

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



EVALUACIÓN DE TRES CEPAS PARA PRODUCIR  
POLIHIDROXIALCANOATOS A ESCALA LABORATORIO  
UTILIZANDO MELAZA

Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional presentado por

Brenda Melissa Duarte Sanabria

para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Química

Guatemala

2021





UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



EVALUACIÓN DE TRES CEPAS PARA PRODUCIR  
POLIHIDROXIALCANOATOS A ESCALA LABORATORIO  
UTILIZANDO MELAZA

Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional presentado por

Brenda Melissa Duarte Sanabria


para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Química

Guatemala

2021

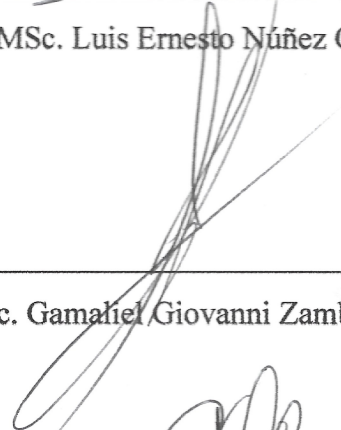


Vo. Bo. :

(f)   
MSc. Luis Ernesto Núñez González

Tribunal Examinador:

(f)   
MSc. Luis Ernesto Núñez González

(f)   
MSc. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano

(f)   
MSc. Carmen Alicia Ortiz Pineda

Fecha de aprobación: Guatemala, 19 de febrero de 2021



# PREFACIO

La elaboración de este trabajo de graduación ha sido uno de los mayores retos de mi vida. La planificación de la fase experimental, que es la parte medular de este trabajo, se realizó en el 2019, esperando que el siguiente año transcurriera como cualquier otro. Al principio del 2020, empecé el desarrollo de la fase experimental siguiendo el cronograma de trabajo. Pronto nos vimos interrumpidos por algo para lo que nadie planificó, la pandemia del COVID-19.

La incertidumbre de las precauciones que se tomarían, la inestabilidad de las normativas que cambiaban rápidamente y el cierre temporal del país hicieron imposible la planificación y ejecución de las actividades experimentales. Para una persona como yo, que le gusta estar en control y tener planificaciones detalladas de cómo se realizarán las acciones, esta fue una gran oportunidad de aprendizaje. No siempre se sabe con qué problemas nos vamos a enfrentar, no siempre se tienen las mejores herramientas para resolver, muchas veces toca tirar a la basura horas de trabajo, pero encontrar una solución donde no parece haber una es lo que significa ser un ingeniero químico, con este trabajo de graduación lo encarné.

Primeramente, quiero agradecer a mis padres y a mi abuela por el apoyo que me han brindado durante de mi carrera y en mi vida. Gracias por sus palabras de aliento, su comprensión, pero en especial por hacer de mí la persona que soy hoy.

Debo agradecer ahora a una de las personas sin las que se hubiera logrado este trabajo, el Ingeniero Gamaliel Zambrano que ingeniosamente desarrolló una metodología de trabajo remoto con la que logramos sobreponernos a la situación y cumplir nuestros objetivos. Además, quiero agradecer a otra persona que me apoyó desde el inicio de este proyecto, el Ingeniero Luis Núñez. Me encuentro muy agradecida de haberlo tenido como asesor, su acompañamiento hizo posible lo que muchas veces me pareció inalcanzable.

Tres personas más se merecen un amplio agradecimiento de mi parte, Héctor Molina, Cristian García y José Coc, que trabajaron virtualmente al lado mío e hicieron su mejor esfuerzo para que pudiera lograr este trabajo de graduación.

# CONTENIDO

<b>PREFACIO.....</b>	<b>VII</b>
<b>CONTENIDO .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE CUADROS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XXIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
A. Industria azucarera .....	3
B. Melaza.....	5
1. pH.....	5
2. Grados Brix .....	5
3. Compuestos volátiles .....	6
4. Viscosidad .....	6
5. Densidad.....	9
6. Azúcares .....	9
C. Polímeros .....	10
1. Biodegradabilidad .....	13
2. Origen.....	14
D. Polihidroxialcanoatos.....	15
1. Estructura .....	16
2. Propiedades físicas .....	17
3. Rutas de Biosíntesis .....	18
4. Aplicaciones .....	20

E.	Técnicas analíticas .....	21
1.	Cromatografía líquida de alta resolución .....	21
2.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier .....	23
3.	Cuantificación de biomasa .....	24
<b>III.</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>27</b>
A.	Sustratos .....	27
B.	Cepas.....	28
C.	Preparación del cultivo .....	29
D.	Fermentación.....	31
E.	Extracción .....	32
F.	Análisis del PHA extraído .....	33
<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
A.	General.....	37
B.	Específicos .....	37
<b>VI.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
A.	Determinación de la concentración de azúcares y propiedades físicas de la melaza.....	39
1.	Determinación de pH .....	39
2.	Determinación de la densidad .....	39
3.	Determinación de viscosidad .....	40
4.	Determinación de grados brix .....	40
5.	Determinación de compuestos volátiles.....	40
6.	Cuantificación de azúcares.....	41
B.	Elaboración del medio fermentativo .....	42
1.	Solución concentrada de sales.....	42
2.	Medio fermentativo .....	43
3.	Inoculación.....	44
C.	Fermentación.....	45
D.	Procedimientos analíticos .....	45
1.	Determinación del crecimiento celular .....	45

2.	Cuantificación de polihidroxicanoatos.....	45
3.	Cuantificación de azúcares en el fermentado.....	46
4.	Determinación de polihidroxicanoatos.....	46
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
A.	Determinación de la concentración de azúcares y propiedades físicas de la melaza.....	47
B.	Comparación de las formulaciones de los medios fermentativos en la producción de polihidroxicanoatos .....	48
C.	Cuantificación de las concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo .....	50
1.	<i>Bacillus Cereus</i> .....	50
2.	<i>Pseudomona putida</i> .....	55
3.	<i>Bacillus Subtilis</i> .....	60
D.	Análisis FTIR.....	65
<b>VIII.</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>87</b>
<b>X.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>89</b>
<b>XI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>91</b>
<b>XII.</b>	<b>APÉNDICES .....</b>	<b>97</b>
A.	Datos de placa .....	97
B.	Datos originales .....	98
C.	Cálculo de muestra.....	114
D.	Datos calculados .....	119
E.	Análisis de error .....	121
F.	Curvas de calibración.....	123
G.	Espectros FTIR .....	129
H.	Cromatogramas .....	130



# LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Viscosidad cinemática promedio para diferentes grados de melaza a una temperatura de 37.78 °C.....	8
Cuadro 2. Ejemplos de la nomenclatura y simbología según la longitud del monómero y los grupos que lo conforman .....	16
Cuadro 3. Cantidad de sacarosa, glucosa y fructosa en cada estándar utilizado en la calibración de cromatógrafo líquido de alta resolución. ....	41
Cuadro 4. Cantidad de sales pesada para hacer una solución madre .....	42
Cuadro 5. Concentración de especies químicas en la solución concentrada de sales utilizada en la fermentación. ....	42
Cuadro 6. Concentraciones iniciales evaluadas en la experimentación.....	43
Cuadro 7. Concentración de azúcares en melaza encontradas con cromatografía líquida de alta eficacia <sup>1</sup> .....	47
Cuadro 8. Propiedades fisicoquímicas de melaza encontradas de forma experimental <sup>1</sup> .....	47
Cuadro 9. Formulación de los medios fermentativos a partir de la combinación de los parámetros analizados.....	47
Cuadro 10. Rendimientos de polihidroxicanoatos respecto al consumo de azúcares totales en función del tiempo para las fermentaciones con <i>Bacillus cereus</i> a 35C <sup>1</sup> .....	54
Cuadro 11. Rendimientos de polihidroxicanoatos respecto al consumo de azúcares totales en función del tiempo para las fermentaciones con <i>Pseudomona putida</i> a 35C <sup>1</sup> .....	59
Cuadro 12. Rendimientos de polihidroxicanoatos respecto al consumo de azúcares totales en función del tiempo para las fermentaciones con <i>Bacillus subtilis</i> a 35C <sup>1</sup> .....	64
Cuadro 13. Picos de porcentaje de transmitancia en función de longitud de onda Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de <i>Bacillus cereus</i> .....	65
Cuadro 14. Picos de porcentaje de transmitancia en función de longitud de onda Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de <i>Pseudomona putida</i> ...	65
Cuadro 15. Picos de porcentaje de transmitancia en función de longitud de onda Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de <i>Bacillus subtilis</i> .....	66
Cuadro 16. Información del equipo utilizado durante la fase experimental .....	97

Cuadro 17. pH de una solución 0.1 g/mL de melaza medido con un potenciómetro digital <sup>1</sup> .....	98
Cuadro 18. Tara, peso del beaker y volumen a máxima capacidad del recipiente con melaza para la determinación de la densidad de esta sustancia <sup>1</sup> .....	99
Cuadro 19. Tiempo de vaciado de la copa Zahn número cinco para la determinación de viscosidad <sup>1</sup> .....	99
Cuadro 20. Grados Brix de melaza medido con un refractómetro digital medidos a 30 °C.....	99
Cuadro 21. Porcentaje de compuestos volátiles en melaza utilizando una balanza de humedad <sup>1</sup> .	99
Cuadro 22. Concentración de azúcares para una solución de melaza al 0.03 (m/v) <sup>1</sup> .....	100
Cuadro 23. Peso de especies químicas utilizadas para la preparación de una solución concentrada con la cual se realizó la solución madre utilizada para la preparación de los medios fermentativos <sup>1</sup> .....	100
Cuadro 24. Parámetros utilizados para la inoculación de los medios fermentativos para las tres cepas evaluadas <sup>1</sup> .....	100
Cuadro 25. Tara, peso del medio y peso obtenido del sólido seco de biomasa y de polihidroxicarboxilatos para la cepa <i>Bacillus Cereus</i> .....	101
Cuadro 26. Tara, peso del medio y peso obtenido del sólido seco de biomasa y de polihidroxicarboxilatos para la cepa <i>Pseudomona putida</i> .....	103
Cuadro 27. Tara, peso del medio y peso obtenido del sólido seco de biomasa y de polihidroxicarboxilatos para la cepa <i>Bacillus subtilis</i> .....	106
Cuadro 28. Concentración de sacarosa, fructosa y glucosa de todas las combinaciones durante la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> .....	108
Cuadro 29. Concentración de sacarosa, fructosa y glucosa de todas las combinaciones durante la fermentación con <i>Pseudomona putida</i> .....	110
Cuadro 30. Concentración de sacarosa, fructosa y glucosa de todas las combinaciones durante la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> .....	112
Cuadro 31. pH de una solución 0.1 g/mL de melaza corregido con la curva de calibración de un potenciómetro digital <sup>1</sup> .....	119
Cuadro 32. Concentración del ion hidronio en melaza encontrada a partir de la ecuación de la definición de pH utilizando los datos de una solución 0.1 g/mL de un potenciómetro digital <sup>1</sup> ..	119

Cuadro 33. pH de melaza a partir de la ecuación de la definición de pH utilizando los datos de una solución 0.1 g/mL de un potenciómetro digital <sup>1</sup> .....	119
Cuadro 34. Peso de melaza medido en un beaker y densidad de melaza <sup>1</sup> .....	120
Cuadro 35. Viscosidad de melaza obtenido con tiempos de vaciado para la copa Zahn número cinco <sup>1</sup> .....	120
Cuadro 36. Concentración de azúcares en melaza encontrada a partir de una solución de melaza al 0.03 (m/v) <sup>1</sup> .....	120
Cuadro 37. Concentración celular en el caldo nutritivo de crecimiento y en el medio fermentativo después de la inoculación.....	121



# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Productos de mayor exportación en Guatemala para el año 2019.....	3
Figura 2. Exportaciones de la agroindustria azucarera guatemalteca en porcentaje en el 2019 .....	4
Figura 3. Precio del azúcar en el mundo en los últimos diez años .....	4
Figura 4. Tensión de corte contra gradiente de velocidad para fluidos newtonianos y no newtonianos .....	8
Figura 5. Estructuras representativas de esqueletos lineales, cíclicos y no lineales .....	11
Figura 6. Clasificación de polímeros según sus propiedades físicas .....	12
Figura 7. Clasificación de polímeros por fuente de proveniencia y biodegradabilidad.....	13
Figura 8. Granulo de PHA esquematizado acumulado de manera intracelular .....	16
Figura 9. Representación de la ruta metabólica de síntesis y degradación de P3HB utilizando carbohidratos como fuente de carbono .....	18
Figura 10. Ruta metabólica de síntesis de PHA de cadena media por Pseudomonas.....	20
Figura 11. Métodos de cromatografía líquida de alta resolución de acuerdo con la solubilidad y masa molecular del analito.....	22
Figura 12. Diagrama de bloques de interferómetro en un espectrómetro FTIR .....	24
Figura 13. Producción máxima de polihidroxicanoatos en las combinaciones de melaza y sales analizadas para Bacillus cereus, Pseudomona putida y Bacillus subtilis.....	48
Figura 14. Rendimiento máximo de polihidroxicanoatos en las combinaciones de melaza y sales analizadas para Bacillus cereus, Pseudomona putida y Bacillus subtilis.....	49
Figura 15. Comparación de la producción de polihidroxicanoatos de las combinaciones con mayor concentración de PHA alcanzada para cada cepa.....	49
Figura 16. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con Bacillus cereus a 35°C .....	50
Figura 17. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con Bacillus cereus a 35°C .....	50

Figura 18. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> a 35°C .....	51
Figura 19. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> a 35°C .....	51
Figura 20. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> a 35°C .....	52
Figura 21. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> a 35°C .....	52
Figura 22. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> a 35°C .....	53
Figura 23. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> . a 35°C .....	53
Figura 24. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> . a 35°C .....	54
Figura 25. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Pseudomonas putida</i> a 30°C .....	55
Figura 26. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Pseudomonas putida</i> a 30°C .....	55
Figura 27. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Pseudomonas putida</i> a 30°C .....	56

Figura 28. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Pseudomonas putida</i> a 30°C .....	56
Figura 29. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Pseudomonas putida</i> a 30°C .....	57
Figura 30. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Pseudomonas putida</i> a 30°C .....	57
Figura 31. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Pseudomonas putida</i> a 30°C .....	58
Figura 32. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Pseudomonas putida</i> a 30°C .....	58
Figura 33. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Pseudomonas putida</i> a 30°C .....	59
Figura 34. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> a 35°C .....	60
Figura 35. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> a 35°C .....	60
Figura 36. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> a 35°C .....	61
Figura 37. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> a 35°C .....	61

Figura 38. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarbohidratos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> a 35°C .....	62
Figura 39. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarbohidratos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> a 35°C .....	62
Figura 40. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarbohidratos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> a 35°C .....	63
Figura 41. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarbohidratos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> a 35°C .....	63
Figura 42. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarbohidratos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> a 35°C .....	64
Figura 43. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de sacarosa en la melaza.....	123
Figura 44. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de glucosa en la melaza.....	124
Figura 45. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de fructosa en la melaza .....	124
Figura 46. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de sacarosa para las muestras de <i>Bacillus cereus</i> .....	124
Figura 47. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de glucosa para las muestras de <i>Bacillus cereus</i> .....	125
Figura 48. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de fructosa para las muestras de <i>Bacillus cereus</i> .....	125
Figura 49. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de sacarosa para las muestras de <i>Pseudomonas putida</i> .....	125

Figura 50. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de glucosa para las muestras de <i>Pseudomona putida</i> .....	126
Figura 51. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de fructosa para las muestras de <i>Pseudomona putida</i> .....	126
Figura 52. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de sacarosa para las muestras de <i>Bacillus subtilis</i> .....	126
Figura 53. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de glucosa para las muestras de <i>Bacillus subtilis</i> .....	127
Figura 54. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de fructosa para las muestras de <i>Bacillus subtilis</i> .....	127
Figura 55. Curva de calibración del potenciómetro digital usando soluciones buffer con un pH de 7 y 10.....	128
Figura 56. Curva de calibración del proveedor de copas Zahn, Gardco que relaciona el tiempo de vaciado con la viscosidad cinemática para la copa número cinco. ....	128
Figura 57. Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de <i>Bacillus cereus</i> .....	129
Figura 58. Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de <i>Pseudomona putida</i> .....	129
Figura 59. Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de <i>Bacillus subtilis</i> .....	130
Figura 60. Cromatograma del duplicado de la muestra que contiene 2% de la solución madre de sales y 2% de melaza a las 24 horas en la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> .....	130
Figura 61. Cromatograma de la muestra que contiene 3% de la solución madre de sales y 3% de melaza a las 24 horas en la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> .....	131
Figura 62. Cromatograma de la muestra que contiene 3% de la solución madre de sales y 3% de melaza a las 72 horas en la fermentación con <i>Bacillus cereus</i> .....	131
Figura 63. Cromatograma de la muestra que contiene 3% de la solución madre de sales y 2% de melaza a las 72 horas en la fermentación con <i>Pseudomona putida</i> .....	131
Figura 64. Cromatograma del duplicado de la muestra que contiene 2% de la solución madre de sales y 2% de melaza a las 24 horas en la fermentación con <i>Bacillus subtilis</i> .....	132

Figura 65. Cromatograma de la muestra que contiene 3% de la solución madre de sales y 3% de melaza a las 24 horas en la fermentación con *Bacillus subtilis* ..... 132

# RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo de graduación era evaluar tres cepas para la producción de polihidroxicanoatos a escala laboratorio utilizando melaza como fuente de azúcares para comparar su rendimiento de producción. Para esto se realizó una cuantificación de azúcares en la melaza utilizando técnicas de análisis fisicoquímico. Se determinó que las concentraciones de fructosa, glucosa y sacarosa en la melaza eran de 7.4169%, 7.0506% y 39.5479% (m/m), respectivamente, las cuales están dentro de los rangos esperados para esta sustancia.

Seguidamente, se determinó el efecto de la formulación inicial del medio fermentativo sobre el rendimiento de PHA utilizando sistemas a escala laboratorio. La cepa con mayor rendimiento de polihidroxicanoatos respecto al sustrato fue *Bacillus cereus* con un rendimiento de  $0.858 \pm 0.001\%$  (m/m), seguida por *Pseudomonas putida* con un rendimiento de  $0.551 \pm 0.004\%$  (m/m) y, por último, *Bacillus subtilis* con un rendimiento de  $0.442 \pm 0.001\%$  (m/m). La combinación con mayor rendimiento de polihidroxicanoatos tanto para *Pseudomonas putida* como para *Bacillus subtilis* fue de 3% (m/v) de melaza y de 1% (v/v) de la solución concentrada de sales, mientras que para *Bacillus cereus* fue de 2% (m/v) de melaza y de 3% (v/v) de la solución concentrada de sales.

Por último, se cuantificaron las concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo. Se encontró que cada una de las cepas alcanzó una máxima concentración de polihidroxicanoatos en diferente momento durante la fermentación. Para la mayoría de los casos, con *Bacillus Cereus*, sucedió a las 96 horas, con *Pseudomonas putida* a las 48 horas y con *Bacillus subtilis* a las 24 y 48 horas.



# I. INTRODUCCIÓN

La producción masiva de polímeros plásticos derivados del petróleo generada en la actualidad es insostenible considerando su alto tiempo de biodegradación y las limitaciones de reservas de petróleo. Sin embargo, sus propiedades físicas y mecánicas han hecho que sea uno de los materiales más utilizados en la actualidad. Esto requiere establecer formas alternativas de producción de polímeros plásticos. Este trabajo de graduación evalúa tres cepas para la producción de polihidroxicanoatos, un biopolímero biodegradable proveniente de procesos naturales fermentativos que, según el tamaño de la cadena, posee características termoplásticas o elastoméricas. Las propiedades de estos polímeros los hacen candidatos para las industrias farmacéuticas, empaques, medicina, alimentos y pinturas.

A partir de este trabajo se busca comparar la producción de polihidroxicanoatos de las cepas, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas putida* y determinar el efecto que tiene de concentración inicial de melaza y sales sobre el rendimiento de PHA utilizando sistemas fermentativos a escala laboratorio. Para esto, se realizó una determinación de azúcares y propiedades físicas de la melaza, utilizada como fuente de sustrato, y un monitoreo de las concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en el tiempo.

Las características fisicoquímicas analizadas para la melaza fueron pH, densidad, viscosidad, grados Brix, compuestos volátiles y concentración de glucosa, fructosa y sacarosa. Para la elaboración del medio fermentativo se realizó una solución concentrada de sales con siete especies químicas que fueron fuentes de nutrientes durante la fermentación. Las concentraciones evaluadas de esta solución en el medio fermentativo fueron de 1%, 2%, 3% (v/v). Asimismo, las concentraciones de melaza analizadas fueron de 2%, 3%, 4% (m/v). Las fermentaciones realizadas se realizaron a una agitación de 150 rpm a 35°C para las especies *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* y de 30°C para la especie *Pseudomonas putida* y tuvieron una duración de 96 horas con muestreos de 24 horas. Para cada muestra se determinó la concentración celular con la técnica de peso seco, la concentración de PHA con extracciones utilizando hipoclorito de sodio comercial y acetona en peso seco, la concentración de azúcares con el método de cromatografía líquida

de alta eficacia y la determinación de polihidroxicarboxilatos con la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

En la cuantificación de azúcares se encontró que la concentración de sacarosa en la melaza es de 39.5479% (m/m) con una desviación estándar de 0.0095% (m/m). El rango de sacarosa esperado para la melaza es de 30% a 40%. El valor obtenido se encuentra dentro de este rango, cercano al límite superior. En cuanto a la fructosa, se obtuvo una concentración porcentual de 7.4169% (m/m) con una desviación estándar de 0.2745% (m/m). El valor obtenido se encuentra dentro del rango esperado para la concentración de fructosa en melaza, el cual es de 5% a 12%. El porcentaje de glucosa encontrado en la melaza fue de 7.0506% (m/m) con una desviación estándar de 0.0072% (m/m), estando dentro del rango normal para esta especie en melaza, el cual es de 4% a 9%.

