóculo

$$80 \text{ mL sol. ferment.} * \frac{1 \text{ mL inoc.}}{100 \text{ mL sol. ferment.}} = 0.8 \text{ mL de inoc.}$$

Volumen de suero de leche

$$80 \text{ mL sol. ferment.} - 0.8 \text{ mL de inoc.} = 79.2 \text{ mL de suero de leche}$$

Masa de fuente de nitrógeno

$$80 \text{ mL sol. ferment.} * \frac{0.5 \text{ g fuente de N}}{100 \text{ mL sol. ferment.}} = 0.4 \text{ g de fuente de N}$$

**Se utilizó este cálculo para determinar la composición de las fermentaciones a escala de 80 mL en las pruebas de efecto de tamaño de inóculo en la producción de PHA a partir de suero de leche (Ver Cuadro 4 en Anexo B).*

Cálculo 2: Determinación de la cantidad de fuente de nitrógeno a emplear en fermentaciones de suero de leche a escala de 80 mL según la relación molar C:N.

A una concentración de lactosa en el suero de leche de crudo de 54.92 g/L y de nitrógeno de 0.087 g/L:

Moles de C:

$$80 \text{ mL} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} * \frac{54.92 \text{ g } C_{12}H_{22}O_{11}}{L} * \frac{1 \text{ mol } C_{12}H_{22}O_{11}}{342.3 \text{ g } C_{12}H_{22}O_{11}} * \frac{12 \text{ mol C}}{1 \text{ mol } C_{12}H_{22}O_{11}} = 0.1540 \text{ mol C}$$

Masa inicial de nitrógeno

$$80 \text{ mL} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} * \frac{0.087 \text{ g N}}{1 \text{ L}} * \frac{1 \text{ mol N}}{14.0067 \text{ g N}} = 0.000497 \text{ mol N}$$

Masa de N necesaria para una relación molar de 10:1 carbono-nitrógeno:

$$0.1540 \text{ mol C} * \frac{1 \text{ mol N}}{10 \text{ mol C}} = 0.0154 \text{ mol N}$$

Masa de fuente de nitrógeno

Urea

$$(0.0154 - 0.000497) \text{ mol N} * \frac{1 \text{ mol } CH_4N_2O}{2 \text{ mol N}} * \frac{60.06 \text{ g } CH_4N_2O}{1 \text{ mol } CH_4N_2O} = 0.4476 \text{ g urea}$$

Sulfato de amonio

$$(0.0154 - 0.000497) \text{ mol N} * \frac{1 \text{ mol } (NH_4)_2SO_4}{2 \text{ mol N}} * \frac{132.14 \text{ g } (NH_4)_2SO_4}{1 \text{ mol } (NH_4)_2SO_4} = 0.9848 \text{ g SA}$$

**Se utilizó este cálculo para determinar la cantidad de fuente de nitrógeno a agregar a cada solución de fermentación de suero de leche para la producción de PHA en pruebas a escala de 80 mL y a escala de 10 L (Ver Cuadros 5 y 6 en Anexos)*

Cálculo 3: Determinación de la concentración de células en inóculos de *B. subtilis* para fermentaciones de suero de leche por el método de Neubauer

Según la Ecuación 25 para el promedio de número de células:

$$m = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i = \left(\frac{32 + 34 + 33 + 35}{4} \right) = 33.5 \text{ células}$$

Según la Ecuación 13

$$N = 33.5 * 100 * 1 \times 10^4 = 3.35 \times 10^7 \text{ células/mL}$$

**Se utilizó la primera ecuación para la determinación de los valores promedio de muestras repetidas. Además, se utilizó este cálculo para la determinación de la concentración celular en los inóculos de *B. subtilis* en fermentaciones de suero de leche para la producción de PHA (Ver Cuadros 7 y 8 en Anexo B).*

Cálculo 4: Conversión de la concentración lactosa en suero de leche a g/L cuantificado por HPLC

$$5.492 \% \text{ m/v} = \frac{5.492 \text{ g lactosa}}{100 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 54.92 \text{ g/L}$$

**Se utilizó este cálculo para determinar la concentración en g/L de lactosa, etanol y ácido láctico obtenidos como % m/v mediante HPLC para las distintas pruebas de fermentación de suero de leche para producción de PHA.*

Cálculo 5: Conversión de la concentración de nitrógeno y fosfatos en suero de leche a g/L cuantificado por colorimetría.