La combinación con mayor rendimiento de polihidroxicarboxilatos tanto para *Pseudomona putida* como para *Bacillus subtilis* fue de 3% (m/v) de melaza y de 1% (v/v) de la solución concentrada de sales, mientras que para *Bacillus cereus* fue de 2% (m/v) de melaza y de 3% (v/v) de la solución concentrada de sales. Por otro lado, la cepa con mayor rendimiento de polihidroxicarboxilatos respecto al sustrato fue *Bacillus cereus* con un rendimiento de  $0.858 \pm 0.001\%$  (m/m), seguida por *Pseudomona putida* con un rendimiento de  $0.551 \pm 0.004\%$  (m/m) y, por último, *Bacillus subtilis* con un rendimiento de  $0.442 \pm 0.001\%$ .

La mayoría de las fermentaciones con *Bacillus Cereus* tuvieron un consumo lento de sustrato en las primeras 24 horas y alcanzaron la concentración máxima de polihidroxicarboxilatos a las 96 horas de fermentación. Para las fermentaciones con *Bacillus subtilis* se observó un rápido consumo de azúcares, en las primeras 24 horas y alcanzó la máxima concentración de polihidroxicarboxilatos a las 24 y 48 horas de fermentación. Por otro lado, con las fermentaciones con *Pseudomonas putida* se alcanzó la concentración máxima a las 48 horas de fermentación para la mayoría de las formulaciones y a partir de este tiempo se genera un consumo celular del polímero por escases de sustrato en el medio.

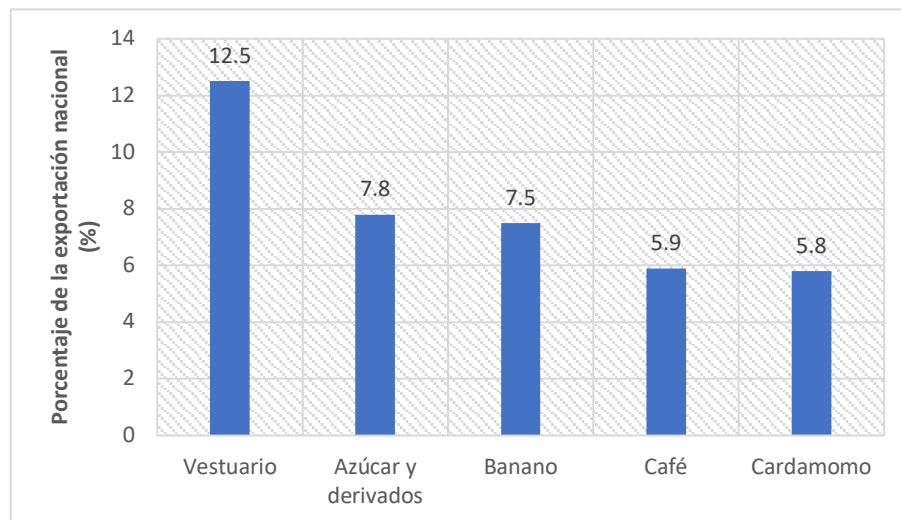
## II. MARCO TEÓRICO

### A. Industria azucarera

El origen de la caña de azúcar es el sureste de Asia. El primer registro que se posee de la caña de azúcar es en India, 1,000 años antes de Cristo. Allí, el azúcar, cobro importancia cuando se descubrió que el jugo de caña era más fácilmente transportado y almacenado utilizando cuando se convertía en cristales (ASAZGUA, 2020).

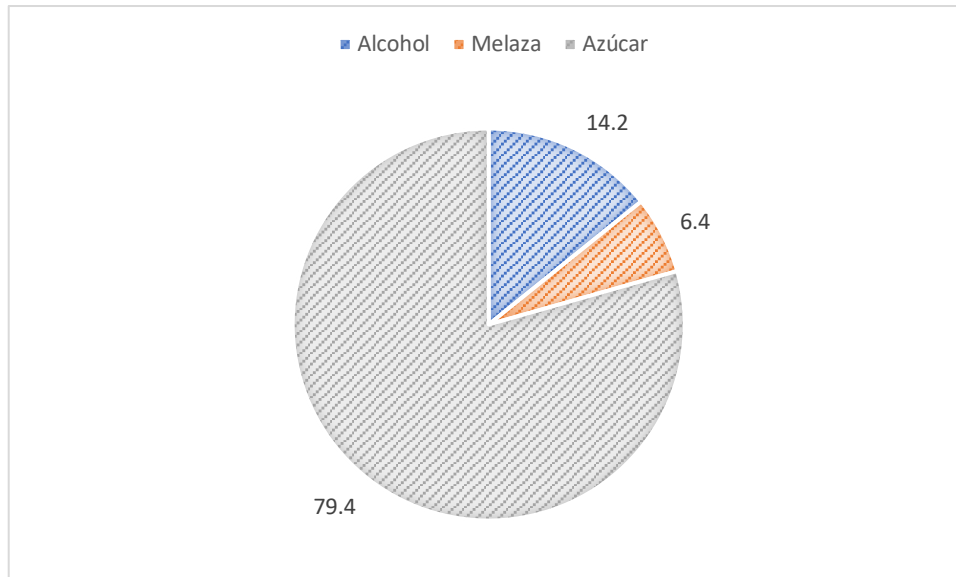
En Guatemala se cultiva caña desde el siglo XVI. Para 1587 existían varios trapiches por lo que el ayuntamiento de Santiago dictó ordenanzas al gremio de productores de azúcar. La documentación indica que el primer ingenio se generó en 1591 y hasta la actualidad la producción de azúcar continua, aumentando su productividad y tecnificando sus procesos. Actualmente, Guatemala tiene el cuarto lugar en exportación de azúcar a nivel mundial y es el tercero en cuanto a productividad en el mundo (ASAZGUA, 2020).

El azúcar es segundo producto de mayor exportación en el país y representa el 6.2% de las exportaciones del país. En la zafra de 2018 a 2019 se produjeron 2.9 millones de toneladas métricas de azúcar en Guatemala. En el 2019 se generó un ingreso en divisas de USD\$695 millones por azúcar, USD\$56.3 millones por melaza y USD\$124.7 millones por la producción de etanol, generando un total de USD\$876 millones. Al considerar estos tres productos, el porcentaje que representa el azúcar y sus derivados, en cuanto a exportaciones del país, asciende a 7.8%



*Figura 1. Productos de mayor exportación en Guatemala para el año 2019*

(ASAZGUA, 2020)



*Figura 2. Exportaciones de la agroindustria azucarera guatemalteca en porcentaje en el 2019*

(ASAZGUA, 2020)

De todo el azúcar producido en el país el 70% se exporta y el 30% es de consumo doméstico. Además, considerando la disminución el precio del azúcar en los últimos 10 años, la industria azucarera, ha buscado nuevos modelos de negocios. De la melaza que permanece en el país se produce etanol, teniendo una capacidad actual de producción de 65 millones de galones de etanol. Otra fuente de ingreso a partir de la cual la industria azucarera ha logrado aprovechar sus recursos es la producción de electricidad a partir de bagazo de caña. Esta, durante la zafra, genera el 35% de la demanda energética de Guatemala. La capacidad instalada de todos los ingenios azucareros es de 1,022 Mw, lo cual es más del doble de la capacidad de la hidroeléctrica Chixoy (ASAZGUA, 2020)



*Figura 3. Precio del azúcar en el mundo en los últimos diez años*

(Macrotrends LLC, 2020)

## B. Melaza

Melaza es el término general que se utiliza para referirse al jugo concentrado de azúcar de caña o de remolacha que se genera como residuo después de una serie de remociones de sacarosa. La mayor fuente de melaza proviene de la caña de azúcar. La cantidad y la composición de la melaza provee información de la naturaleza de la caña de azúcar o remolacha de la que fue obtenida, el procesamiento en planta, la eficiencia de la clarificación, el método de cristalización y la separación de los cristales de los licores de baja concentración de sacarosa.

### 1. pH

Considerando que las concentraciones de los iones hidronios son usualmente muy pequeñas, Soren Sorensen propuso utilizar la medida de pH que se define como el negativo del logaritmo de la concentración molar del ion hidronio. A partir de esta medida se obtiene un número positivo adimensional, dentro de una escala de 1 a 14. Las disoluciones que tienen pH menor a 7 son ácidas, las que tienen un pH mayor a 7 son básicas y las que tienen un pH igual a 7 son neutras (Chang, 2013)

$$pH = -\text{Log}_{10}[H^+]$$

*Ec. 1*

La melaza es usualmente ácida gracias a la presencia de ácidos orgánicos no aromáticos como el ácido aconítico, málico y cítrico. Sin embargo, este puede llegar incluso a ser neutro por las modificaciones que se hacen en el pH durante el proceso de clarificación en el procesamiento del azúcar. El rango de pH usual para la melaza es de 5 a 7. El contenido de sales en esta sustancia, el cual es de 2% a 8% puede contribuir a su capacidad buffer lo que estabiliza el sabor y previene la hidrólisis de sacarosa (Clarke, 1993).

### 2. Grados Brix

Los grados Brix son una medida que establece la cantidad de sólidos disueltos que se encuentran en un líquido. Cada grado Brix representa 1g de sólidos disueltos por cada 100g de disolución. La forma de cuantificación para los grados Brix es a partir de los métodos de refractometría. La refractometría es una técnica analítica a partir de la cual el

grado de interacción entre la radiación electromagnética del espectro visual y el medio por el que viaja la radiación.

Para la melaza se utilizan los grados Brix para la medición de cantidad de azúcar disuelta, sin embargo, esta medida puede verse alterada por la presencia de otras sustancias como ácidos orgánicos y etanol, así como otros sólidos disueltos. Usualmente en los ingenios guatemaltecos se obtienen mieles vírgenes con 71-75° Brix y un nivel de pureza del 82%, mientras que la melaza tiene una pureza del 40% y los sólidos disueltos mayor o igual a 80° Brix. Esto es debido a que, a pesar de que las mieles vírgenes poseen mayor contenido de azúcar que la melaza, en esta última permanecen los sólidos disueltos del jugo de caña durante los procesos de evaporación, aumentando su concentración. La USDA establece que el límite mínimo de grados Brix para las melazas grado A, B y C debe de ser de 78.5 ° Brix (USDA, 1959).

### **3. Compuestos volátiles**

La característica de volatilidad se refiere a la tendencia que tiene una sustancia a pasar a la fase gaseosa desde una fase líquida. La medición de compuestos volátiles se refiere entonces a la cuantificación de los componentes de una mezcla, homogénea o no, que se volatilizan a una temperatura establecida. El compuesto volátil mayoritario en la melaza, y en la mayoría de los jarabes y mieles, es el agua. La melaza tiene porcentaje de agua de 17 a 25%. A esto se le añade una pequeña cantidad de ácidos orgánicos que incluyen: ácido aconítico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido mesacónico, ácido succínico, ácido fumárico y ácido tartárico. La suma de todos estos genera un total porcentual de 2% a 7.5% respecto a todos los componentes de la melaza (Clarke, 1993).

### **4. Viscosidad**

Para fluidos newtonianos la velocidad de corte y la tensión de corte son proporcionales entre sí, y la constante de proporcionalidad que los relaciona es la viscosidad. La viscosidad de líquidos es mucho mayor a la viscosidad de gases y, a diferencia de estos no existe una teoría sencilla para la predicción de la viscosidad de los líquidos. Usualmente, la viscosidad aumenta con el peso molecular y cae rápidamente con el aumento en la temperatura. Este último efecto es consecuencia de que al aumentar la temperatura se genera una leve expansión del líquido que facilita el deslizamiento de las

moléculas entre sí. La viscosidad en función de la temperatura se aleja considerablemente de un comportamiento lineal por lo que usualmente se utilizan correlaciones matemáticas racionales para temperatura debajo del punto de ebullición normal, que siguen la forma (McCabe, 2007):

$$\ln \mu = A + \frac{B}{T}$$

*Ec. 2*

Por otro lado, la viscosidad cinemática relaciona la viscosidad dinámica o absoluta con la densidad del fluido. Las viscosidades cinemáticas de los líquidos varían con la temperatura en intervalos más estrechos que las viscosidades absolutas (McCabe, 2007). Para los fluidos no newtonianos no existe proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación. Este tipo de fluidos se subdivide en tres categorías. La primera son plásticos de Bingham los cuales no fluyen hasta alcanzar una tensión de corte mínima, y a partir de esta se comportan como fluidos newtonianos teniendo una relación proporcional entre la tensión de corte y el gradiente de velocidad. La segunda categoría son los fluidos pseudoplásticos, cuya curva pasa por el origen y es cóncava hacia abajo para tensiones de corte bajas y luego se vuelve casi lineal. Esto quiere decir que ha pequeñas tensiones de corte se deben generar altos cambios en esta variable para obtener un pequeño cambio en el gradiente de velocidad, pero una vez alcanzado una tensión de corte elevada los cambios que se generan en la tensión de corte generan un efecto casi proporcional en la velocidad. El último tipo de fluido no newtoniano es el dilatante, cuya curva es cóncava hacia arriba para bajar tensiones de corte y casi lineal para elevadas tensiones de corte (McCabe, 2007).

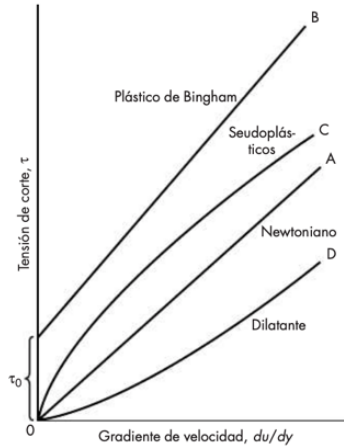


Figura 4. Tensión de corte contra gradiente de velocidad para fluidos newtonianos y no newtonianos

(McCabe, 2007)

Los fluidos pseudoplásticos y dilatantes siguen la ley de potencia o ecuación de Ostwald-de Waele para algún intervalo de las velocidades de corte. Donde  $K'$  y  $n'$  son constantes cuyos nombres son índices de consistencia de flujo e índice de comportamiento de flujo respectivamente. La variable  $n'$  es mayor a uno para fluidos dilatantes y menor a uno para fluidos pseudoplásticos (McCabe, 2007).

La melaza no es considerada como un fluido newtoniano y se ha encontrado que su comportamiento corresponde al de un fluido pseudoplástico. Además, se ha encontrado que la viscosidad de este fluido varía considerablemente, incluso en varios ordenes de magnitud, dependiendo de su composición inorgánica y de polisacáridos, así como su alta dependencia a la temperatura. A continuación, se presentan las viscosidades cinemáticas promedio para la clasificación de melaza de USDA según su grado (Clarke, 1993):

Cuadro 1. Viscosidad cinemática promedio para diferentes grados de melaza a una temperatura de 37.78 °C

Tipo	Viscosidad (St)
Melaza grado A	13
Melaza grado B	62
Melaza grado C	150

## 5. Densidad

La densidad es la cantidad de masa que tiene una sustancia por unidad de volumen. Esta característica tiene una relación inversa con la temperatura y directa con la presión, aunque esta última variable afecta muy levemente a los fluidos líquidos. En otras palabras, la densidad mide el grado de compacidad de una sustancia, describiendo cual es el distanciamiento de sus moléculas y átomos. De la misma manera que la viscosidad, la densidad puede variar significativamente según la composición de la melaza. Se ha encontrado que el rango normal de densidad de la melaza es de 1.30 g/mL a 1.46 g/mL a una temperatura de 15 °C (Clarke, 1993).

## 6. Azúcares

Se utiliza usualmente el término azúcar para designar carbohidratos con bajo peso molecular, monosacáridos y disacáridos, especialmente aquellos que pueden encontrarse en alimentos. Se utiliza el término carbohidratos ya que la mayoría de los azúcares sencillos poseen la forma  $C_n(H_2O)_m$ , lo que propone una combinación de átomos de carbono con agua. Los monosacáridos son azúcares sencillos que no se pueden hidrolizar para formar azúcares más sencillos, como lo son la glucosa y fructosa. La glucosa se clasifica como un polihidroxialdehído, que se denomina aldosa, y la fructosa como polihidroxicetona, que se denomina cetosa. Por otro lado, un disacárido es un azúcar que al hidrolizarse puede formar dos monosacáridos. El más conocido es la sacarosa que usualmente se denomina azúcar de mesa. Al hidrolizar la sacarosa se forma una molécula de glucosa y una de fructosa. Los monosacáridos como los disacáridos tienen alta solubilidad en agua y poseen las características dulces a las que se asocian los azúcares (Wade, 2017).

En la caña de azúcar, los monosacáridos obtenidos por la fotosíntesis y no utilizados para la conversión de energía se convierten en disacáridos y polisacáridos para ser almacenados. Los tallos de esta planta son ricos en sacarosa que se utiliza como almacenamiento de energía, que cuando se genera un requerimiento de energía se convierte en glucosa y fructosa para cumplir con las necesidades metabólicas de la planta (Wade, 2017).

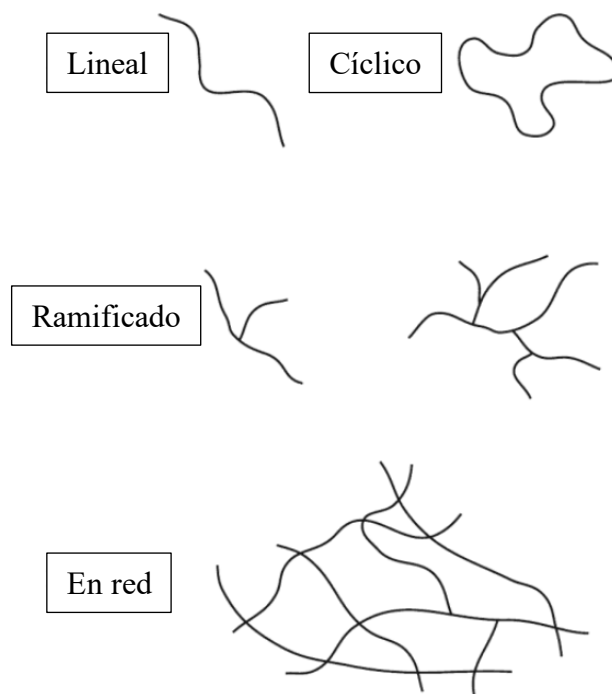
La melaza, a pesar de que se le ha removida gran cantidad de sacarosa para la generación de azúcar cristalizada, posee más sacarosa que glucosa y fructosa. A pesar de esto, al ser la miel residual del proceso azucarero, la cristalización de sacarosa de esta miel ya no es económicamente viable. La concentración de sacarosa en melaza se encuentra dentro de un rango de 30% a 40%. Por otro lado, la concentración usual de fructosa es de 5% al 12%. Por último, se encuentra la glucosa, con la concentración más baja de las tres, con un rango de concentración en melaza de 4% a 9% (Clarke, 1993).

Se consideran azúcares totales como la suma de los azúcares reductores y la sacarosa. Según la Association of American Feed Control los azúcares totales para la melaza proveniente de caña de azúcar no debería de ser menor al 46% (Clarke, 1993). Además de estos azúcares hay presencia de otras sustancias reductoras como invertidos que poseen una concentración 1 a 4%. Asimismo, hay algunos otros carbohidratos como almidón, gomas, pentosanos y trazas de hexitoles, mioinositol y D-mantiol que su totalidad conforman el 2% a 5% de la melaza (Clarke, 1993).

### C. Polímeros

Los polímeros son sustancias compuestas de moléculas de gran tamaño que se encuentran conformadas por varias unidades repetitivas de menor tamaño llamadas monómeros unidos usualmente por enlaces covalentes. Los polímeros han existido desde el inicio de la vida y aquellos como el ADN y el ARN, proteínas y polisacáridos son parte fundamental de la vida animal y vegetal. Desde el principio de los tiempos el ser humano ha utilizado polímeros derivados de la naturaleza vestimenta, decoración, refugio, herramientas, entre otros (Young, 2011).

Según su estructura, los polímeros pueden ser lineales o no. En la última clasificación se subdividen en cíclicos, ramificados o en forma de red. Los polímeros cíclicos son cadenas que no tienen un final. Los polímeros ramificados tienen múltiples extensiones o finales y puntos de unión entre cadenas lineales. Los polímeros en forma de red son moléculas tridimensionales con puntos de conjunción de cadenas ramificadas. Las últimas dos clasificaciones pueden generarse a partir de polimerización o uniendo cadenas preexistentes. Las diferencias en las cadenas otorgan diferentes propiedades al material como modificaciones en el punto de fusión (Young, 2011).

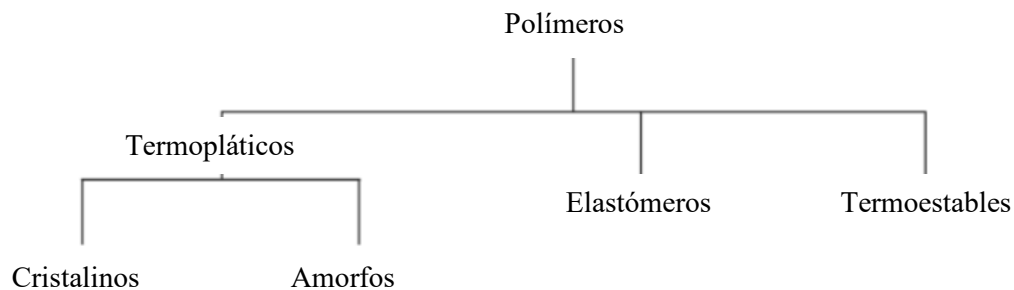


*Figura 5. Estructuras representativas de esqueletos lineales, cíclicos y no lineales (Young, 2011)*

Los polímeros también se pueden clasificar en homopolímeros y copolímeros. Los homopolímeros son polímeros conformados por una sola especie de monómero. Su estructura está constituida por  $n$  moléculas del monómero A describiéndose entonces como  $-[A]_n-$ . Sus nombres se constituyen por el prefijo poli- seguido por el nombre del monómero. Los copolímeros, por otro lado, están constituidos por más de una especie de monómeros y los distintos arreglos con los que estos se organizan en la molécula. Estos pueden tener un arreglo estadístico, al azar o alternante, por bloque o injertos (Young, 2011).

Otra de las clasificaciones más comunes para los polímeros es según sus características físicas y los dividen en tres, termoplásticos, elastómeros y termoestables. Los termoplásticos son polímeros lineales o ramificados que se derriten con la aplicación de calor. Estos pueden ser moldeados a cualquier forma por procesos de extrusión y soplado. Usualmente los termoplásticos no cristalizan fácilmente con el enfriamiento del sólido y porque requieren un ordenamiento de las moléculas que se encuentran enredadas

en su forma líquida. Aquellos termoplásticos que si cristalizan no forman estructuras perfectamente cristalinas sino estructuras semi-cristalinas con partes tanto cristalinas como amorfas. Las fases cristalinas se caracterizan por una temperatura de fusión  $T_m$ , arriba de la cual el polímero puede convertirse en artefactos por los sistemas comunes de procesamiento. Sin embargo, muchos otros termoplásticos son completamente amorfos e incapaces de cristalizar y son caracterizados por su temperatura de transición vítrea  $T_g$ , en la cual se transforman abruptamente desde un estado vítreo con alta dureza a un estado gomoso blando. Tanto la  $T_m$  como la  $T_g$  aumentan con la ramificación de la molécula y las fuerzas intermoleculares. Es importante mencionar que los polímeros amorfos no se derriten solo se reduce su viscosidad con el aumento de temperatura arriba de  $T_g$  hasta que la viscosidad sea tan baja como para realmente realizar el procesamiento del material (Young, 2011).

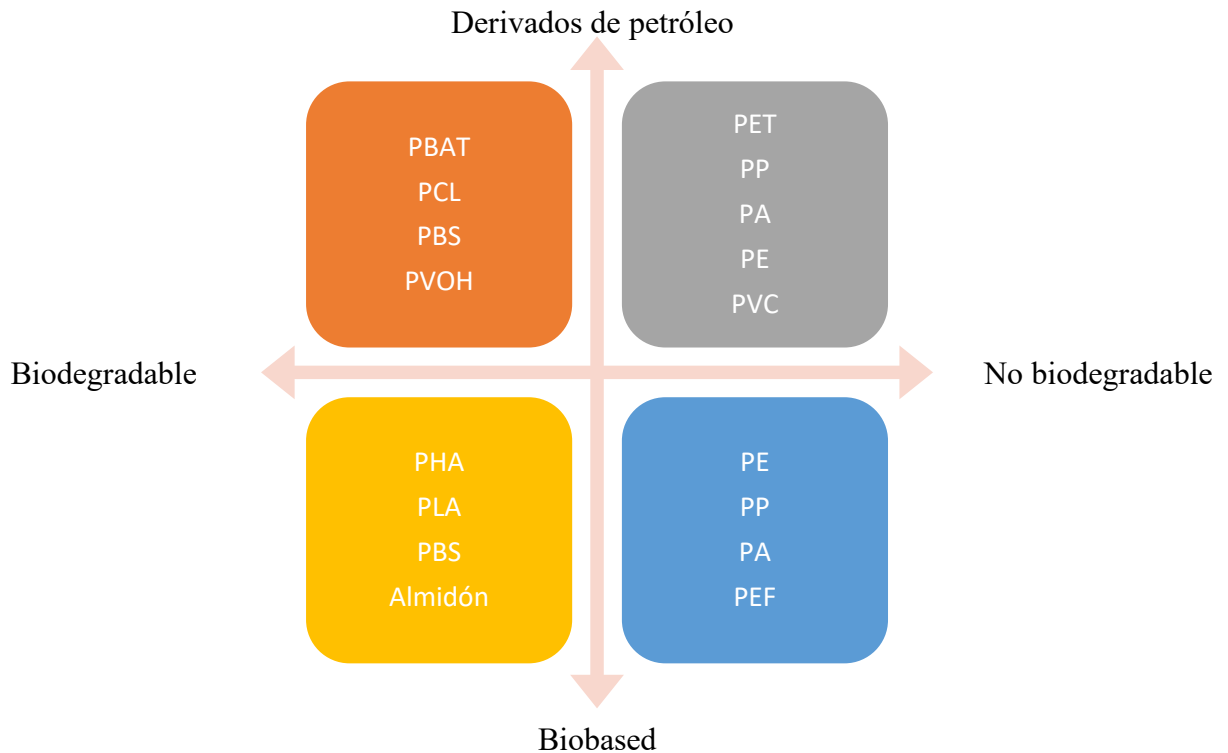


*Figura 6. Clasificación de polímeros según sus propiedades físicas*

(Young, 2011)

Los elastómeros, por otro lado, son polímeros en red gomosos que se estiran en alto grado con facilidad, de tres a diez veces su tamaño original. Y con la misma facilidad logran recuperar su forma original cuando se les libera del estrés al que habían sido sometidos. Esta característica es un reflejo de su estructura molecular en donde la red de monómeros es un reticulado con baja densidad. Por último, los polímeros termoestables son materiales rígidos con estructura en forma de red donde las cadenas están restringidas por las uniones entre sí. Como los elastómeros, no se puede modificar permanentemente su forma y en lugar de volverse líquido con el calor simplemente se degradan. Su procesamiento entonces depende moldura por compresión más que por el flujo del material (Young, 2011).

Las clasificaciones de los polímeros que más importancia tienen para este trabajo es la proveniencia del polímero y su capacidad de biodegradarse. Muchas veces estas características son confundidas entre sí, pero existen polímeros que pueden cumplir con la biodegradabilidad y no ser biobased ya que provienen de derivados de combustibles fósiles y, al contrario, pueden existir biopolímeros que por su naturaleza no son biodegradables (Young, 2011).



*Figura 7. Clasificación de polímeros por fuente de proveniencia y biodegradabilidad*

Muchas personas consideran biopolímeros como todos los polímeros menos lo que son derivados de petróleo y además no son biodegradables, la esquina superior izquierda de la Figura 7. Con cumplir con que se biodegradable o biobased cumple con ser un biopolímero. Para otro grupo de investigadores los biopolímeros son biobased (Young, 2011).

### **1. Biodegradabilidad**

Un polímero no biodegradable es un material resistente, ligero, barato y fácilmente procesable. Tiene excelentes propiedades de barrera y puede ser desechable o durable. Sin

embargo, estas mismas características hacen que no sean fácilmente degradados por los elementos del medio ambiente o por las estructuras actuales de compostaje. Los polímeros plásticos son resistentes a la degradación biológica porque los microorganismos no poseen las enzimas necesarias para degradar la mayoría de los polímeros sintéticos. Además, las características hidrofóbicas de estos polímeros inhabilitan la actividad enzimática (Vaverkova, 2012).

Existen muchas confusiones a cerca de los términos biodegradable y degradable por lo que se han generado diversos estándares, específicamente para plásticos con el fin de establecer parámetros que permitan distinciones concretas. Tanto la American Society for Testing Materials (ASTM) como International Estandar Organization (ISO) establecen reglas de biodegradabilidad de polímeros en diferentes ambientes como compostaje, digestión anaeróbica y tratamiento de aguas. Según el estándar D6400-04 de la ASTM, un polímero plástico biodegradable es “un plástico que se degrada por la acción natural de microorganismos como bacterias, hongos y algas”; mientras que un polímero plástico compostable es “un plástico que se somete a degradación por procesos biológicos durante compostaje, generando dióxido de carbono, agua, compuestos inorgánicos y biomasa, a una razón consistente con otros materiales compostables conocidos, dejando ningún rastro visual ni residuo tóxico”. Por otro lado, Guillet define un polímero biodegradable como aquel material capaz de ser transformado químicamente por acción biológica de enzimas o microorganismos para producir productos que a su vez son capaces de biodegradarse (Vaverkova, 2012).

## **2. Origen**

Al analizar la proveniencia de un polímero se puede evaluar si el monómero proviene de un derivado de petróleo o de una fuente natural, así como si la polimerización fue resultado de un procesamiento sintético o un proceso de la naturaleza. En el primer caso se puede analizar la polimerización de polietileno a partir de etileno, en un primer caso obtenido de la industria petrolera y en segundo caso de una biorrefinería, dando como resultado la misma molécula con las mismas propiedades fisicoquímicas. Es importante denotar que propiedades del material no dependen del origen sino de la estructura molecular de la cadena (Ciardelli, 2019).

Según el origen se pueden identificar múltiples combinaciones:

- Biopolímeros producidos de forma natural como celulosa, almidón, proteínas y polihidroxicanoatos.
  - Polímeros o biomonomeros derivados de productos naturales como el ácido poliláctico y el nylon 11.
  - Polímeros de monómeros no naturales obtenidos de fuentes renovables como polietileno obtenido de la polimerización de etileno obtenido de la deshidratación de alcohol fermentado.
  - Polímeros obtenidos de la polimerización de monómeros obtenidos de productos derivados de petróleo.
- (Ciardelli, 2019)

## D. Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos son biopolímeros biodegradables de ácidos hidroxicanoicos que almacenan de forma intracelular ciertas bacterias, microalgas y arqueas, como material de reserva energético, con el fin de utilizarlo posteriormente como fuente de carbono. Los monómeros de ácidos hidroxicanoicos se polimerizan a través de la condensación del carboxilo de una molécula con el hidroxilo de una segunda molécula de monómero para formar un éster, por medio de la acción de enzimas intracelulares. A partir de este proceso, los polímeros formados se acumulan en forma de gránulos amorfos en el citoplasma celular, rodeado por la monocapa de fosfolípidos donde se encuentra la polimerasa y despolimerasa. Se ha encontrado que la cantidad de gránulos de PHA por célula se define en las primeras etapas de acumulación y la producción de este polímero se detiene al alcanzar el 80% del peso seco de la célula. Lo que indica que a pesar del sustrato y la actividad de la enzima polimerasa, existen restricciones físicas de la cantidad de PHA que puede almacenar una célula (González, *et al.* 2013).

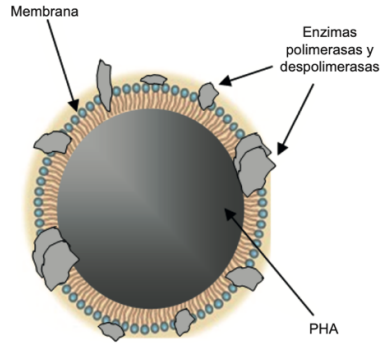


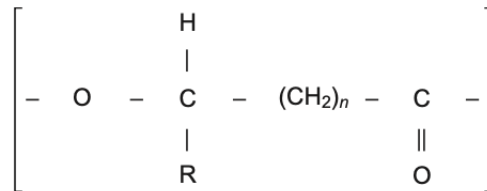
Figura 8. Granulo de PHA esquematizado acumulado de manera intracelular

(González, *et al.* 2013)

Usualmente la producción de PHA se genera como respuesta ante la limitación de nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio u oxígeno en presencia de un exceso de una fuente de carbono. Sin embargo, existen de igual forma bacterias que producen este polímero de forma proporcional a su crecimiento (González, *et al.* 2013).

### 1. Estructura

La estructura general de la cadena polimérica de los polihidroxicanoatos sigue la siguiente forma:



Donde n son las veces que se repite CH<sub>2</sub> en el monómero y la cadena R puede contener los siguientes grupos.

Cuadro 2. Ejemplos de la nomenclatura y simbología según la longitud del monómero y los grupos que lo conforman

n	R	Nombre del polímero	Símbolo
1	Hidrógeno	Poli (3-hidroxiopropionato)	PHP
1	Metil	Poli (3-hidroxi butirato)	P3HB
2	Hidrógeno	Poli (4-hidroxi butirato)	P4HB
3	Hidrógeno	Poli (5-hidroxi valerato)	P5HV

(González, *et al.* 2013)

El PHA se puede clasificar por la longitud de sus monómeros. El PHA de cadena corta está constituido por monómeros que poseen de 3 a 5 átomos de carbono. El PHA de cadena media tiene monómeros compuestos por 6 a 14 átomos de carbono. Por último, el PHA híbrido posee monómeros tanto de cadena corta como de cadena media. El tipo de PHA que se obtiene depende principalmente del microorganismo utilizado para su producción, y muy pocos de ellos logran generar PHA híbrido (González, *et al.* 2013). El PHA producido también puede ser tanto homopolímero como copolímero, y esto depende principalmente del microorganismo y la fuente de carbono que se ha utilizado durante la fermentación. Se conoce que existen más de 100 unidades monoméricas que pueden constituir el PHA. Las propiedades físicas de este material de gran manera de su composición monomérica (González, *et al.* 2013).

## **2. Propiedades físicas**

El PHA es un poliéster de naturaleza lipídica, insoluble en agua. La mayoría de los polihidroxicanoatos son semicristalinos con temperaturas tanto de fusión como de transición vítrea. Ciertos tipos de PHA tienen características muy similares a polímeros plásticos sintéticos muy utilizados. Por ejemplo, el P3HB tiene una estructura similar al polipropileno, ya que es una hélice levógira compacta con un centro de quiralidad en configuración R que lo hace ópticamente activo (González, *et al.* 2013).

Usualmente el PHA de cadena corta es un termoplástico con temperaturas de fusión altas, de alrededor de 180 °C y temperaturas de transición de -5 °C y 20 °C. Este, además tiene un grado de cristalinidad de 60% a 80%. La presencia de 3HV en PHA de cadena corta disminuye la cristalinidad a 30% a 40% y disminuye tanto la  $T_m$  como la  $T_g$  de forma considerable. Por esto, se consideran los copolímeros de cadena corta como materiales más versátiles que el homopolímero.

Por otro lado, el PHA de cadena media es amorfo y se clasifica como un elastómero. Su temperatura de transición es de -62 °C y -26 °C, mientras que su temperatura de fusión es de 42 °C a 58 °C (González, *et al.* 2013).

El peso molecular del PHA es dependiente tanto de las condiciones de producción, como de los procesos de recuperación. Las variables involucradas en el peso molecular del PHA en la fermentación no se conocen a cabalidad, pero se cree que dependen del microorganismo y el sustrato. Por otro lado, en el proceso de recuperación del polímero,

se ha encontrado que las extracciones con solventes orgánicos generan polímeros con mayor peso molecular que los extraídos con hipoclorito y otros solventes inorgánicos. Para el P3HB el peso molecular promedio se encuentra dentro de un rango de  $1 \times 10^4$  a  $3 \times 10^6$  con una polidispersidad de 1.8 a 2.7 (González, *et al.* 2013).

### 3. Rutas de Biosíntesis

La ruta de biosíntesis que mejor se conoce es la del P3HB por *Ralstonia eutropha* utilizando carbohidratos como sustratos. El proceso metabólico inicia con acetil-CoA con tres reacciones en secuencia utilizando las enzimas catalizadoras 3-cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa y poli(3-hidroxibutirato)sintetasa. Se ha encontrado que la segunda enzima mencionada controla la biosíntesis del PHA. Por otro lado, la sintetasa se encuentra asociada a los gránulos de PHA y se divide en cuatro tipos. Los tipos I y II son solo una subunidad, el primero usa tioésteres-CoA de (R)-3-hidroxiácidos grasos de 3 a 5 carbonos y el segundo de 6 a 14. Los tipos III y IV tienen dos subunidades, el III PhaC y PhaE, mientras que el IV PhaC y PhaR. La polimerasa tipo II usualmente polimeriza hidroxiácidos de cadena corta (González, *et al.* 2013).

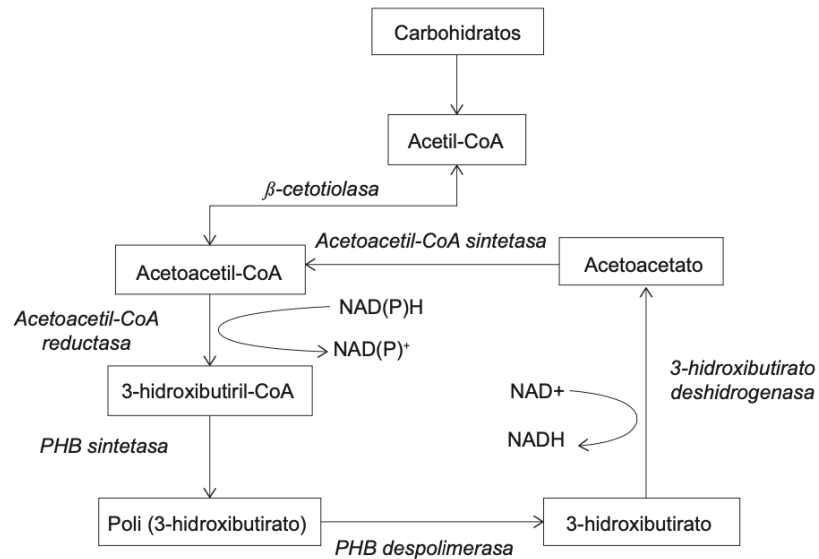


Figura 9. Representación de la ruta metabólica de síntesis y degradación de P3HB utilizando carbohidratos como fuente de carbono

(González, *et al.* 2013)

En la producción de P3HB por *A. Beijerinckii* a partir de una fermentación anaeróbica con glucosa se ha encontrado que acetil-CoA puede oxidarse por medio del ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT) o puede servir de precursor para la producción de P3HB. La ruta depende de las condiciones ambientales, específicamente la ausencia de oxígeno cuando la relación NADH/NAD aumenta. Las enzimas citrato sintetasa e isocitrato deshidrogenasa se inhiben con el NADH haciendo que el acetil-CoA no entre en el CAT y sea convertido en acetoacetil-CoA por 3-cetotilasa. A partir de esto se puede observar que el PHA no solo sirve como reserva de carbono para el microorganismo, sino también es un sumidero de poder reductor que funciona como un regulador redox dentro de la célula. Cuando se limita otro nutriente se deja de sintetizar proteína y ocurre un proceso endergónico simultáneo a la generación de ATP que da lugar al incremento de la concentración de NAD(P)H (González, *et al.* 2013).

Los microorganismos que generan P3HB, usualmente no generan PHA de cadena media. Esto se puede lograr al usar microorganismos recombinantes con el fin de producir polímeros y copolímeros con cadenas cortas, medianas e híbridas (González, *et al.* 2013).

La ruta metabólica para PHA de cadena media más estudiada es a partir de *Pseudomonas*. Para esta cepa, los genes en el operón phaC1zC2D codifican las polimerasas PhaC1 y PhaC2, la despolimerasa PAZ y la proteína PhaD. Las polimerasas se encargan de catalizar la condensación de los monómeros de 6 a 14 carbonos. A partir de la  $\beta$ -oxidación se obtiene la mayoría de los intermediarios (González, *et al.* 2013).

La presencia de 3-hidroxiacil-CoA tioésteres, lo que quiere decir una alta concentración de sustrato de la PHA sintetasa, es un parámetro determinante en la masa molecular y la composición del polímero, además de expresión de esta proteína activa (González, *et al.* 2013).

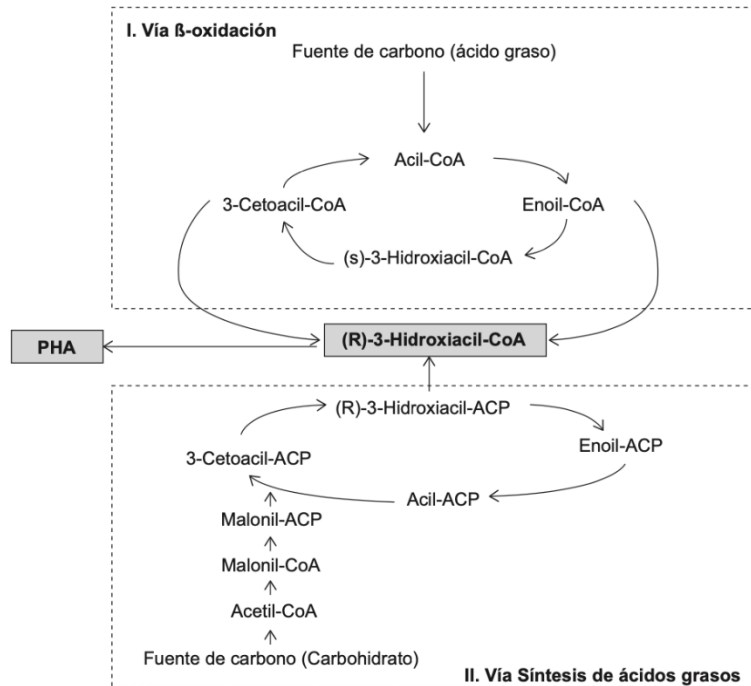


Figura 10. Ruta metabólica de síntesis de PHA de cadena media por *Pseudomonas* (González, *et al.* 2013)

#### 4. Aplicaciones

Las características físicas y mecánicas de muchos polihidroxicanoatos los hacen candidatos para las industrias farmacéuticas, empaques, medicina, alimentos y pinturas. El P3HB se puede utilizar en técnicas de moldeo mientras que P(3HBco3HV) se puede utilizar para empaques, productos biomédicos o higiénicos, como contenedores de alimentos, cosméticos, instrumentos de alimentación desechables y pañales. Además, se pueden usar como látex acuoso para laminación de materiales aprovechando su resistencia al agua y su baja difusividad de oxígeno (González, *et al.* 2013).