Corrigiendo para la dilución de 1:10 de la determinación de nitrógeno:

$$8.7 \text{ mg N/L} * 10 * \frac{1 \text{ g N}}{1000 \text{ mg N}} = 0.08 \text{ g N/L}$$

**Se utilizó este cálculo para determinar la concentración de nitrógeno y fosfatos en el suero de leche según el factor de dilución de cada prueba de fermentación para la producción de PHA a escala de 80 mL y 10 L (Ver Cuadros 10, 20 y 25 en Anexo B).*

Cálculo 6: Determinación de peso seco de biomasa de *B. subtilis* y rendimiento de PHA en g/L de la fermentación de lactosa en suero de leche para la producción de PHA.

Según las Ecuaciones 14 y 15:

$$X = \frac{0.1049 \text{ g biomasa}}{0.080 \text{ L}} = 1.31 \text{ g biomasa/L}$$

$$P = \frac{0.0110 \text{ g PHA}}{0.080 \text{ L}} = 0.14 \text{ g PHA/L}$$

**Se utilizó este cálculo para determinar el peso seco de biomasa de *B. subtilis* y el rendimiento de PHA de las fermentaciones de suero de leche a escala de 80 mL y 10 L.*

Cálculo 7: Determinación de los rendimientos YXS, YPX, YPS de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA

Según las Ecuaciones 16, 17 y 18:

$$Y_{XS} = \frac{1.31 \text{ g biomasa}}{(54.92 - 51.24) \text{ g lactosa}} = 0.356$$

$$Y_{PX} = \frac{0.14 \text{ g PHA}}{1.31 \text{ g biomasa}} = 0.105$$

$$Y_{PS} = \frac{0.14 \text{ g PHA}}{(54.92 - 51.24) \text{ g lactosa}} = 0.037$$

**Se utilizó este cálculo para determinar los rendimientos de la fermentación de lactosa en suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a escala de 80 mL.*

Cálculo 8: Determinación del balance de masa global de la fermentación de lactosa en suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA

Según la Ecuación 19:

$$\text{Balance de masa} = E - S = A$$

Con base en los flujos de entrada y salida descritos en el Cuadro 20: Entradas (E)

$$E = (37.43 \text{ g/L lac.}) + (1.01 \text{ g/L N}) + (0.50 \text{ g/L HPO}_4) = 38.94 \text{ g/L E}$$

Salidas principales(SP): biomasa y producto

$$SP = (2.57 \text{ g/L biomasa}) + (0.41 \text{ g/L PHA}) = 2.98 \text{ g/L SP}$$

Salidas secundarias (SS): entradas no consumidas y subproductos (sp)

$$SS = (24.31 \text{ g/L lac.}) + (0.34 \text{ g/L N}) + (0.40 \text{ g/L HPO}_4) + (6.56 \text{ g/L gal.}) + (2.50 \text{ g/L sp}) = 34.11 \text{ g/L SS}$$

Mantenimiento celular (MC) según acumulación (A)

$$A = 38.94 \text{ g/L} - 2.98 \text{ g/L} - 34.11 \text{ g/L} = 1.85 \text{ g/L} \quad A = 1.85 \text{ g/L MC}$$

*Se utilizó este cálculo para generar el diagrama del balance de masa global descrito en la Figura 12 en Resultados. Asimismo, se utilizó esta ecuación para determinar los cambios de concentración de entradas y salidas al sistema, según el Cuadro 21 en Anexo B.

Cálculo 9: Determinación de rendimientos de biomasa y productos con respecto al consumo de sustratos totales y reales de la fermentación de suero de leche para la producción de PHA con base en el balance de masa global

Según las Ecuaciones 20 y 21, para el rendimiento de producto:

$$Y_L = \frac{n}{\Delta S_L} = \frac{0.41 \text{ g/L}}{(37.43 - 24.31) \text{ g/L}} = 0.031 \text{ g PHA/ g lactosa}$$

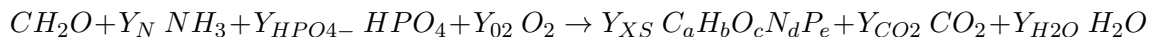
Dado que la lactosa se compone en un 50% de glucosa, el sustrato metabolizado por *B. subtilis*

$$Y_G = \frac{n}{\Delta S_G} = \frac{0.41 \text{ g/L}}{0.50 * (37.43 - 24.31) \text{ g/L}} = 0.063 \text{ g PHA/ g glucosa}$$

*Se utilizó este cálculo para determinar los rendimientos de biomasa y subproductos de la fermentación de suero de leche para producción de PHA respecto a lactosa y glucosa (Ver Cuadro 2 en Resultados). En el caso de biomasa, se sumó al cambio de concentración de sustrato, los cambios de concentración de nitrógeno y fosfatos.