En la agricultura, se puede utilizar PHA de cadena corta en macetas biodegradables, tubos de irrigación y matrices de liberación de pesticidas y herbicidas. Teniendo la ventaja de que no se requiere una alta purificación posterior a la extracción (González, *et al.* 2013). En las aplicaciones biomédicas, actualmente se utiliza el PHA como material de sutura, mecanismo de liberación de medicamentos y elementos percardiacos por su bicompatibilidad con el tejido humano y su lenta absorción. También se puede utilizar para la producción de jeringas y lubricantes de guates de cirugía. Este es el mercado más

prometedor para este material y se ha estimado, que principalmente para estas aplicaciones el valor agregado es elevado generando una alta factibilidad técnica y económica (González, *et al.* 2013).

El PHA de cadena media insaturado con sulfuros y peróxidos también se puede usar para la fabricación de hule biodegradable para sustituir el uso de hule natural y sintético como estireno-butadieno, cloropeno y poliuretano. Este tipo de cadena se ha empezado a utilizar para el desarrollo de pinturas y recubrimientos amigables con el medio ambiente, principalmente en países donde el uso de solventes orgánicos empieza a ser restringido a nivel gubernamental (González, *et al.* 2013).

Gracias a las características de biodegradabilidad, resistencia al agua y al oxígeno las perspectivas del PHA son muy prometedoras y conforme se aumente la eficiencia de su productividad y se reduzcan los costos del proceso su aplicación será cada vez más común.

## E. Técnicas analíticas

### 1. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por sus siglas en inglés es la cromatografía por elución con mayor versatilidad y la más utilizada. A partir de esta técnica se logra la separación y determinación de una gran cantidad de especies orgánicas, inorgánicas y biológicas. Este tipo de cromatografía se combina una fase móvil líquida con una fase estacionaria finamente dividida. La fase móvil consiste en un disolvente líquido que contiene la muestra como una solución de solutos. Debe generarse una presurización del líquido con el objetivo de encontrar velocidades de flujo que sean satisfactorias ya que las columnas empacadas poseen partículas de diámetros desde 3 a 10  $\mu\text{m}$  (Skoog, 2015).

Las especies de la muestra analizar tienen diferentes interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria diferenciando el tiempo de retención en la columna para cada sustancia y separándolas entre sí. Existen diferentes tipos de cromatografía de alta resolución clasificados por su mecanismo de separación o tipo de fase estacionaria incluyendo cromatografía líquido-líquido, cromatografía de adsorción, cromatografía iónica, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad y

cromatografía quiral. La selección de la técnica a utilizar depende del analito analizado de acuerdo con la siguiente figura (Skoog, 2015).

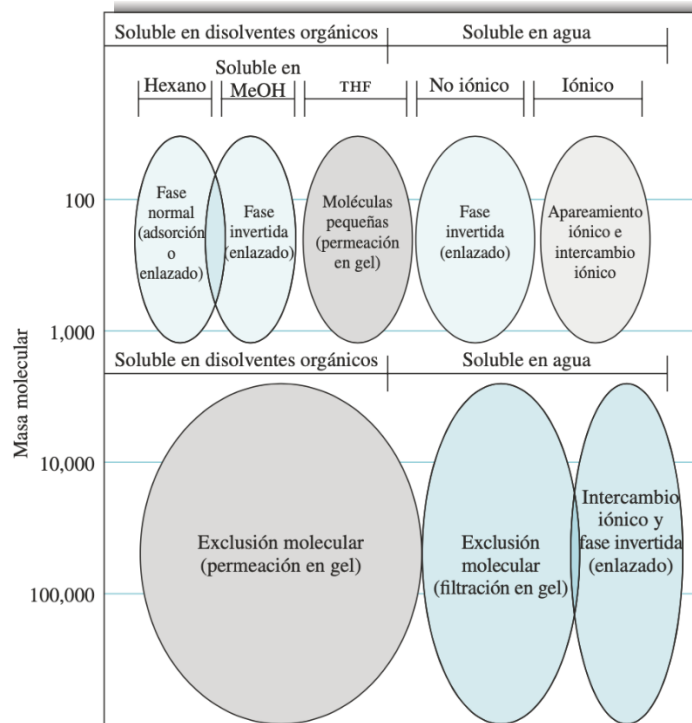


Figura 11. Métodos de cromatografía líquida de alta resolución de acuerdo con la solubilidad y masa molecular del analito

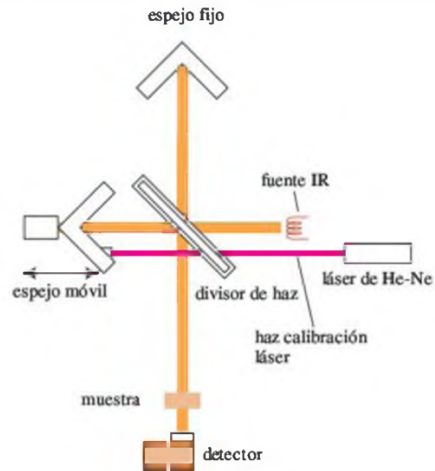
(Skoog, 2015)

La fase móvil se mantiene en un reservorio y poseen un sistema posterior que elimina los gases disueltos y polvo ya que estos pueden generar velocidades de flujo no reproducibles y ensanchamiento de banda. El líquido es impulsado por un sistema de bombeo que usualmente genera una presión de más de 6000 psi sin impulsos para un caudal de 0.1 a 10 mL/min. Posteriormente se inyecta la muestra en un sistema de inyección que agrega de 1 a 100µL a la fase móvil. La fase móvil y la muestra entran a la columna que usualmente tiene una longitud de 5 a 25 cm y diámetros de 3 a 5 µm. Por último, se encuentra un detector que recibe los analitos conforme estos van saliendo de la columna de acuerdo con su tiempo de retención y mide la concentración de estos en la muestra original según diferentes propiedades. Existen detectores de absorbancia, fluorescencia, electroquímicos, de índice de refracción, conductividad, espectrometría de masas, dispersión de luz, entre otros (Skoog, 2015).

## **2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier**

Un espectrómetro infrarrojo cuantifica las frecuencias de luz infrarroja absorbidas por un analito. El espectrómetro FTIR es uno de los espectrómetros más comunes y poseen alta sensibilidad, resolución y velocidad de obtención de datos. Estos instrumentos no poseen elementos dispersantes, además se detectan todas las longitudes de onda simultáneamente a través de un interferómetro de Michelson. La luz infrarroja se mueve desde la fuente luminosa hasta un separador de haces, generalmente de KBr, colocado en a  $45^\circ$ . Una parte del haz de luz atraviesa el separador de haces y otra parte es reflejada en un ángulo de  $90^\circ$ . La última parte incide en un espejo estacionario, mientras la primera incide en un espejo que se encuentra moviéndose a una velocidad constante. Ambas partes regresan desde los espejos hasta juntarse en el separador de haces. La diferencia en las distancias viajadas genera un patrón de interferencia llamado interferograma que posee todas las frecuencias y atraviesa el compartimiento de la muestra hacia el detector. Posteriormente se deben separar las longitudes de onda por lo que se requiere modular la señal de la fuente y pasarla por medio de la muestra de manera que se pueda registrar un interferograma. Este último es decodificado utilizando una transformación de Fourier (Wade, 2017).

La sensibilidad de esta técnica es consecuencia de la medición simultánea de todas las frecuencias. Esta técnica, además, requiere menos energía de la fuente y tiempo de escaneo, siendo este de 1 a 2 segundos. La resolución y exactitud mejora respecto al IR gracias al uso de un haz láser que controla la velocidad del espejo móvil y mide el tiempo de recolección de datos, manteniendo el instrumento calibrado de manera exacta (Wade, 2017).



*Figura 12. Diagrama de bloques de interferómetro en un espectrómetro FTIR*

(Wade, 2017)

### 3. Cuantificación de biomasa

La densidad celular de un medio puede ser cuantificada de dos formas, peso seco o húmedo de células por cantidad de solución en volumen o masa, o como número de células viables o muertas por volumen o masa de muestra. La biomasa de una muestra puede ser separadas del caldo de fermentación y pesada mientras se encuentra húmedo o, también, someterla a un proceso de secado. El peso seco usualmente da resultados más consistentes que con peso húmedo. Alternativamente, se pueden contar el número de células por la dilución sucesiva del caldo y la inoculación en una caja Petri, a través del uso de un microscopio y una cámara de conteo o por medio de un contador automático como un contador Coulter. El método de inoculación determina únicamente las células viables, mientras que el contador automático detecta el número total de células (Sum, 2009).

El método más utilizado es la cuantificación celular a través de la densidad óptica. La absorbancia de la muestra es medida con un espectrofotómetro y correlacionada con el peso seco o con células viables por volumen de muestra a partir del uso de una regresión lineal que relacione ambos métodos (Sum, 2009).

La concentración de biomasa es una de las mediciones más críticas en estudios de fermentaciones y es usualmente una de las mediciones más difíciles y falibles. Un ejemplo

de esto es como los métodos de peso seco y conteo automático fallan cuando hay material insoluble en el caldo fermentativo, lo cual es común. De forma similar la densidad óptica posee solo posee funcionalidad si el caldo no es transparente. Además, todas estas técnicas pueden cuantificar no distinguen células viables de células no viables. Por otro lado, el conteo en cajas Petri requiere preparaciones elaboradas, requiriendo 24 a 48 horas para incubar y contar las células. Además, las cajas Petri y el agar aumentan el costo de esta técnica significativamente. Consecuentemente el conteo por medio de cajas Petri se usa principalmente para comprobar otras técnicas como densidad óptica (Sum, 2009).



### III. ANTECEDENTES

#### A. Sustratos

Se han utilizado diversas fuentes de carbono como sustratos para la producción de PHA; desde ácidos, monosacáridos y alcoholes hasta aceites vegetales y residuos alimenticios. A pesar de esto, en la actualidad, los esfuerzos se han concentrado en la investigación del uso de materiales residuales con el fin de disminuir los costos de producción de PHA (Choi y Lee, 1999).

Entre los materiales residuales investigados se encuentra bagazo de tequila con el que se obtuvo un máximo de biomasa producida de 88.60  $\mu\text{g/mL}$  en comparación con 254.93  $\mu\text{g/mL}$  obtenido con glucosa bajo el mismo método (Alva y Riley, 2008). Otro material residual investigado ha sido el aceite vegetal comprando los rendimientos de glucosa, aceite de maíz usado y aceite de maíz sin usar. En esta investigación se encontraron porcentajes de PHA de 5.02%, 23.52% y 37.34, respectivamente al utilizar *Pseudomonas* como cepa (Song, Jeon, Choi, Woojun, 2008). Asimismo, se ha investigado el uso de residuos alimenticios obteniéndose porcentajes de rendimiento de hasta 38% (Venkateswar, Reddy, Motakatla y Venkata, 2011). Otro material investigado que continúa una cadena de sinergia entre procesos verdes, es el glicerol residual del proceso de producción de biodiesel. En esta investigación se comparó el rendimiento, la composición y las propiedades físicas del PHA producido a partir de glicerol residual y glicerol puro. Se encontró que la productividad y la composición química de ambos fue similar (Hermann-Krauss, Koller, Muhr, Fasl, Stelzer y Braunegg, 2013).

Uno de los sustratos más exhaustivamente investigado ha sido la melaza debido a su amplia disponibilidad en la industria azucarera y su alto rendimiento en la producción de PHA. Se han logrado producciones de PHA de hasta 62.21% de acumulación de PHA en las células, utilizando *B. Subtilis* como cepa y fortaleciendo con etanol (Gomaa, 2014).

Se han realizado diversos estudios que comparan distintos sustratos bajo las mismas metodologías y utilizando las mismas cepas. Chauhdry *et al* se encargaron de comparar los rendimientos de aceite de maíz, melaza, jarabe, pasta fermentada. El mayor contenido

de PHA intracelular se obtuvo a partir del aceite de maíz con un 30% seguido por melaza con un 20% (Chaudhry, Jamil y Ali, 2011) En contraste con esta investigación, Santhanam comparó la producción de PHA utilizando glucosa, sacarosa, fructosa, lactosa y n-octano se encontró que la mayor cantidad de PHA se generaba al usar glucosa como sustrato con un rendimiento de 4.2 g/L (Santhanam, y Sreenivasan, 2010).

## B. Cepas

Desde los inicios en la investigación de producción de PHA hasta la actualidad se han utilizado una gran cantidad de cepas diferentes. Se ha considerado el uso de bacterias, arqueas y cultivos mixtos. Entre estas cepas, las bacterias han sido el grupo más estudiado por lo que se posee un amplio record de su rendimiento con diversos sustratos. Estas pueden clasificarse en dos categorías de acuerdo con las condiciones de cultivo.

La primera categoría de bacterias sintetiza PHA al limitar la cantidad presente de nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio u oxígeno y bajo un exceso de carbono en el medio. La segunda categoría no necesita que se limite un nutriente ya que en su fase de crecimiento generan grandes cantidades de PHA. Santhanam se encargó de comparar tres de estas bacterias pertenecientes a diferentes categorías: *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus* (pertenecientes a la segunda categoría) y *Pseudomonas oleovorans* (perteneciente a la primera categoría) en un medio con nitrógeno en limitación y exceso de glucosa. Se encontró que *Alcaligenes eutrophus* tuvo la mayor producción de PHA con 3.72 g/L, seguido por *Alcaligenes latus* y por último *Pseudomonas oleovorans*. (Santhanam, y Sreenivasan, 2010).

En cuanto a la síntesis de PHA a partir de arqueas, a pesar de no ser tan populares como las bacterias, se han utilizado en diversas investigaciones. En la investigación a partir de glicerol residual del proceso de biodiesel se utilizó *Haloferax mediterranei* debido a su robustez y estabilidad. Se encontró que su uso durante la fermentación disminuye los costos de producción debido a que tiene un menor requerimiento energético gracias a que no es necesaria su esterilización y además es capaz de acumular PHBHV4HB terpoliésteres con los precursores 4HB adecuados (Hermann-Krauss *et al*, 2013).

Con respecto a la obtención de la cepa, en muchas investigaciones se utilizan microorganismos previamente identificados con el fin de aprovechar sus características

conocidas para la investigación de un tipo de sustrato o método. Un ejemplo de esto es la investigación para producción de PHA a partir de bagazo de tequila, en la que se decidió utilizar como cepa *Saccharophagus degradans* principalmente por su falta de patogénesis, la participación simultánea de complejos multienzimáticos especializados, que permiten despolimerizar y metabolizar una gran variedad de complejos monosacáridos insoluble, y la identificación genómica de tres enzimas clave para la síntesis de PHA. *S. degradans* ha sido propuesta como la especie identificada más versátil para la degradación de carbohidratos (Alva y Riley, 2008). Por otro lado, una de las prácticas más comunes en la obtención de microorganismos fermentativos es la toma de muestras áreas industriales para disminuir los costos y encontrar nuevos microorganismos productores de PHA, en donde comúnmente se usa Sudán Negro B. Un ejemplo de esto es la investigación realizada por Goman donde se recolectaron muestras de Helwan, Kalubia y tras una incubación de siete días se seleccionaron las cepas con mayor contenido de PHA. Al evaluar las cepas para la determinación de su identidad, con el método de secuencia de 16Sr RNA se identificó el *Bacillus subtilis* cepa AJ-3 y *Escherichia coli* K-12 (Gomaa, 2014). También es común utilizar barros activados debido a su bajo precio, usualmente de agua residual creando sinergia con la industria de tratamiento de aguas. En los procesos EBPR los microorganismos en los barros activados consumen fosfatos como fuente de energía y el carbón consumido es almacenado como PHA en medios anaeróbicos (Chuaa, Takabatakeb, Satoha, y Minoa, 2003).

Para el aumento de la eficiencia en la producción de PHA uno de los métodos que se han empezado a utilizar en la actualidad es la modificación genética de las cepas. Entre estas investigaciones destaca el desarrollo de una cianobacteria complementada con un gen de *recA* proveniente *Escherichia coli* para poder trabajar en un medio libre de antibióticos. Utilizando esta cepa se obtuvo un porcentaje de peso seco de 52% de PHA (Akiyama, Okuhata, Onizuka, Kanai, Hirano, Tanaka, Sasaki, Miyasaka, 2011).

### C. Preparación del cultivo

Con el fin de hacer el proceso económicamente rentable constantemente se busca encontrar la forma de cultivo que genere una mayor cantidad de PHA. Es por esto por lo que existe una diversidad de investigaciones que detallan el medio que utilizaron y evalúan

una variable para encontrar la forma óptima de este según las condiciones. Este es el caso del trabajo de Santhanam cuya preparación del medio consistió en inocular los cultivos en un medio rico en nitrógeno por 24 h. Luego se re-inocularon los microorganismos en un medio libre de nitrógeno con la fuente de carbono a 30 °C y luego de 48 h se centrifugaron a 5000rpm por 10 minutos. El inóculo fue agregado en diferentes proporciones, 1%, 2% y 3% v/v encontrándose la mayor producción en la proporción de 2% (Santhanam, y Sreenivasan, 2010).

Para la preparación de cultivo de melaza los procedimientos suelen parecerse a excepción de los nutrientes agregados que dependen de la cepa utilizada. En una investigación que utiliza *Ralstonia eutropha* el inóculo fue colocado en 300 mL de un caldo de soya tréptico a 30 °C y centrifugado a 150rpm. Debido a que utiliza vinaza entre sus sustratos, esta se centrifugó a 8000 rpm por 7 minutos para eliminar material particulado. Ya que también utiliza melaza y esta se encontraba muy concentrada con porcentajes m/m de 60-63% y 3-5% de sacarosa y azúcares reductores respectivamente, se necesitó diluir en el medio. Además, se agregaron las siguientes sales por cada litro de solución: Glucosa 20 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6,7 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2 g; citrato de hierro y amonio 60 mg; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mg; solución de elementos trazadores 1 mL. Solución de elementos trazadores (por litro): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,3 g; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,2 g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1 g; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 30 mg; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 30 mg; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 20 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 10 mg (Acosta, Alcaraz y Cardona, 2018). La dilución de melaza es una práctica muy usual debido a las altas concentraciones que contiene como material proveniente de la industria azucarera. En otra investigación la concentración de azúcares era de 54% m/m, principalmente de sacarosa y fructosa. La dilución generada fue de 1:3 y se agregó 0.5M de NaOH para controlar el pH. Para evitar una fermentación previa de la melaza se agregó 10 g de azúcar por cada litro y los nutrientes agregados en el medio fueron NH<sub>4</sub>Cl y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> /Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 173–307 mg/l y 59mg/l, respectivamente (Albuquerque, Eiroa, Torres, Nunes y Reis, 2007).

Otra investigación con melaza se dedicó a investigar múltiples variables en el medio. La primera fue la proporción de melaza trabajándose 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 10 %, encontrándose que la concentración de melaza con mayor producción de PHA fue de 3%. También se evaluó la concentración óptima de nitrógeno con cloruro de amonio en

concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 4g/l, encontrándose que 1.5 g/l generó la mayor productividad en la producción de PHA. En cuanto a al fósforo se evaluó el efecto de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en razones de 12.0:2.0, 9.0:1.5, 6.0:1.0, 3.0:0.5, 1.0:0.25 g/l encontrándose el mayor rendimiento se dio a una concentración de fósforo de 7 g/l. Por último, de evaluó la concentración de ácido acético analizando las concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5%, en donde la concentración de 1% de ácido acético generó el mayor porcentaje de rendimiento. Todo esto se trabajó utilizando *Bacillus flexus* Azu-A2 a una temperatura de incubación de 37 °C a 150 rpm y 36 h (El-Sayed, Abdel-Rahman, Salah, Esmael, 2017).

## D. Fermentación

Otro tema de investigación debido al impacto directo que tiene con el rendimiento en la producción de PHA son las condiciones de fermentación. Acosta utilizó un reactor de 5L con una agitación controlada de 200rpm a una temperatura de 30 °C y un flujo de aire de 5 L/min y un pH de 7 controlado con HCl y NaOH (Acosta *et al*, 2018). Similarmente Hermann-Krauss utilizó el mismo pH de 7 pero a una temperatura de 37 °C y una tensión de oxígeno de 20% de aire en saturación. También se mantuvo una concentración constante de glicerol de 15g/L (Hermann-Krauss *et al*, 2013). En otra investigación que utilizaba restos de comida utilizando consorcios microbianos de barros activados se compararon medios aeróbicos y anóxicos, encontrándose mayores rendimientos de PHA con las fermentaciones anóxicas.

Para fermentación de melaza se también se ha utilizado lodos activados para procesos continuos. Duarte el periodo de climatización la alimentación de melaza fue de 10g/L, 21mmol/L y 2mmol/L de nitrógeno y fósforo respectivamente. Una vez iniciada la acidificación se aumentó la alimentación de melaza a 410g/L manteniendo una concentración de 10 g de azúcar por cada litro. Se controló una temperatura de 30 °C y una agitación de 400 rpm. Se evaluó el pH en 7, 6 y 5 encontrándose que a un pH de 5 se obtuvo el mayor rendimiento (Albuquerque *et al*, 2007). En una investigación diferente con melaza se evaluaron diferentes pH (5-9) y temperaturas (20, 25, 30, 35, 40°C) utilizando *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. En ella se obtuvo una máxima producción con un pH de 7 y

una temperatura de 35 °C (Gomaa, 2014). Resultados similares se encontraron al trabajar melaza con *Enterobacter*, determinándose un pH y una temperatura óptimos de 7 y 35 °C (Naheed y Jamil, 2014).

En otra investigación con melaza también se evaluaron diferentes pH 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 y 9 a 37 °C y 150 rpm por 36 h, utilizando AZU-A2. Se encontró un mayor porcentaje de recuperación a un pH de 7.5 seguido por un pH de 8. También se evaluó en esta investigación el efecto de la agitación en la producción de PHA. Las velocidades analizadas fueron 0 (estático), 50, 150, 200 y 250 rpm. Se encontró una relación directamente proporcional entre la velocidad de agitación y la producción de PHA, siendo las condiciones estáticas las de menor producción, sin embargo, fue en 200 rpm donde se obtuvo la mayor producción de PHA en un periodo de 24 h (El-Sayed *et al*, 2017).

Para la fermentación en agua residual, los lodos obtenidos de la fase anaeróbica se incuban con una fuente de carbono, que usualmente es acetato. En una investigación se realizó esta incubación por 24 h en un proceso aeróbico por burbujeo. Se observó una tendencia en el aumento de pH debido a la descarboxilación y el uso de acetato, por lo que se agregó ácido sulfúrico a un pH de 8. Sin embargo, también se evaluó el efecto del pH en los resultados variándolo en un intervalo de 6-9, obteniéndose que al aumentar el pH aumentaba también la producción de PHA, teniendo el mayor rendimiento a un pH de 9 (Chua *et al*, 2003).

## E. Extracción

Existen diferentes métodos de extracción de PHA. La mayoría de ellos utilizan cloroformo como agente extractor. Un ejemplo clásico de este método es el especificado por Song, que realizó la extracción secando la biomasa al vacío con un congelador seco. Después se extrajo con cloroformo por 9 h para generar una disolución intracelular de PHA. Después de generar un filtrado se precipita rápidamente agregando 10 volúmenes de metanol frío. Luego se generó una re-precipitación del PHA en metanol y se secó al vacío (Song *et al*, 2008). En contraste existen investigaciones que no lo utilizan como extractor directo, pero lo utilizan en los medios de secado. Naheed realizó la extracción con la adición directa de dodecilsulfato sódico seguido de una centrifugación a 4000 rpm. Después

se realizó una hora de incubación a 37 °C y 15 rpm a peso celular constante. Luego se realizó un proceso de calentamiento a 121 °C por 15 min para luego centrifugar a 4000 rpm después de enfriado. La paleta se lavó con acetona y agua para luego disolverse en cloroformo [14]. Otra extracción similar que no utiliza dodecilsulfato fue realizada por El-Sayed. En ella el cultivo es centrifugado a 10000 rpm a 4 °C por 5 min. Después se genera un tratamiento con una solución de hipoclorito de sodio 4% v/v y se incuba por 1h a 37 °C. Luego se genera una centrifugación a 5000rpm por 15 min. Después el procedimiento es muy parecido al anterior ya que se lava el centrifugado con agua y acetona para luego disolverlo en cloroformo ebuliendo (El-Sayed *et al*, 2017).

Otra metodología que se utiliza es el método de extracción de Yu & Chen donde el cultivo se esteriliza a 120 °C por 30 min, para después ser centrifugado a 5000 rpm por 12 min. Se realizan lavados con agua y ácido sulfúrico 0.1 M y se genera una digestión a 100 °C por 2 horas, ajustando el pH a 10 con NaOH 5N. Se centrifuga a 4000 rpm por 20 min y se re-suspende con una solución al 6% NaCl, para volverse a centrifugar y lavarse con agua (Acosta *et al*, 2018).

## F. Análisis del PHA extraído

El PHA usualmente se analiza utilizando FTIR utilizando rangos de espectrales de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  para confirmar los grupos funcionales del polímero extraído (Santhanam, y Sreenivasan, 2010). Normalmente se utiliza un estándar de PHA con una pureza del 99% (Acosta *et al*, 2018). También es común utilizar cromatografía de gases para la determinación de PHA y cromatografía de filtración (Albuquerque *et al*, 2007).



## IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el uso de los plásticos forma parte del estilo de vida de la sociedad. La producción de estos ha aumentado 50% del año 2002 al 2013 (Greenpeace, 2007). Se espera que para el año 2020 la producción aumente a más de 500 millones de toneladas métricas anuales a nivel mundial para satisfacer la creciente demanda. Esto es insostenible ya que se estima que las reservas de petróleo obtenible se acabarán dentro de cincuenta años.

Por otro lado, se considera que algunos polímeros plásticos derivados del petróleo pueden requerir más de 500 años para degradarse, acumulándose en el ambiente, actualmente, a una tasa de 25 millones de toneladas métricas al año (González, Meza, González y Córdoba, 2013). Esto origina problemas de contaminación ambiental en las áreas de desecho debido a que estas acumulaciones de material bloquean la circulación de gases y líquidos e impiden la estabilización de material orgánico.

Esto requiere establecer formas alternativas de producción de polímeros plásticos. Entre las soluciones analizadas se ha considerado la producción de polihidroxicanoatos. Para que este tenga un precio competitivo se deben encontrar materias primas de bajo valor económico y procesos de eficiencia significativa, capaces de satisfacer la demanda.

Considerando que los polihidroxicanoatos se clasifican como biopolímeros biodegradables, son una alternativa viable para disminuir la dependencia de los polímeros derivados del petróleo. El porcentaje de microorganismos capaces de degradar polihidroxicanoatos en el ambiente está estimado entre el 0.5-9.6% del total de las colonias y se ha obtenido una degradación del 90% de una película del polímero en 5 días (González *et al*, 2013). Este material, además, es biocompatible y posee propiedades fisicomecánicas muy similares a las de los polímeros plásticos producidos a partir de petroquímicos.

En Guatemala, la industria azucarera es una de las más productivas, generando para el año 2018 alrededor del 9% de las exportaciones del país, según el Banco de Guatemala. Se cuenta con más de diez ingenios azucareros en diversos departamentos del país, siendo la melaza uno de los residuos generados en mayor cantidad. Al ser esta una sustancia residual del proceso de cristalización del azúcar su precio de venta es bajo al compararse

con otras fuentes de carbono, siendo este de \$0.70 - \$28.00 por tonelada corta (Bhatia, 2014). Al utilizar melaza como fuente de carbono el costo de sustrato por kilogramo de polihidroxicanoato es de \$0.52, lo cual es menor que utilizar sacarosa o glucosa con la cual el costo es de \$0.72 y \$1.30 por kilogramo de polihidroxicanoato, respectivamente, lo que aumenta la rentabilidad de la producción (Choi y Lee, 1999).

Como una respuesta a la problemática anterior y a los beneficios descritos asociados a la obtención, uso y degradación de este biopolímero se evaluaron tres cepas para la producción de polihidroxicanoatos a escala laboratorio utilizando melaza como fuente de azúcares para comparar su rendimiento de producción. Este trabajo de graduación es el primer peldaño que permitirá avanzar la línea de investigación de polihidroxicanoatos en la Universidad del Valle de Guatemala y es fundamental para conocer las condiciones y cepas que permiten alcanzar un mayor rendimiento de PHA. Con el desarrollo de esta línea de investigación, sementada con este trabajo, se podrá llegar a escalar el proceso de producción de este polímero a nivel piloto en investigaciones posteriores.

## V. OBJETIVOS

### A. General

1. Evaluar tres cepas para la producción de polihidroxicanoatos a escala laboratorio utilizando melaza como fuente de azúcares para comparar su rendimiento de producción.

### B. Específicos

1. Determinar la concentración de azúcares y propiedades físicas de la melaza utilizando técnicas analíticas para definir los componentes que se utilizarán en la preparación de los medios de cultivo.
2. Determinar el efecto de la formulación inicial del medio sobre el rendimiento de PHA utilizando sistemas a escala laboratorio.
3. Cuantificar las concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo, usando técnicas de análisis fisicoquímico para establecer el efecto del tiempo en el rendimiento.



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Determinación de la concentración de azúcares y propiedades físicas de la melaza

- a. Obtener melaza de un ingenio azucarero del país.
- b. Mantener la melaza en refrigeración durante toda la experimentación con el fin de mantener las características fisicoquímicas y prevenir una fermentación anticipada.
- c. Realizar pruebas en triplicado para la determinación de sus propiedades físicas y la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa.

#### 1. Determinación de pH

- d. Colocar dos soluciones buffer con un pH de 7 y una con pH de 10 en dos beakers diferentes.
- e. Sumergir el sensor de un potenciómetro digital en cada solución buffer, esperar a que se estabilice la medición y anotar el valor obtenido.
- f. Construir una curva de calibración con los valores de la solución buffer para corregir el error del instrumento.
- g. Pesar 10 gramos de melaza con una balanza analítica.
- h. Diluir la melaza en agua destilada hasta alcanzar la marca de un balón de 100 mL.
- i. Colocar la solución de melaza en un beaker y sumergir el sensor del potenciómetro digital esperar a que se estabilice la medición y anotar el valor obtenido.
- j. Repetir la medición 2 veces más vertiendo de nuevo solución de melaza en el beaker y descartando la muestra anterior.

#### 2. Determinación de la densidad

- a. Llenar un beaker de 25 mL hasta el borde de su capacidad con agua.
- b. Verter el agua del beaker en una probeta de 50 mL y anotar el volumen obtenido.
- c. Secar el beaker y pesarlo vacío en una balanza analítica.

- d. En un beaker de 500mL calentar la melaza con una estufa agitando contantemente hasta que esta alcance los 30 °C.
- e. Llenar el beaker de 25 mL hasta el borde de su capacidad con la melaza calentada y limpiar las paredes exteriores del beaker.
- f. Pesar el beaker en una balanza analítica y anotar el valor obtenido.
- g. Repetir dos veces más el procedimiento.

### **3. Determinación de viscosidad**

- a. En un beaker de 500mL calentar la melaza con una estufa agitando contantemente hasta que esta alcance los 30 °C.
- b. Colocar un dedo en el agujero inferior de la copa Zahn número cinco.
- c. Llenar la copa con la melaza calentada hasta el borde.
- d. Colocar el beaker debajo del agujero de la copa.
- e. Simultáneamente, retirar el dedo e iniciar el cronómetro.
- f. Anotar el tiempo que toma que se vacíe la copa.
- g. Repetir el procedimiento dos veces más.

### **4. Determinación de grados brix**

- a. En un beaker de 500mL calentar la melaza con una estufa agitando contantemente hasta que esta alcance los 30 °C.
- b. Calibrar un refractómetro digital colocando una gota de agua destilada en el sensor.
- c. Limpiar el sensor.
- d. Colocar una gota de la melaza calentada en el sensor del refractómetro digital y anotar el valor obtenido.
- e. Repetir el procedimiento dos veces más.

### **5. Determinación de compuestos volátiles**

- a. Limpiar y secar el plato metálico de una balanza de humedad.
- b. Tarar el plato metálico con la balanza de humedad.
- c. Agregar una muestra de 0.5g de melaza distribuida en la mayor área posible del plato.
- d. Iniciar un ciclo tipo rampa de la balanza de humedad con un aumento gradual de temperaturas de 40°C a 230°C.

- e. Apuntar el porcentaje de compuestos volátiles obtenido al final del ciclo de la balanza de humedad.
- f. Repetir el procedimiento dos veces más.

## 6. Cuantificación de azúcares

- a. En un beaker pesar 3 g de melaza en una balanza analítica.
- b. Diluir la melaza en agua destilada hasta alcanzar la marca de un balón de 100 mL.
- c. Realizar cinco estándares de sacarosa, glucosa y fructosa grado laboratorio pesando las cantidades especificadas en el cuadro 3 y diluyéndolas en agua destilada hasta alcanzar la marca de un balón de 25 mL.
- d. Filtrar y colocar los estándares y la solución de melaza en viales.
- e. Ingresar al sistema las concentraciones de cada estándar.
- f. Iniciar el sistema de cromatografía utilizando una columna Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5µm, fase móvil agua a temperatura de 75°C, 55 °C en un detector de índice de refracción y 25 °C en el automostreador.

*Cuadro 3. Cantidad de sacarosa, glucosa y fructosa en cada estándar utilizado en la calibración de cromatógrafo líquido de alta resolución.*

<b>Especie</b>	<b>Cantidad del estándar 1 (±00001 g)</b>	<b>Cantidad del estándar 2 (±00001 g)</b>	<b>Cantidad del estándar 3 (±00001 g)</b>	<b>Cantidad del estándar 4 (±00001 g)</b>	<b>Cantidad del estándar 5 (±00001 g)</b>
Sacarosa	0.12611	0.23622	0.48497	0.96137	1.13615
Fructosa	0.15101	0.29914	0.45622	0.60246	0.82666
Glucosa	0.09286	0.18826	0.39156	0.74470	0.97465

## B. Elaboración del medio fermentativo

### 1. Solución concentrada de sales

- a. Pesar siete diferentes sales en un beaker de 500mL utilizando una balanza analítica. La identidad de las especies y la cantidad de cada una de ellas se encuentra en el Cuadro 4.

*Cuadro 4. Cantidad de sales pesada para hacer una solución madre*

<b>Especie</b>	<b>Cantidad (<math>\pm 0001</math> g)</b>
(NH <sub>4</sub> )Cl	7.4921
NaHCO <sub>3</sub>	3.7529
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.0983
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15.4995
MgSO <sub>4</sub>	3.7469
CaCl <sub>2</sub> 2-hidratado	0.0793
FeSO <sub>4</sub>	0.4081

- b. Disolver las sales en agua destilada y trasladar la solución a un balón de 1000 mL.
- c. Agregar agua destilada hasta que el menisco alcance la marca del balón.
- d. Tomar 65 mL de la solución madre realizada en los pasos anteriores con una pipeta de 100 mL y verterlos en un balón de 500 mL.
- e. Agregar agua destilada hasta que el menisco alcance la marca del balón.
- f. Las concentraciones de las especies químicas utilizadas en la solución concentrada de sales que se utilizará en la fermentación deberán ser:

*Cuadro 5. Concentración de especies químicas en la solución concentrada de sales utilizada en la fermentación.*

<b>Especie</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
(NH <sub>4</sub> )Cl	0.9740 $\pm$ 0.0012
NaHCO <sub>3</sub>	0.4879 $\pm$ 0.0006
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.9628 $\pm$ 0.0025

<b>Especie</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0149 ± 0.0026
MgSO <sub>4</sub>	0.4871 ± 0.0006
CaCl <sub>2</sub> 2-hidratado	0.0103 ± 0.0001
FeSO <sub>4</sub>	0.0531 ± 0.0001

## 2. Medio fermentativo

- Ingresar a la autoclave 40 Erlenmeyers de 250 mL, un beaker de 500 mL, la solución concentrada de sales, una pipeta de 1mL, una pipeta de 10 mL, 40 balones de 100 mL y un Erlenmeyer de 2L.
- Encender la autoclave y setear la temperatura a 120 °C.
- Una vez alcanzada esa temperatura esperar 20 minutos, esperar que baje la temperatura y sacar la cristalería.
- Pesar 500 g de melaza en un beaker de 1000 mL.
- Diluir la melaza en agua destilada hasta alcanzar la marca de un balón de 1000 mL.
- Trasladar la solución de melaza a un frasco de vidrio e ingresar a la autoclave a 60 °C por dos horas.
- Agregar 2 L de agua destilada al Erlenmeyer esterilizado y calentar hasta alcanzar le ebullición.
- Esperar que el agua alcance de nuevo la temperatura ambiente.
- Realizar las soluciones de cada medio fermentativo por medio de las combinaciones considerando el análisis de tres concentraciones por cada parámetro operativo, según al siguiente cuadro.

*Cuadro 6. Concentraciones iniciales evaluadas en la experimentación*

<b>Componente del medio</b>	<b>Concentraciones evaluadas</b>
Melaza	2%, 3%, 4% (m/v)
Solución concentrada de sales	1%, 2%, 3% (v/v)

- j. Agregar 4, 6 y 8 mL de la solución de melaza concentrada para las soluciones de 2%, 3%, 4% (m/v), respectivamente, utilizando la pipeta de 10 mL a los balones de 100 mL correspondientes.
- k. Agregar 1, 2 y 3 mL de la solución de sales concentrada para las soluciones de 1%, 2%, 3% (v/v), respectivamente, utilizando la pipeta de 1 mL a los balones de 100 mL correspondientes.
- l. Agregar el agua estéril hasta la marca de 100 mL de los balones y agitar.
- m. Trasladar el medio fermentativo formulado a los Erlenmeyers.

### 3. Inoculación

- a. Obtener las cepas *Bacillus cereus* ATCC® 14579TM, *Bacillus subtilis subsp. subtilis* ATCC® 6051TM y *Pseudomonas putida* ATCC® 49128TM, de marca Microbiologics, línea Kwik Stik.
- b. Estriar el hisopo de las cepas en cajas Petri con agar nutritivo.
- c. Incubar las cajas Petri por 72 horas a una temperatura de 35°C para las *Bacillus* y 30°C para la *Pseudomonas putida*.
- d. Tomar una colonia con un asa de estriar de una caja Petri e ingresarla a un Erlenmeyer con caldo nutritivo, agitando el asa.
- e. Incubar el caldo por 72 horas a 150 rpm con una temperatura de 35°C para las *Bacillus* y 30°C para la *Pseudomonas putida*.
- f. Tomar 0.5 mL del caldo y verter en el plato limpio y tarado de la balanza de humedad.
- g. Obtener el peso seco del caldo por a través del porcentaje evaporado.
- h. Centrifugar el caldo por 15 minutos y descartar el sobrenadante.
- i. Re suspender las células en suficiente agua destilada estéril para que al agregar 1mL de esta mezcla en el medio fermentativo preparado, se alcance una concentración inicial de células de  $6 \times 10^5$  por cada mL.

## C. Fermentación

- a. Ingresar los medios fermentativos inoculados a una incubadora con una agitación de 150 rpm.
- b. Setear la temperatura de la fermentación a 35°C para las especies *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis subsp. subtilis* y 30°C para la especie *Pseudomonas putida*.
- c. Cada 24 horas de fermentación tomar un Erlenmeyer de cada combinación como muestra, con el fin de evitar la contaminación del medio de cultivo y obtener muestras de mayor cantidad, hasta alcanzar las 96 horas de fermentación.

## D. Procedimientos analíticos

### 1. Determinación del crecimiento celular

- a. Pesar el medio fermentativo analítica y colocarlo en viales de centrifugación.
- b. Centrifugar los medios fermentativos por 20 minutos.
- c. Descartar el sobrenadante y Re suspender los sólidos en 20 mL de agua destilada.
- d. Colocar la mezcla en un beakers tarados y secar los sólidos por 24 horas en una mufla a 110°C.
- e. Pesar el sólido seco con una balanza analítica.

### 2. Cuantificación de polihidroxicanoatos

- a. Agregar 25mL de hipoclorito de sodio comercial al 5% (m/v) al sólido seco obtenido de la determinación de crecimiento celular.
- b. Incubar el sólido con hipoclorito a 37°C por 1 hora.
- c. Agitar el contenido del beaker y raspar las paredes y el fondo de este.
- d. Trasvasar el contenido del beaker a viales de centrifugación y centrifugar por 20 minutos.
- e. Descartar el sobrenadante y Re suspender el sólido en 15 mL de agua destilada.

- f. Trasvasar el contenido de nuevo al beaker y agregar 2mL de acetona.
- g. Secar el sólido en una mufla a 110°C por 24 horas.
- h. Pesar el sólido seco con una balanza analítica.

### **3. Cuantificación de azúcares en el fermentado**

- a. Tomar 2 mL de muestra del caldo cada fermentación con una pipeta de 1mL y colocarlo en un tubo de ensayo.
- b. Agregar 2mL de agua destilada al tubo de ensayo.
- c. Seguir los pasos **c** a **f** de el inciso 7 de la Determinación de la concentración de azúcares y propiedades físicas de la Melaza llamado Cuantificación de azúcares de esta sección de Materiales y métodos.

### **4. Determinación de polihidroxicanoatos**

- a. Hacer una pastilla del sólido seco de polihidroxicanoatos de cada cepa evaluada y bromuro de potasio con una prensa hidráulica de laboratorio.
- b. Colocar la pastilla en el contenedor para muestras.
- c. Ingresar la muestra al sistema y analizarla a una longitud de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .
- d. Obtener el espectro de transmitancia en función de longitud de onda.

## VII. RESULTADOS

### A. Determinación de la concentración de azúcares y propiedades físicas de la melaza

*Cuadro 7. Concentración de azúcares en melaza encontradas con cromatografía líquida de alta eficacia<sup>1</sup>*

<b>Azúcar</b>	<b>Concentración experimental (m/m)</b>	<b>Desviación estándar (m/m)</b>	<b>Concentración teórica (m/m)</b>
Sacarosa	$3.955 \times 10^{-1}$	$0.009 \times 10^{-1}$	$3 \times 10^{-1} - 4 \times 10^{-1}$
Glucosa	$7.051 \times 10^{-2}$	$0.072 \times 10^{-2}$	$4 \times 10^{-2} - 9 \times 10^{-2}$
Fructosa	$7.417 \times 10^{-2}$	$0.275 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-2} - 12 \times 10^{-2}$

<sup>1</sup> Estos datos son un promedio de las mediciones en duplicado generadas utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución con una columna Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5µm, fase móvil agua a temperatura de 75°C, 55 °C en el detector de índice de refracción y 25 °C en el automostreador. Estas concentraciones fueron encontradas a partir de una solución 3% (p/v) de melaza de acuerdo con el cálculo 7.