Cálculo 10: Determinación de la fórmula y ecuación estequiométrica de la fermentación de suero de leche en *B. subtilis* utilizando glucosa hidrolizada de lactosa para la producción intracelular de PHA.

Planteando la ecuación estequiométrica según la Ecuación 22:



Se consideró como principal fuente de carbono a la glucosa proveniente de la hidrólisis de lactosa por *B. subtilis*, como fuente de nitrógeno se consideró al amonio proveniente de la descomposición de urea y como fuente de fósforo se consideró al fosfato disódico. Según los cambios de concentración descritos en el Cuadro 20 en Anexos:

$$Y_{X S} = \frac{2.57 \text{ g/L biomasa}}{0.50 * (13.12 \text{ g/L lactosa})} = 0.392$$

$$Y_N = \frac{0.68 \text{ g/L N} * \frac{1 \text{ mol N}}{14.0067 \text{ g N}} * \frac{1 \text{ mol NH}_3}{1 \text{ mol N}} * \frac{17.031 \text{ g NH}_3}{1 \text{ mol NH}_3}}{0.50 * (13.12 \text{ g/L lactosa})} = 0.125$$

$$Y_{PO_4^-} = \frac{0.10 \text{ g/L } HPO_4^-}{0.50 * (13.12 \text{ g/L } lactosa)} = 0.015$$

Planteando los balances elementales:

$$\text{C: } 1 - Y_{XS} - Y_{CO_2} = 0$$

$$\text{H: } 2 + 3 Y_N + Y_{PO_4} - b Y_{XS} - 2 Y_{H_2O} = 0$$

$$\text{O: } 1 + 4 Y_{PO_4} + 2 Y_{O_2} - c Y_{XS} - 2 Y_{CO_2} - Y_{H_2O} = 0$$

$$\text{N: } Y_N - d Y_{XS} = 0$$

$$\text{P: } Y_{HPO_4^-} - e Y_{XS} = 0$$

Y según las Ecuaciones 23 y 24:

$$CR = 1.033 = \frac{Y_{CO_2}}{Y_{O_2}}$$

$$O/H = 0.2873 = \frac{\text{mol } O}{\text{mol } H}$$

Asumiendo que $a = 1$ por la simplificación de todos los compuestos con carbono, se tiene un sistema de ecuaciones lineales con 7 ecuaciones y 7 variables (Y_{CO_2} , Y_{H_2O} , Y_{O_2} , b , c , d , e) con solución. Resolviendo para el sistema:

$$b = 2.08$$

$$c = 0.60$$

$$d = 0.32$$

$$e = 0.04$$

$$Y_{O_2} = 0.589$$

$$Y_{CO_2} = 0.608$$

$$Y_{H_2O} = 0.788$$

Para obtener la ecuación estequiométrica final en números enteros, que suele ser la forma ideal a la que se presenta como resultado, se dividió tanto para la fórmula característica de la bacteria como para la ecuación general dentro del coeficiente más pequeño, obteniendo como resultado los siguientes coeficientes. Para el coeficiente de la glucosa, que por convención se considera 1, se obtuvo un valor de 11 mol:

$$a = 26$$

$$b = 53$$

$$c = 16$$

$$d = 8$$

$$e = 1$$

$$Y_X = 1$$

$$Y_{NH_3} = 8$$

$$Y_{HPO_4^-} = 1$$

$$Y_{O_2} = 39$$

$$Y_{CO_2} = 40$$

$$Y_{H_2O} = 59$$

**Se utilizó este cálculo para plantear la fórmula estequiométrica de *B. subtilis* con formación intracelular de PHA según la Ecuación 8 en Resultados. También se utilizó para determinar la ecuación estequiométrica de la producción de PHA por *B. subtilis* a partir del metabolismo de lactosa en suero de leche según la Ecuación 9 en Resultados y para plantear el balance de materia elemental del proceso, según la Figura 13 en Resultados.*

Cálculo 11: Determinación de la media móvil de la concentración de lactosa, peso seco de biomasa y rendimiento de producto del modelo cinético del duplicado de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA.