*Cuadro 8. Propiedades fisicoquímicas de melaza encontradas de forma experimental<sup>1</sup>*

<b>Propiedad</b>	<b>Valor experimental</b>	<b>Desviación estándar</b>
pH <sup>2</sup>	5.09	0.06
Densidad (kg/L) <sup>3</sup>	1.28	0.01
Viscosidad (St) <sup>4</sup>	300.23	25.40
Sólidos disueltos (°Bx) <sup>5</sup>	83.4	0.3
Compuestos volátiles (m/m) <sup>6</sup>	13.45%	0.71%

<sup>1</sup> Las propiedades son un promedio de mediciones realizadas en triplicado.

<sup>2</sup> Esta propiedad fue analizada a una temperatura de 25°C utilizando un potenciómetro digital calibrado con soluciones buffers en una solución de 0.1 g/mL de melaza de acuerdo con los cálculos 1 a 3.

<sup>3</sup> Esta propiedad fue analizada a una temperatura de melaza correspondiente a 30°C por medio de la determinación de masa y volumen de acuerdo a los cálculos 4 a 5.

<sup>4</sup> Esta propiedad fue analizada a una temperatura de melaza correspondiente a 30°C utilizando la copa de Zahn número 5 de acuerdo con el cálculo 6.

<sup>5</sup> Esta propiedad fue analizada a una temperatura de melaza correspondiente a 30°C utilizando un refractómetro digital.

<sup>6</sup> Esta propiedad fue determinada utilizando una balanza de humedad.

*Cuadro 9. Formulación de los medios fermentativos a partir de la combinación de los parámetros analizados*

<b>Nombre de la combinación</b>	<b>Concentración de melaza (± 0.01% m/v)</b>	<b>Concentración de Sales (± 0.01% v/v)</b>
S1M2	2.00%	1.00%
S1M3	3.00%	1.00%

Nombre de la combinación	Concentración de melaza ( $\pm 0.01\%$ m/v)	Concentración de Sales ( $\pm 0.01\%$ v/v)
S1M4	4.00%	1.00%
S2M2	2.00%	2.00%
S2M3	3.00%	2.00%
S2M4	4.00%	2.00%
S3M2	2.00%	3.00%
S3M3	3.00%	3.00%
S3M4	4.00%	3.00%

## B. Comparación de las formulaciones de los medios fermentativos en la producción de polihidroxiclcanoatos

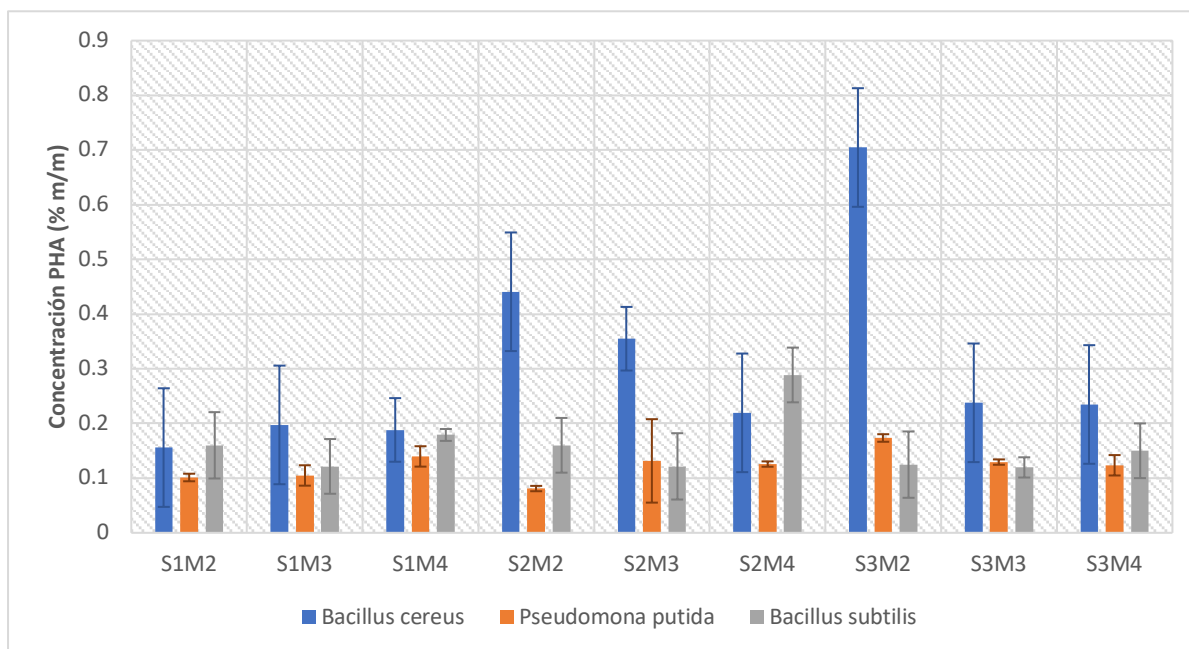


Figura 13. Producción máxima de polihidroxiclcanoatos en las combinaciones de melaza y sales analizadas para *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida* y *Bacillus subtilis*

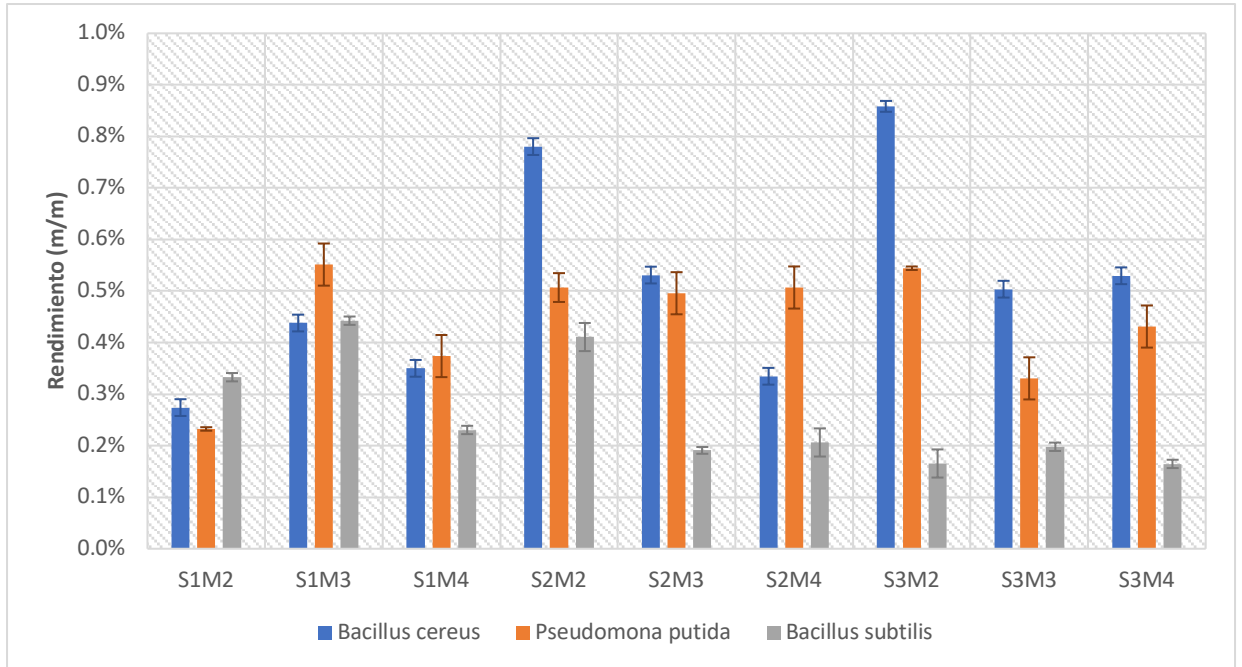


Figura 14. Rendimiento máximo de polihidroxicanoatos en las combinaciones de melaza y sales analizadas para *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida* y *Bacillus subtilis*

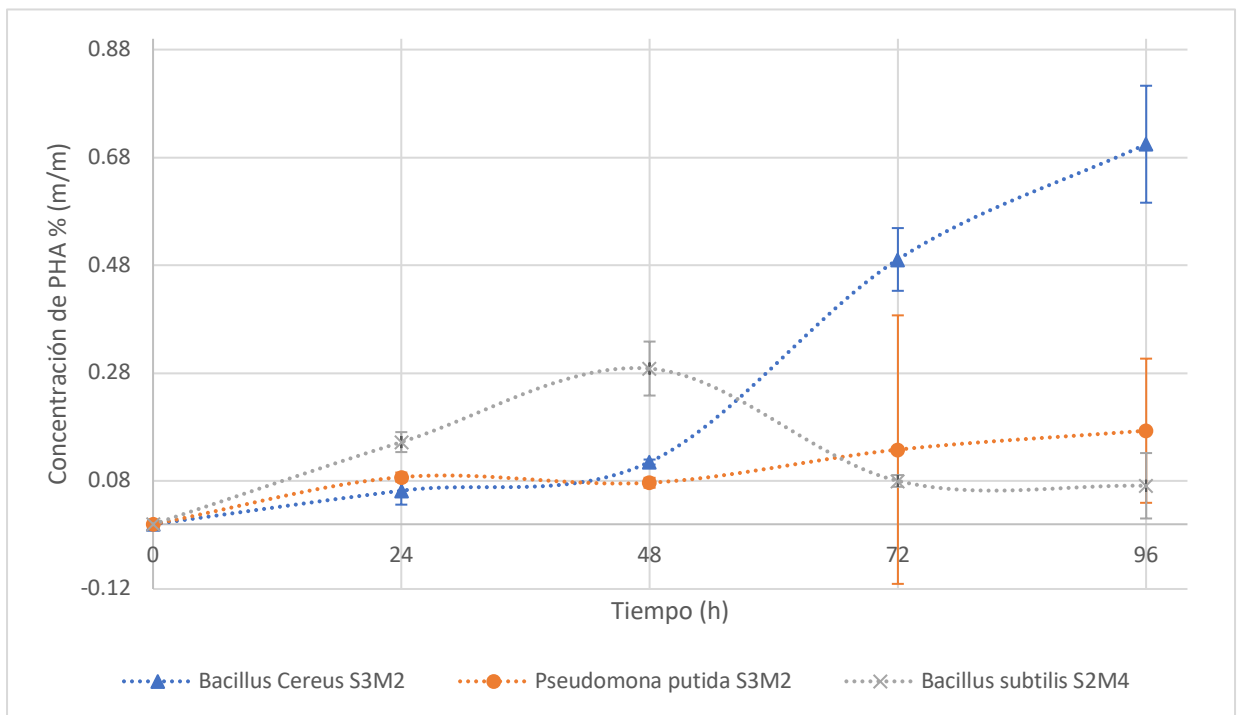


Figura 15. Comparación de la producción de polihidroxicanoatos de las combinaciones con mayor concentración de PHA alcanzada para cada cepa.

## C. Cuantificación de las concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo

### 1. *Bacillus Cereus*

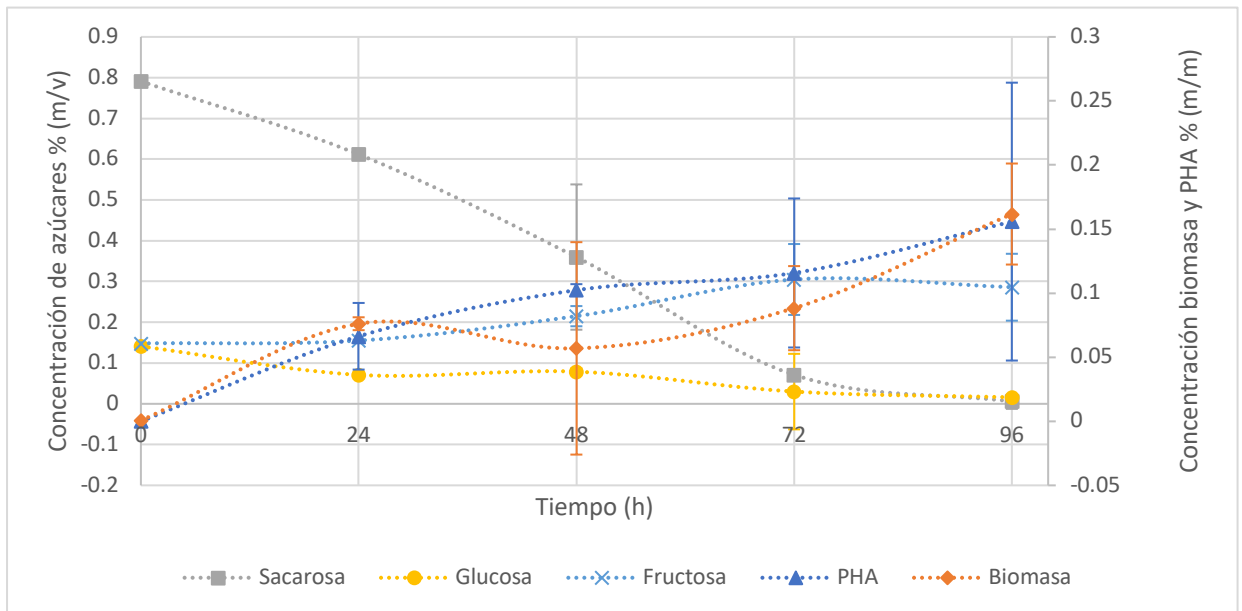


Figura 16. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus cereus* a 35 °C

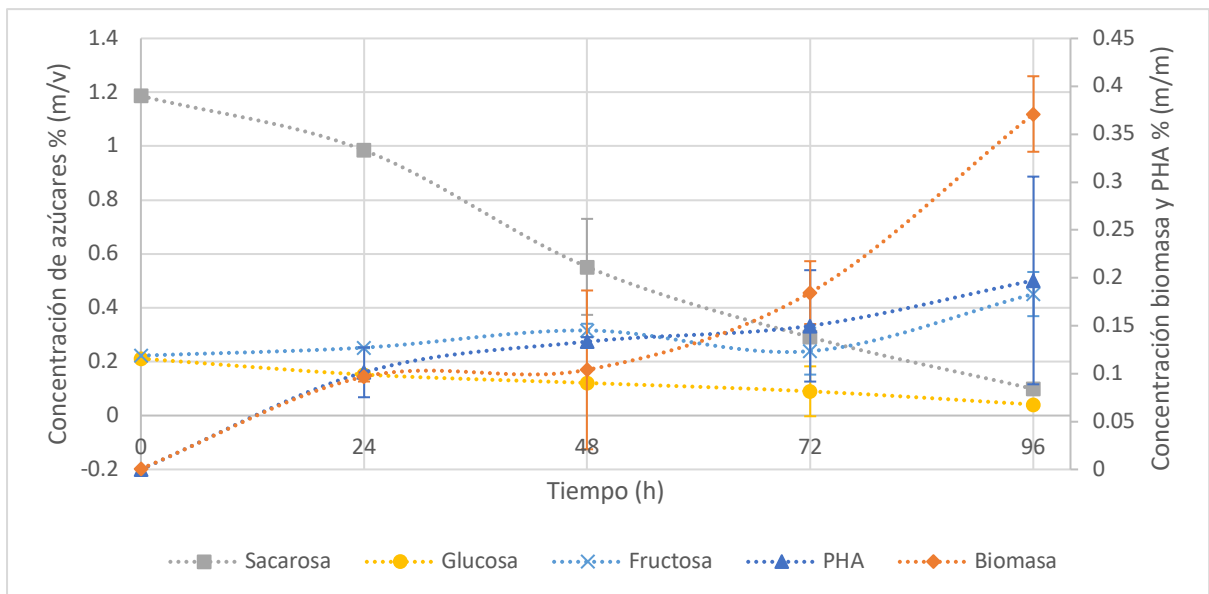


Figura 17. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus cereus* a 35 °C

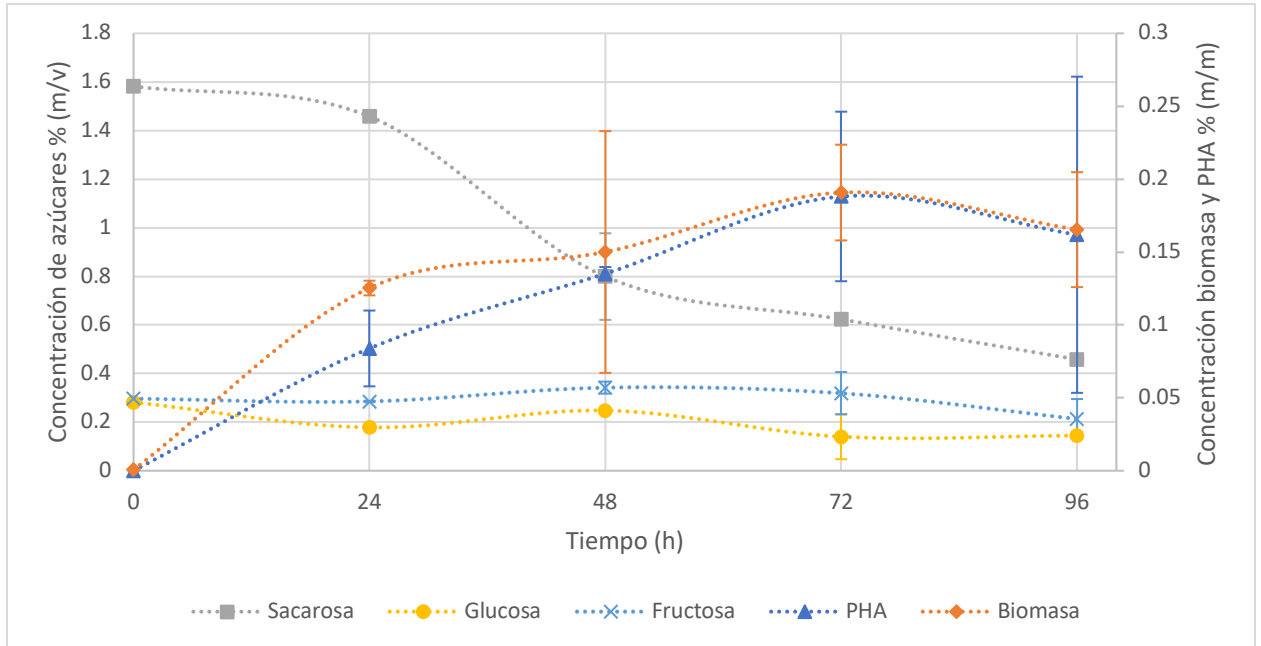


Figura 18. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus cereus* a 35 °C

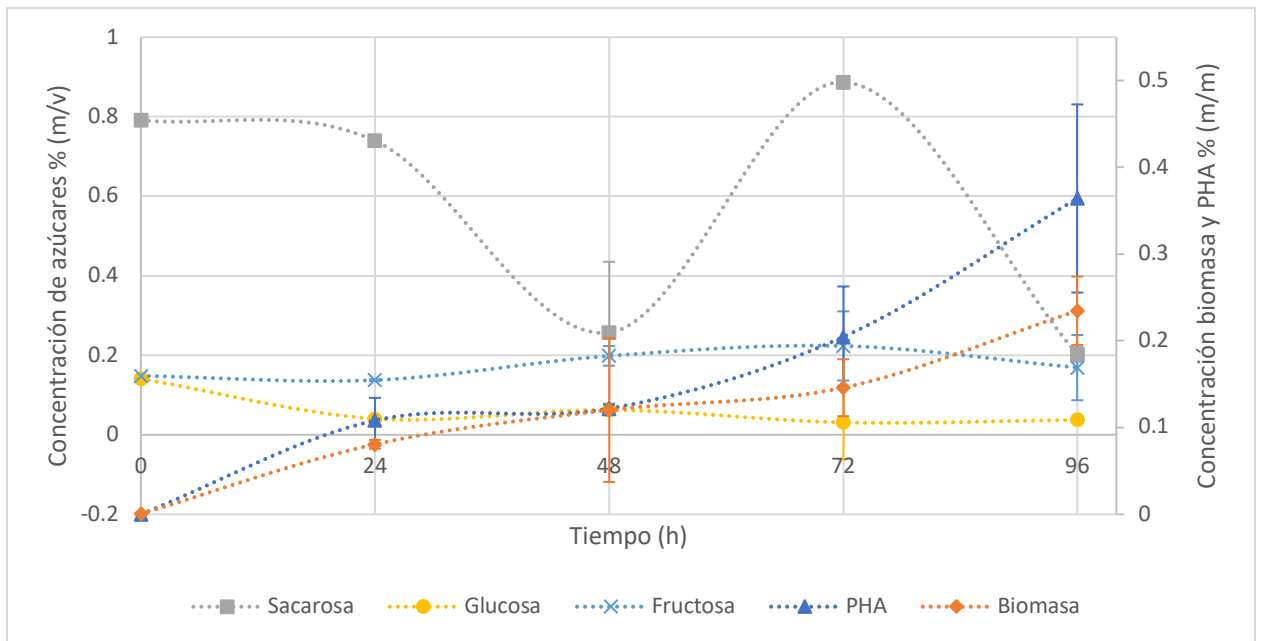


Figura 19. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus cereus* a 35 °C