Según los datos del promedio de concentración de sustrato (Cs) (Cuadro 29 en Anexos), $t = 0$, $C_s = 37.43$ g/L, en $t=1$, $C_{s1} = 37.03$ g/L. Según la Ecuación 26 para la media móvil del valor de Cs en $t = 1$:

$$M = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{i-1} = \left(\frac{37.43 + 37.03 \text{ g/L}}{2} \right) = 37.23 \text{ g/L}$$

**Se utilizó este cálculo para obtener el promedio móvil de los datos de concentración de lactosa, peso seco de biomasa y rendimiento de producto para el modelo cinético a partir de los datos promedio de la fermentación de suero de leche por *B. subtilis* para la producción de PHA a una razón molar de 15:1 a escala de 10 L.*

Cálculo 12: Determinación del error estándar a partir de la desviación estándar de una muestra

Según los datos de rendimiento de biomasa respecto al sustrato (Y_{xs}) del Cuadro 17 en Anexo B, con un promedio de $Y_{xs} = 0.351$ determinado por la Ecuación 25 (Ver Cálculo 3) y la Ecuación 27:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - m)^2}{N - 1}} = \sqrt{\frac{(0.356 - 0.351)^2 + (0.345 - 0.351)^2}{2 - 1}} = 0.008$$

Para determinar el error estándar de la muestra, a partir de la desviación estándar y el número de muestras, según la Ecuación 28:

$$SE = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{0.008}{\sqrt{2}} = 0.006$$

Resultado : 0.351 ± 0.006

**Se utilizó este cálculo para determinar la desviación estándar del promedio de datos de las muestras obtenidas en duplicado.*

Cálculo 13: Propagación de error de datos calculados

Según los valores de las desviaciones estándar de las concentraciones de entrada (37.43 ± 0.37 g/L) y salida (24.31 ± 0.06 g/L) de lactosa en el Cuadro 21 en Anexo B, para el cambio de concentración de lactosa de 13.12 g/L, según la Ecuación 29:

$$s_y = \sqrt{(0.37)^2 + (0.06)^2} = 0.38$$

Obteniendo un valor de 13.12 ± 0.38 g/L de consumo de lactosa. Se realizó el mismo cálculo para la propagación de error de los cambios de concentración de sustratos y productos, obteniendo para el producto un valor de 0.41 ± 0.04 g/L (Ver Cuadro 21 en Anexo B). Para la determinación del error asociado al rendimiento de formación de producto sobre consumo de lactosa ($YL = 0.031$), según la Ecuación 30:

$$s_y = \sqrt{\left(\frac{0.04}{0.41}\right)^2 + \left(\frac{0.38}{13.12}\right)^2} * 0.031 = 0.003$$

Resultado : 0.031 ± 0.003

**Se utilizaron estos cálculos para estimar la propagación de error de todas las sumas, restas, multiplicaciones y divisiones realizadas durante el análisis de datos originales y calculados.*

A. Datos de placa

Cuadro 38: Especificaciones de cámara de Neubauer BRAND del Centro de Procesos Industriales del Departamento de Ingeniería Química

<i>Cámara de Neubauer</i>		
Marca	BRAND	-
Modelo	Neubauer improved	-
Profundidad	0.100	mm
Área	0.0025	m ²

Cuadro 39: Especificaciones de incubadora Lab-Line del Laboratorio de Procesos Bioindustriales del Centro de Investigación y Tecnología

<i>Incubadora</i>		
Marca	Lab-Line	-
Modelo	310	-
Serie	0599-0437	-
Voltaje	120	V
Amperaje	5.0	A
Watts	600	W
Frecuencia	50/60	Hz

Cuadro 40: Especificaciones de refrigeradora Mabe del Laboratorio de Procesos Bioindustriales

<i>Refrigeradora</i>		
Marca	Mabe	-
Modelo	RM44W04	-
Voltaje	115	V
Amperaje	15	A
Frecuencia	60	Hz

Cuadro 41: Especificaciones de potenciómetro con electrodo OHAUS del Centro de Procesos Industriales

<i>Potenciómetro con electrodo</i>		
Marca	OHAUS	-
Modelo	Potenciómetro: ST300-B Electrodo pH: ST320	-
Requerimientos	4 baterías AAA	-
Resolución	pH: 0.01	-
	Voltaje: 1	mV
	Temperatura:0.1	°C
Rango	pH: 0.0-14.0	-
	Voltaje: -1999 - 1999	mV
	Temperatura:0 / 100	°C

Cuadro 42: Especificaciones de autoclave NAPCO del Laboratorio de Procesos Bioindustriales

<i>Autoclave</i>		
Marca	NAPCO	-
Modelo	8000- DSE	-
Aplicaciones	Esterilización de sólidos o líquidos	-
Voltaje	115	V
Amperaje	15.5	A
Watts	1750	W
Frecuencia	60	Hz
Rangos	Presión: 1.0-1.9	bar
	Temperatura: 121-132	°C
	Tiempo: 0-75	min

Cuadro 43: Especificaciones de centrífuga Eppendorf del Laboratorio de Procesos Bioindustriales

<i>Centrífuga</i>		
Marca	Eppendorf	-
Modelo	5805 F	-
Número	0033302	-
Voltaje	120	V
Amperaje	12	A
Watts	1300	W
Frecuencia	60	Hz
Velocidad máxima	1400	min ⁻¹

Cuadro 44: Especificaciones de centrífuga Sorvall® del Laboratorio de Procesos Bioindustriales

<i>Centrífuga</i>		
Marca	Sorvall ®	-
Modelo	RT-7	-
Voltaje	115	V
Amperaje	12	A
Watts	1400	W
Frecuencia	60	Hz
Velocidad máxima	7000	rpm

Cuadro 45: Especificaciones de colorímetro HACH® del Centro de Procesos Industriales

<i>Colorímetro HACH®</i>		
Marca	HACH®	-
Modelo	DR/890	-
Rangos	Temperatura: 0-50	°C
	Fotométrico: 0-2	A
Modos de lectura	% Transmitancia,	-
	absorbancia, concentración	
Clase	1	-
Longitud de onda	420, 520, 560, 610	nm

Cuadro 46: Especificaciones de reactor digital HACH® del Centro de Procesos Industriales

<i>Reactor digital</i>		
Marca	HACH®	-
Modelo	DBR 200	-
Temperaturas	37-165	°C
Voltaje	100-240	V
Frecuencia	50/60	Hz
Clase	1	-
Programas	COD, TOC, 100°C, 105°C, 150°C, 165°C	-

Cuadro 47: Especificaciones de cromatógrafo de alta resolución Agilent Technologies del Laboratorio de Analítica Instrumental Avanzada

<i>Cromatógrafo de alta resolución (HPLC)</i>		
Marca	Agilent Technologies	-
Modelo	Serie 1200	-
No. Serie	CN60557002	-
No. Producto	P1362A	-
Voltaje	100-120	V
Frecuencia	50/60	Hz

Cuadro 48: Especificaciones de incubadora con agitación New Brunswick Scientific del Laboratorio de Procesos Bioindustriales

<i>Incubadora con agitación</i>		
Marca	New Brunswick Scientific	-
Modelo	G25-KC	-
Serie	25	-
Amperaje fusible	10	A
Rangos	Temperatura: 4-60 Velocidad: 40-400	°C rpm

Cuadro 49: Especificaciones de microscopio Fisher Scientific del Laboratorio de Procesos Bioindustriales

<i>Microscopio</i>		
Marca	Fisher Scientific	-
Línea	Micromaster®	-
No. Catálogo	12563320	-
Voltaje	110	V
Amperaje	125	mA
Frecuencia	50/60	Hz
Tipo de iluminación	Halógeno de cuarzo 6V 20W	-

Cuadro 50: Especificaciones de balanza analítica OHAUS Pioneer del Laboratorio de Operaciones Unitarias

<i>Balanza analítica</i>		
Marca	OHAUS Pioneer TM	-
Modelo	PA114	-
Capacidad	0-110	g
Incertidumbre	0.0001	g
Voltaje	8-14.5	V
Amperaje	4	VA
Frecuencia	60	Hz

Cuadro 51: Especificaciones de balanza OHAUS del Laboratorio de Operaciones Unitarias

<i>Balanza</i>		
Marca	OHAUS	-
Modelo	CS 5000	-
Capacidad	5000 x 1	g x g
Voltaje	9-12	VDC
Amperaje	0.2	A

Cuadro 52: Especificaciones de horno de convección VWR® del Laboratorio de Procesos Bioindustriales

<i>Horno de convección</i>		
Marca	VWR ®	-
Línea	Symphony TM	-
Parte No.	414004-550	-
No. serie	041042611A1013	-
Voltaje	120	V
Watts	1.4	kW
Frecuencia	60	Hz

Cuadro 53: Especificaciones de espectrofotómetro FT-IR PerkinElmer Frontier del Laboratorio de Analítica Instrumental Avanzada