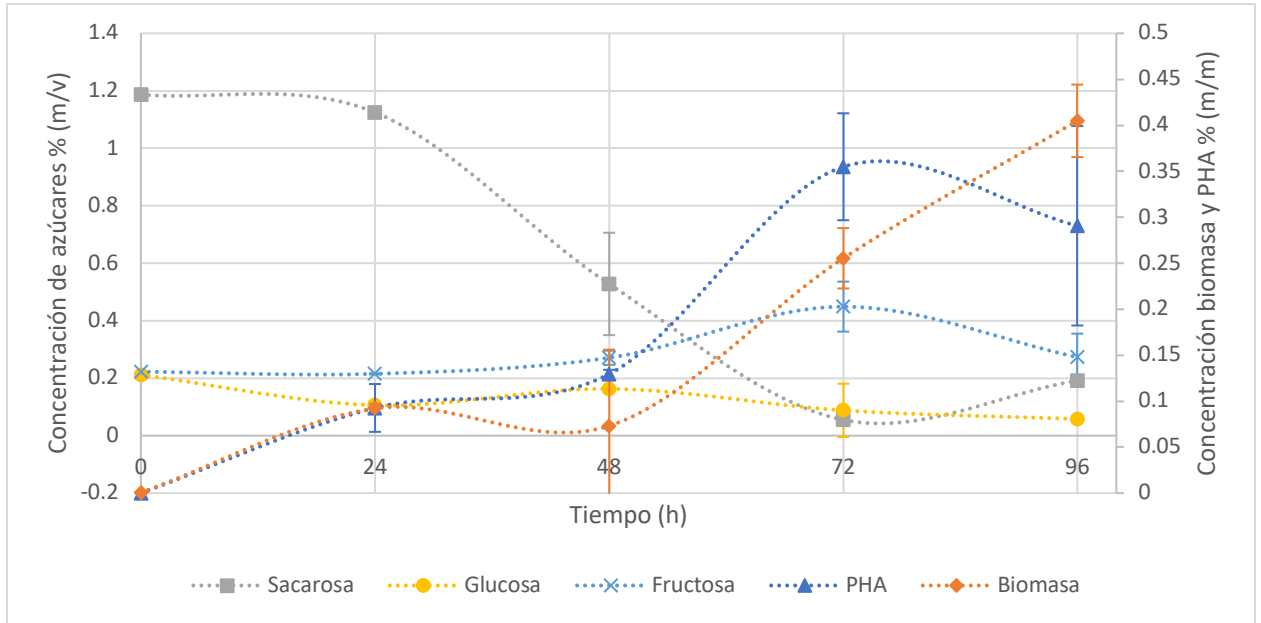


Figura 20. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus cereus* a 35 °C

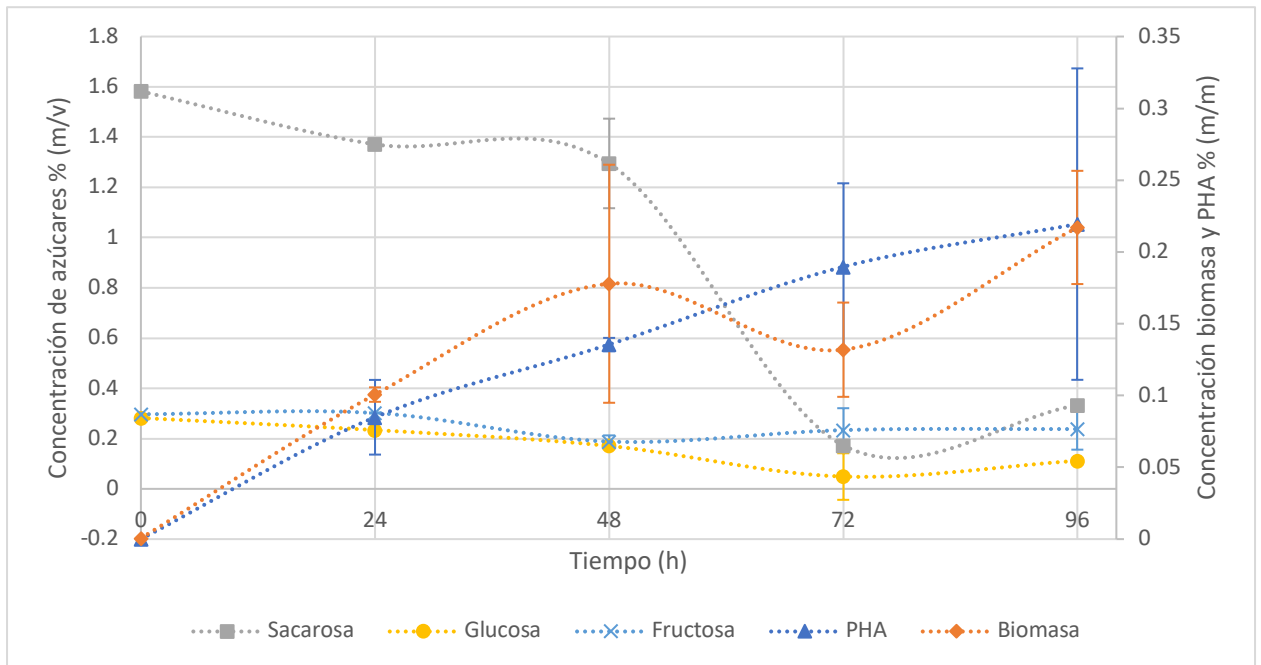


Figura 21. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus cereus* a 35 °C

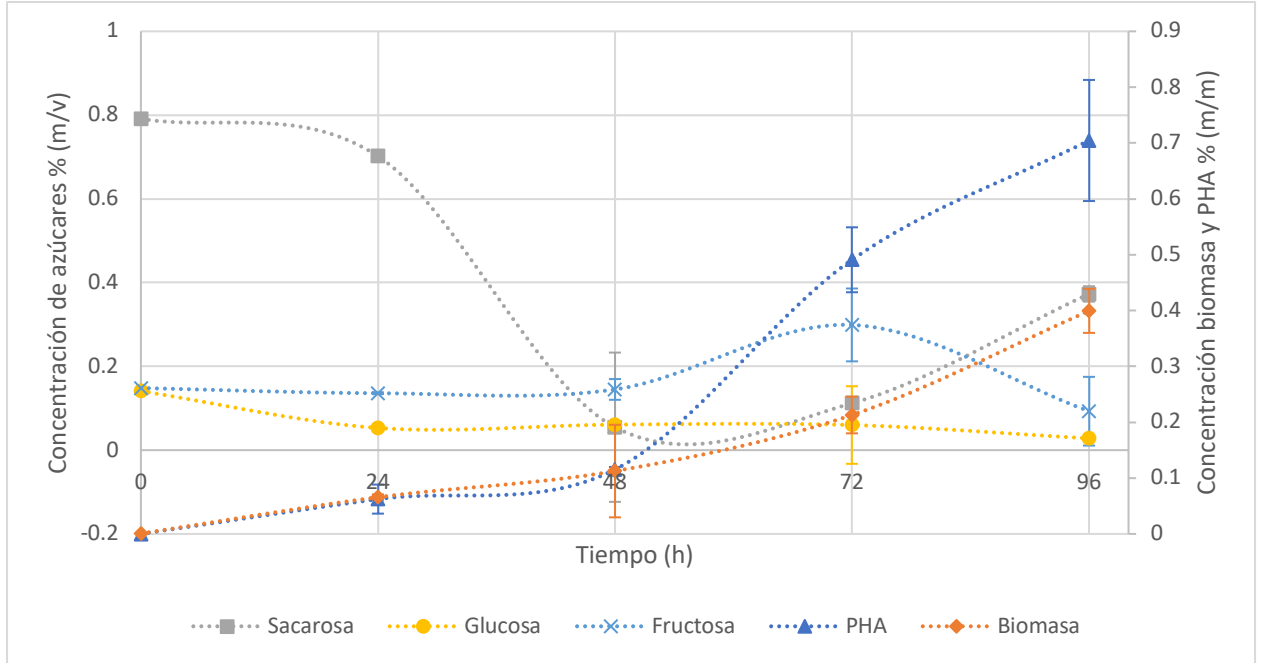


Figura 22. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus cereus* a 35 °C

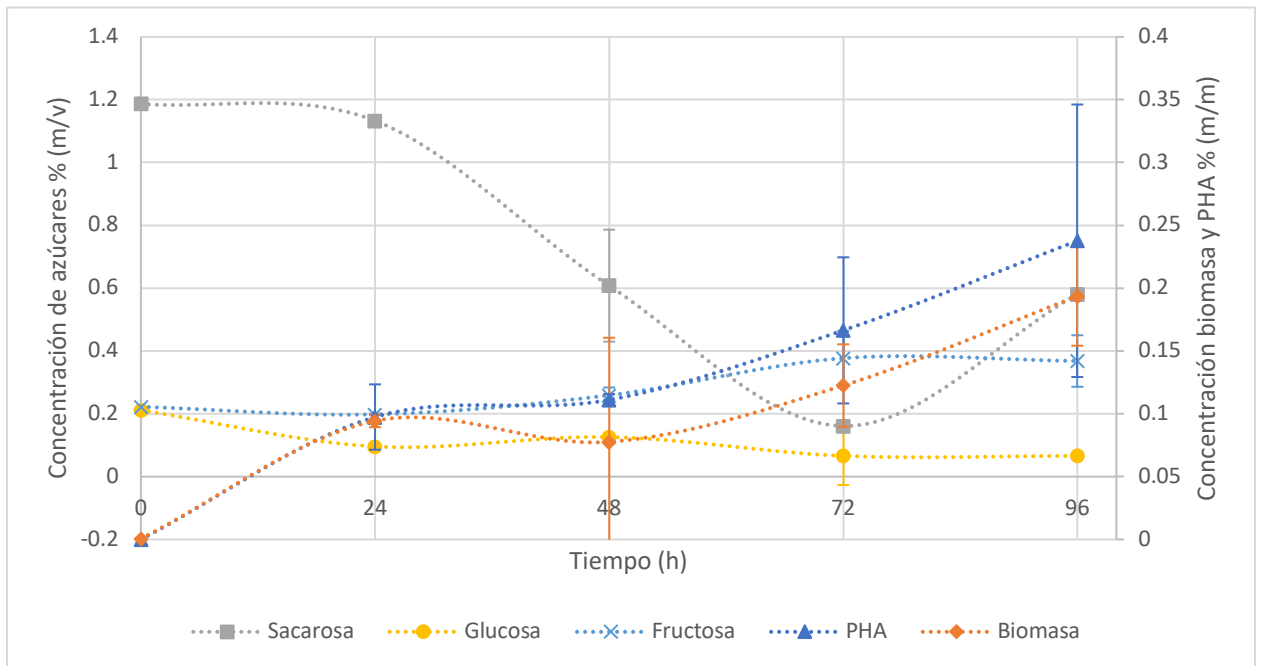


Figura 23. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus cereus*. a 35 °C

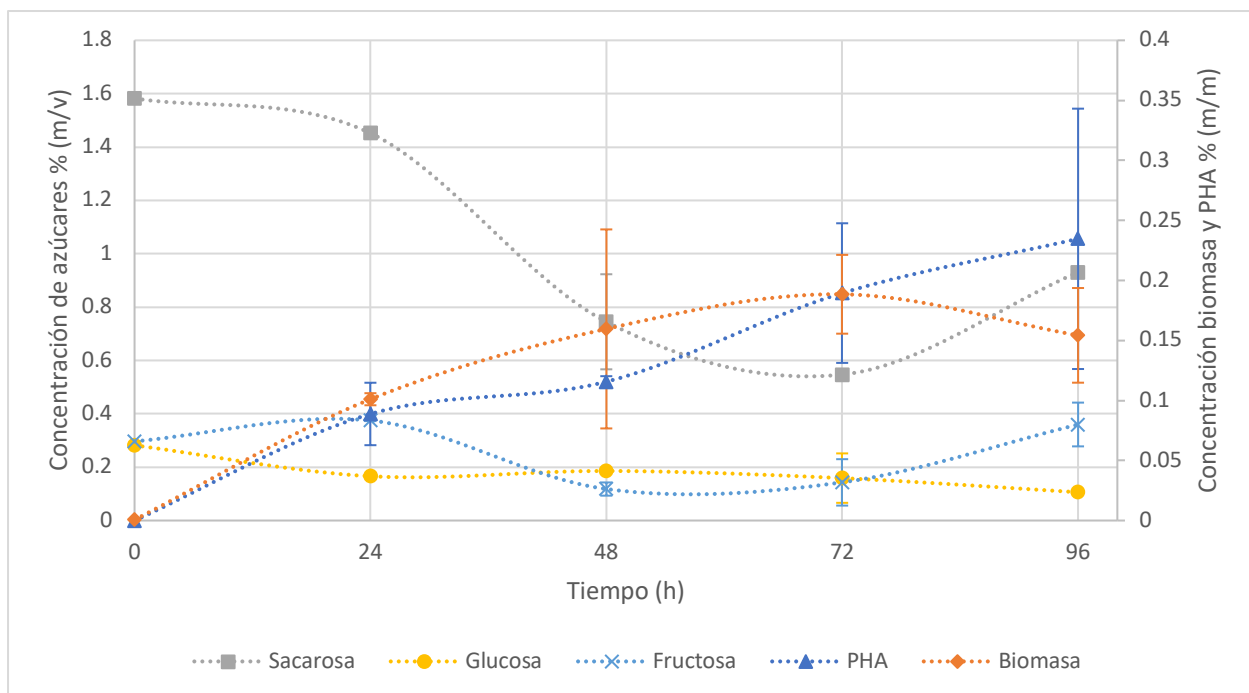


Figura 24. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus cereus*. a 35 °C

Cuadro 10. Rendimientos de polihidroxicarboxilatos respecto al consumo de azúcares totales en función del tiempo para las fermentaciones con *Bacillus cereus* a 35°C<sup>1</sup>

Nombre de la combinación	Rendimiento <sup>2</sup> a las 24 horas (%m/m)	Rendimiento <sup>2</sup> a las 48 horas (%m/m)	Rendimiento <sup>2</sup> a las 72 horas (%m/m)	Rendimiento <sup>2</sup> a las 96 horas (%m/m)
S1M2	<b>0.274±0.002</b>	0.240±0.001	0.172±0.005	0.202±0.001
S1M3	<b>0.438±0.002</b>	0.211±0.001	0.150±0.005	0.192±0.001
S1M4	<b>0.350±0.002</b>	0.175±0.001	0.174±0.005	0.120±0.001
S2M2	<b>0.780±0.002</b>	0.264±0.001	0.125±0.005	0.611±0.001
S2M3	<b>0.531±0.002</b>	0.197±0.001	0.345±0.005	0.265±0.001
S2M4	<b>0.335±0.002</b>	0.267±0.001	0.111±0.005	0.148±0.001
S3M2	0.329±0.002	0.141±0.001	0.806±0.005	<b>0.858±0.001</b>
S3M3	<b>0.504±0.002</b>	0.177±0.001	0.164±0.005	0.393±0.001
S3M4	<b>0.530±0.002</b>	0.104±0.001	0.144±0.005	0.307±0.001

<sup>1</sup> Datos analizados utilizando la técnica de peso seco de acuerdo con el cálculo 16

<sup>2</sup> Se encuentran en negrillas los mayores rendimientos en el tiempo de fermentación para cada combinación.

## 2. *Pseudomona putida*

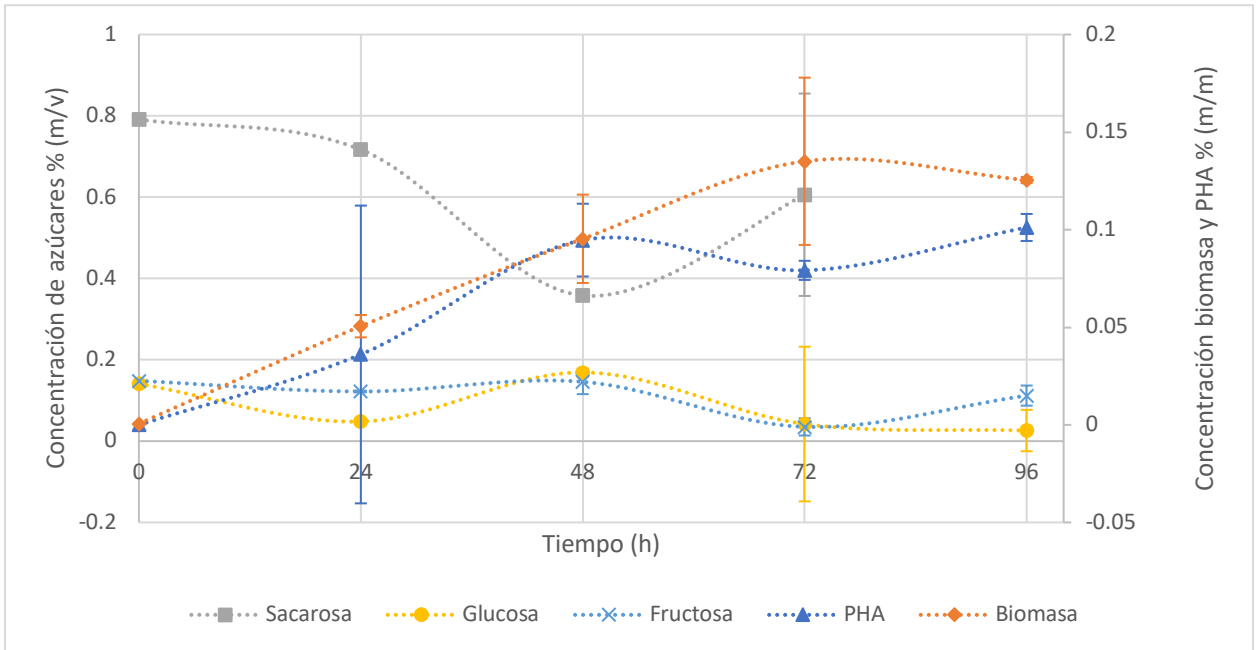


Figura 25. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con *Pseudomona putida* a 30 °C

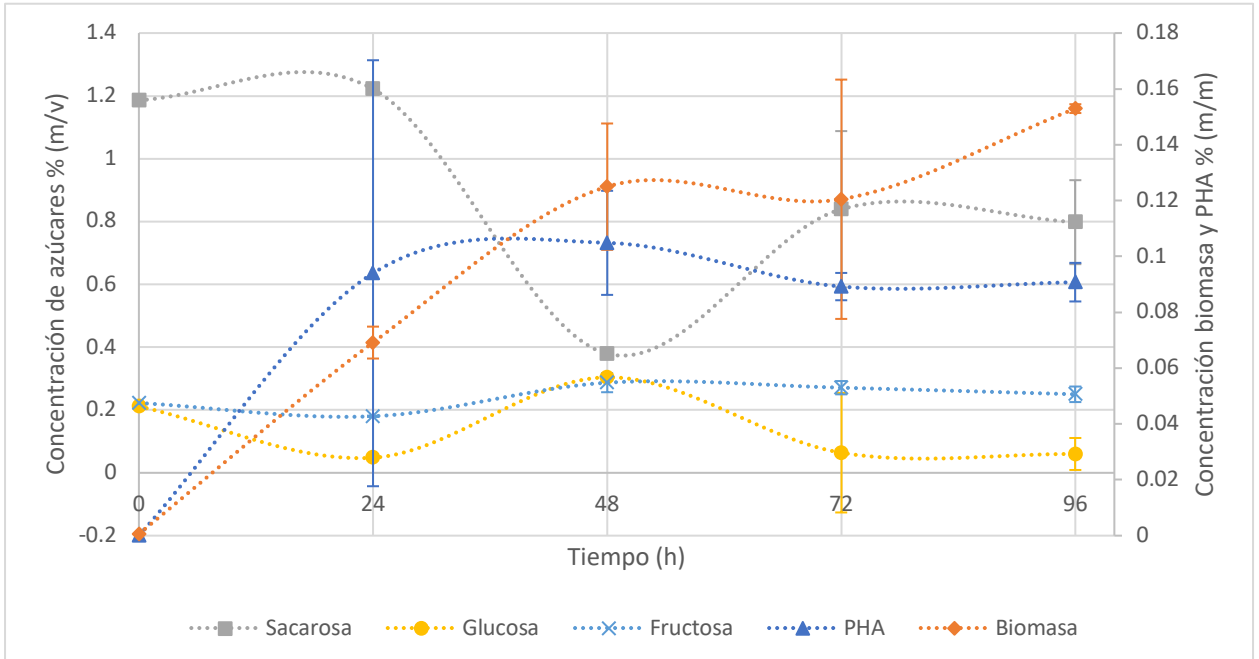


Figura 26. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con *Pseudomona putida* a 30 °C

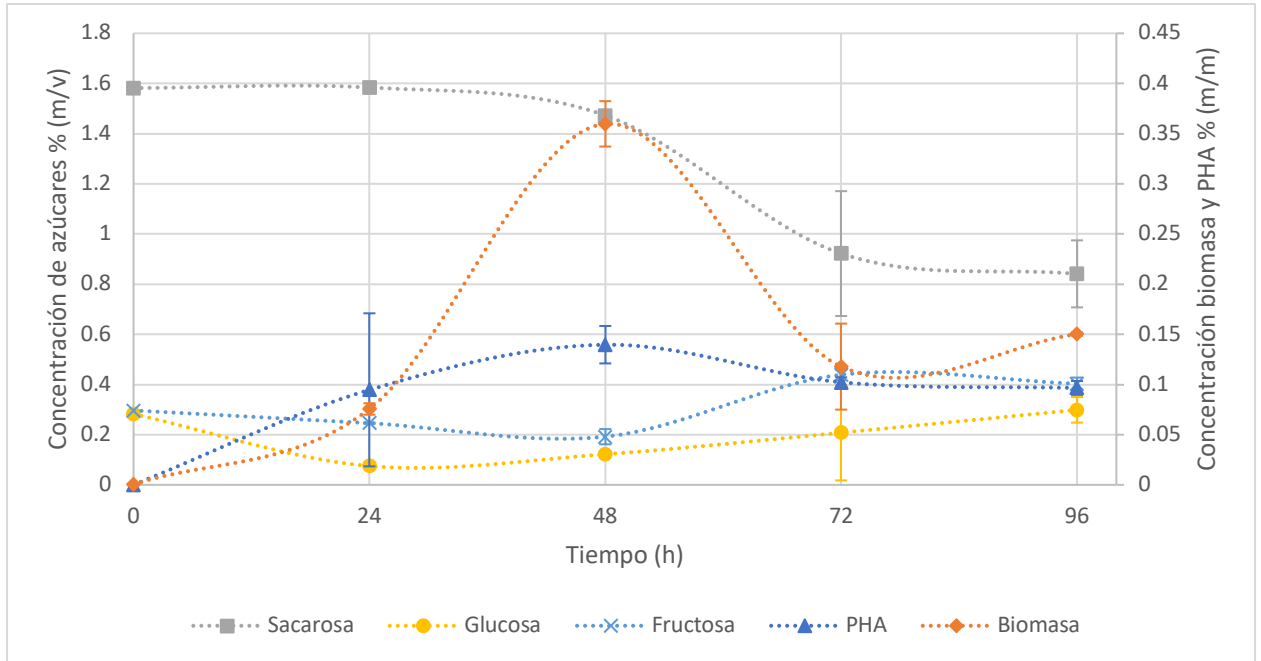


Figura 27. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con *Pseudomona putida* a 30 °C