<i>Espectrofotómetro FT-IR</i>		
Marca	PerkinElmer Frontier	-
Modelo	LR 64912C	-
Clase	1	-
Voltaje	100-300	V
Amperaje	1.5	A
Frecuencia	50/60	Hz

Cuadro 54: Especificaciones de biorreactor BioFlo 415 New Brunswick Scientific del Centro de Procesos Industriales

<i>Bioreactor</i>		
Marca	New Brunswick Scientific	-
Modelo	BioFlo 415	-
Capacidad	19.5	L
Rangos	Agitación: 50-1000	rpm
	Temperatura: 5-80	°C
	pH: 2.0-12.0	-
	Oxígeno disuelto: 0-200	%
Requerimientos	Gas de proceso: 20	
	Suministro de agua: 10	psig
	Retorno de agua: máx 5	
Voltaje	208-230	V
Amperaje	15	A
Frecuencia	50/60	Hz

Cuadro 55: Especificaciones de micropipetas Eppendorf del Centro de Procesos Industriales

<i>Micropipetas</i>		
Marca	Eppendorf	-
Modelo	Research (®) plus	-
Capacidad	100	μL
	1000	μL
	10	mL
Rangos	1-100	μL
	100- 1000	μL
	1-10	mL

B. Fichas técnicas

Cuadro 56: Especificaciones de caldo nutritivo

<i>Caldo nutritivo</i>	
Marca	Merck
No. Producto	1.05443
Composición típica	Peptona de carne 5.0 g/L Extracto de malta 3.0 g/L
Preparación	Suspender 8 g por litro. Autoclavear (15 min a 121°C)
Características	Sólido beige
Densidad aparente	470 kg/m ³
pH	7.0 \pm 0.2

Cuadro 57: Especificaciones de agar nutritivo

<i>Agar nutritivo</i>	
Marca	Merck
No. Producto	1.11471
Composición típica	Peptona de carne 10.0 g/L Extracto de malta 10.0 g/L Cloruro de sodio 5.0 g/L Agar-Agar 18.0 g/L
Preparación	Suspender 43 g por litro. Autoclavear (15 min a 121°C)
Características	Sólido amarillo
Densidad aparente	560 kg/m ³
pH	7.3 ± 0.2

Cuadro 58: Especificaciones de sulfato de amonio

<i>Sulfato de amonio</i>	
Fórmula química	(NH ₄) ₂ SO ₄
Marca	Supelco
No. CAS	7783-20-2
Características	Sólido cristalino incoloro
Peso molecular	132.14 g/mol
Densidad relativa	1.77 g/cm ³
Solubilidad en agua	767 g/L
pH	5.0-6.0

Cuadro 59: Especificaciones de urea

<i>Urea</i>	
Fórmula química	CH ₄ N ₂ O
Marca	Merck
No. CAS	57-13-6
Características	Sólido cristalino blanco
Peso molecular	60.05 g/mol
Densidad relativa	1.33 g/cm ³
Solubilidad en agua	624 g/L
pH	7.5-9.5

Cuadro 60: Especificaciones de fosfato de disodio

<i>Fosfato de disodio</i>	
Fórmula química	Na_2HPO_4
Marca	Merck
No. CAS	7558-79-4
Características	Sólido cristalino blanco
Peso molecular	141.96 g/mol
Densidad relativa	1.53 g/cm ³
Solubilidad en agua	77 g/L
pH	8.9 – 9.2

Cuadro 61: Especificaciones de azul de tripán

<i>Azul de tripán</i>	
Fórmula química	$C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$
Marca	Sigma-Aldrich
No. CAS	72-75-1
Características	Sólido azul oscuro
Peso molecular	960.82 g/mol
Densidad	800 kg/m ³

Cuadro 62: Especificaciones de hidróxido de sodio

<i>Hidróxido de sodio</i>	
Fórmula química	NaOH
Marca	Carl Roth
No. CAS	1310-73-2
Características	Sólido incoloro
Peso molecular	40.0 g/mol
Densidad relativa	2.13 g/cm ³
Solubilidad en agua	1.11 g/L
pH	14.0

Cuadro 63: Especificaciones de la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6051

<i>Bacillus subtilis</i>	
Cepa	ATCC 6051
Tipo	Sí
Presentación	Liofilizada en hisopo
Almacenamiento	2-8°C
Nivel de bioseguridad	BSL 1
Medio	Caldo o agar nutritivo
Temperatura	30-37°C
Atmósfera	Aeróbica