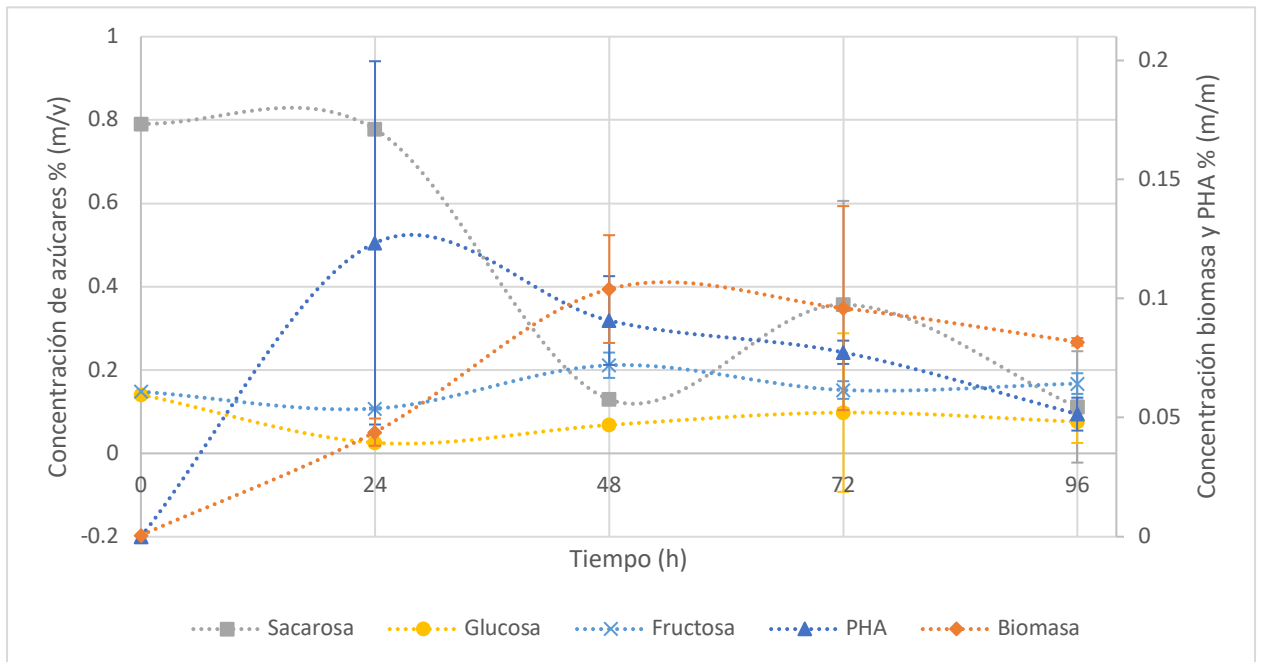


Figura 28. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con *Pseudomona putida* a 30 °C

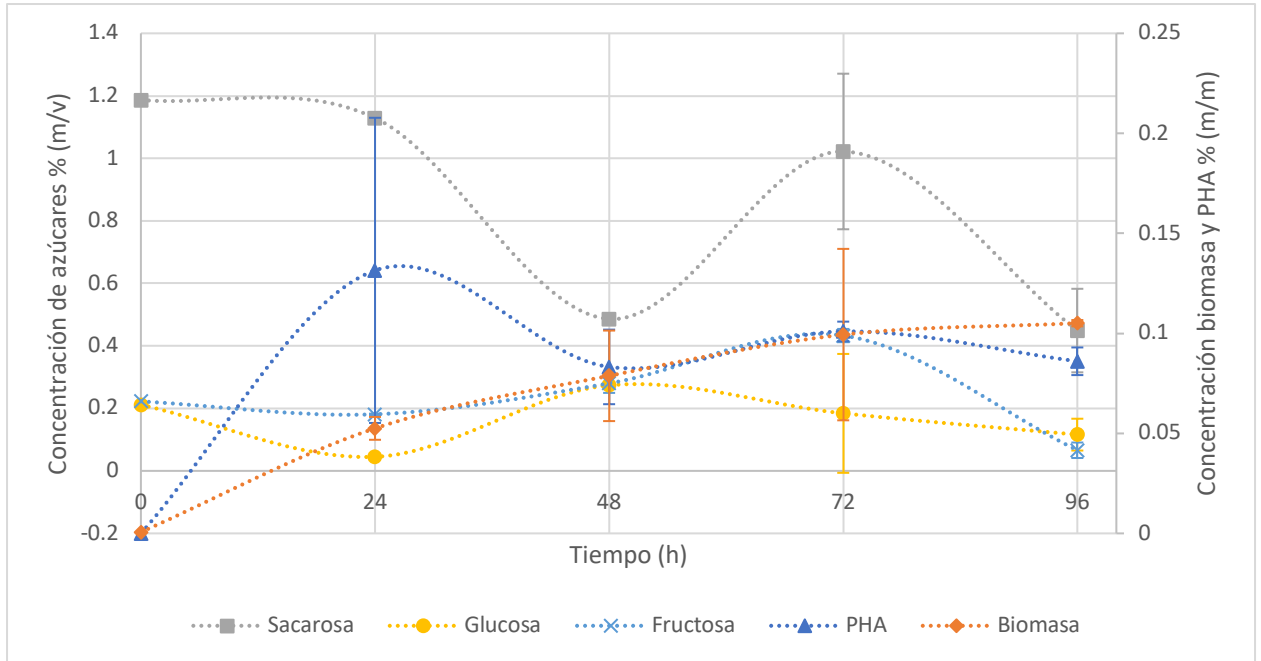


Figura 29. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con *Pseudomona putida* a 30 °C

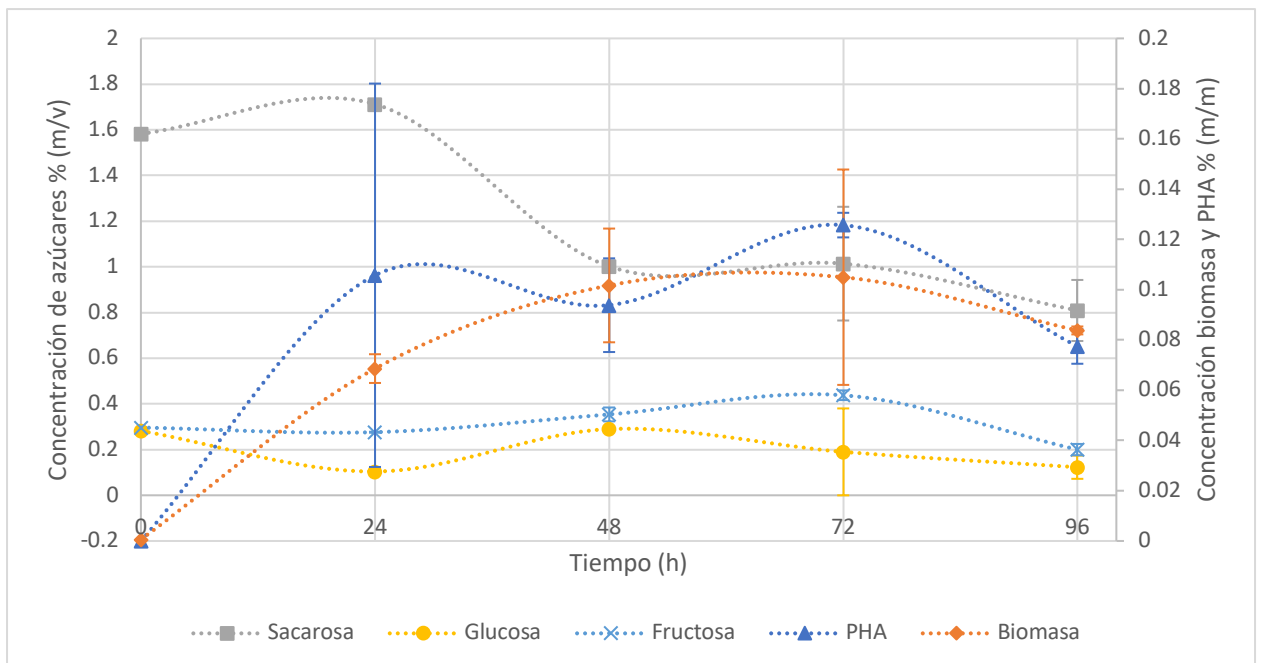


Figura 30. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con *Pseudomona putida* a 30 °C

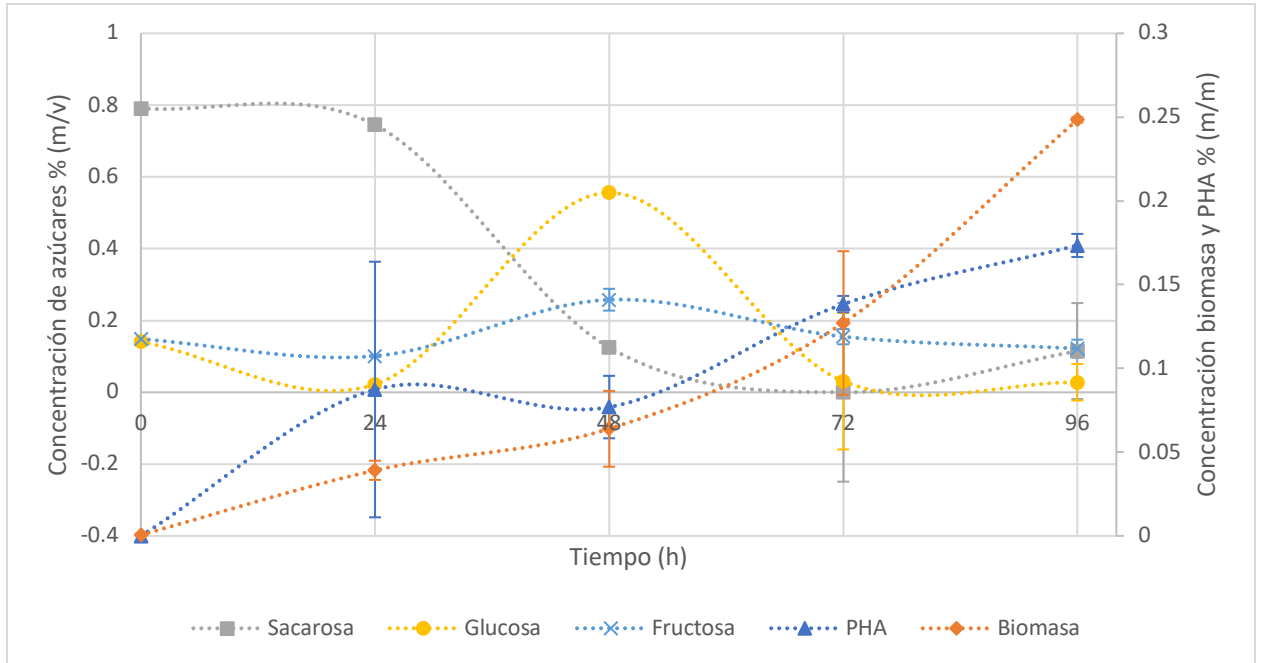


Figura 31. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con *Pseudomona putida* a 30 °C

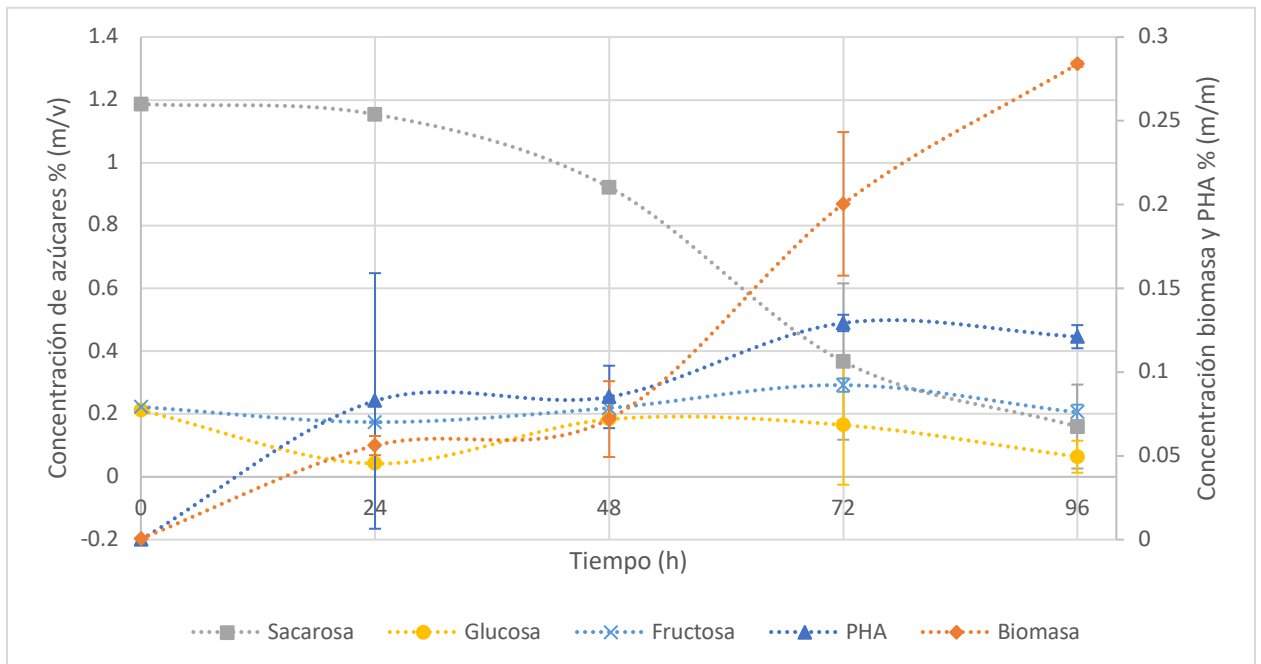


Figura 32. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con *Pseudomona putida* a 30 °C

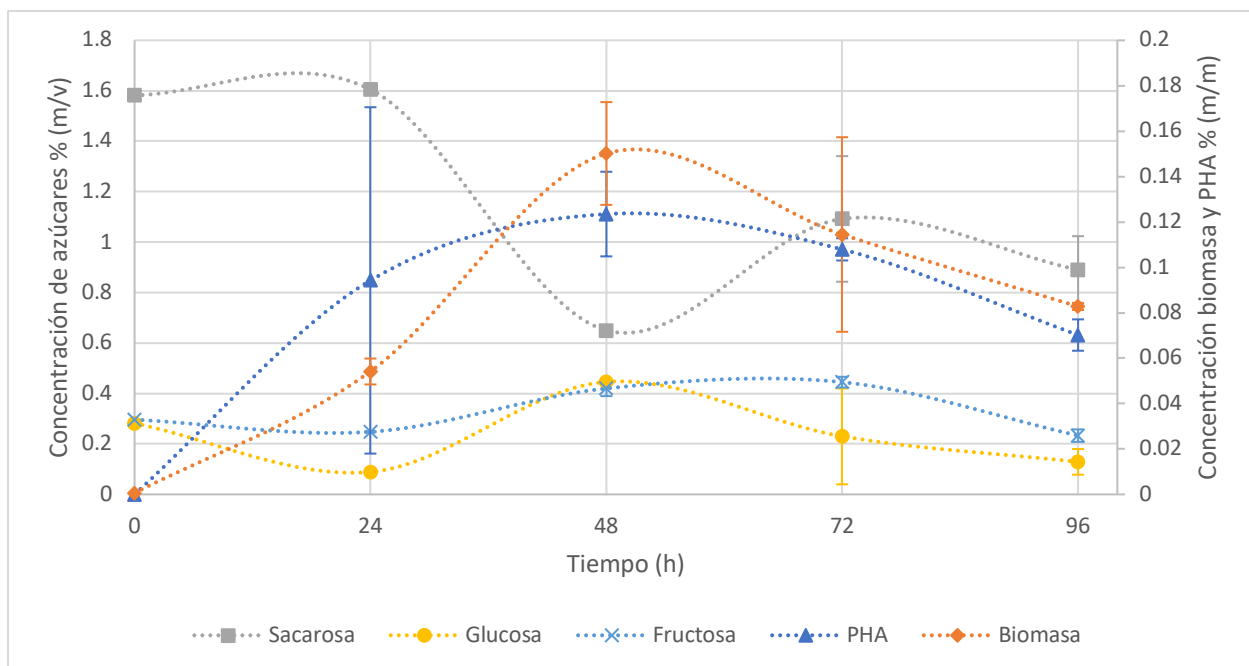


Figura 33. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con *Pseudomonas putida* a 30 °C

Cuadro 11. Rendimientos de polihidroxicanoatos respecto al consumo de azúcares totales en función del tiempo para las fermentaciones con *Pseudomonas putida* a 35°C<sup>1</sup>

Nombre de la combinación	Rendimiento <sup>2</sup> a las 24 horas (%m/m)	Rendimiento <sup>2</sup> a las 48 horas (%m/m)	Rendimiento <sup>2</sup> a las 72 horas (%m/m)	Rendimiento <sup>2</sup> a las 96 horas (%m/m)
S1M2	0.187±0.004	<b>0.232±0.001</b>	0.199±0.003	0.107±0.001
S1M3	<b>0.551±0.004</b>	0.161±0.001	0.200±0.003	0.177±0.001
S1M4	0.370±0.004	<b>0.374±0.001</b>	0.173±0.003	0.156±0.001
S2M2	0.428±0.004	0.112±0.001	<b>0.507±0.003</b>	0.092±0.001
S2M3	<b>0.496±0.004</b>	0.143±0.001	0.447±0.003	0.087±0.001
S2M4	<b>0.507±0.004</b>	0.182±0.001	0.164±0.003	0.075±0.001
S3M2	0.412±0.004	<b>0.544±0.001</b>	0.155±0.003	0.213±0.001
S3M3	<b>0.331±0.004</b>	0.287±0.001	0.162±0.003	0.102±0.001
S3M4	<b>0.431±0.004</b>	0.192±0.001	0.274±0.003	0.077±0.001

<sup>1</sup> Datos analizados utilizando la técnica de peso seco de acuerdo con el cálculo 16

<sup>2</sup> Se encuentran en negrilla los mayores rendimientos en el tiempo de fermentación para cada combinación.

### 3. *Bacillus Subtilis*

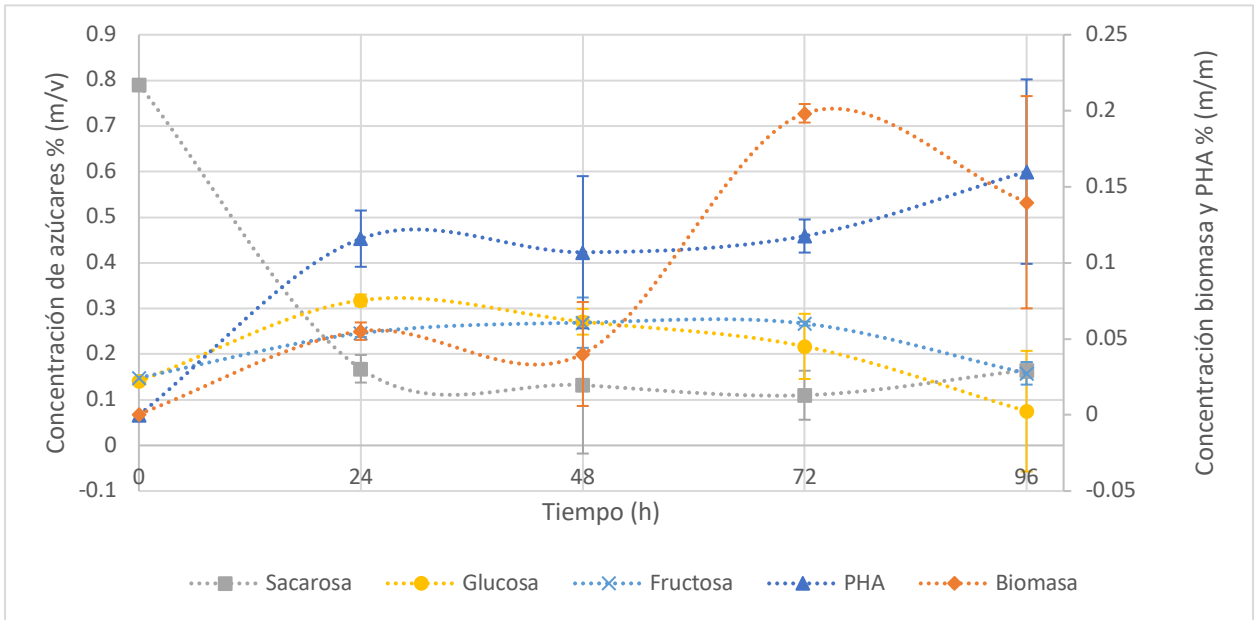


Figura 34. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus subtilis* a 35 °C

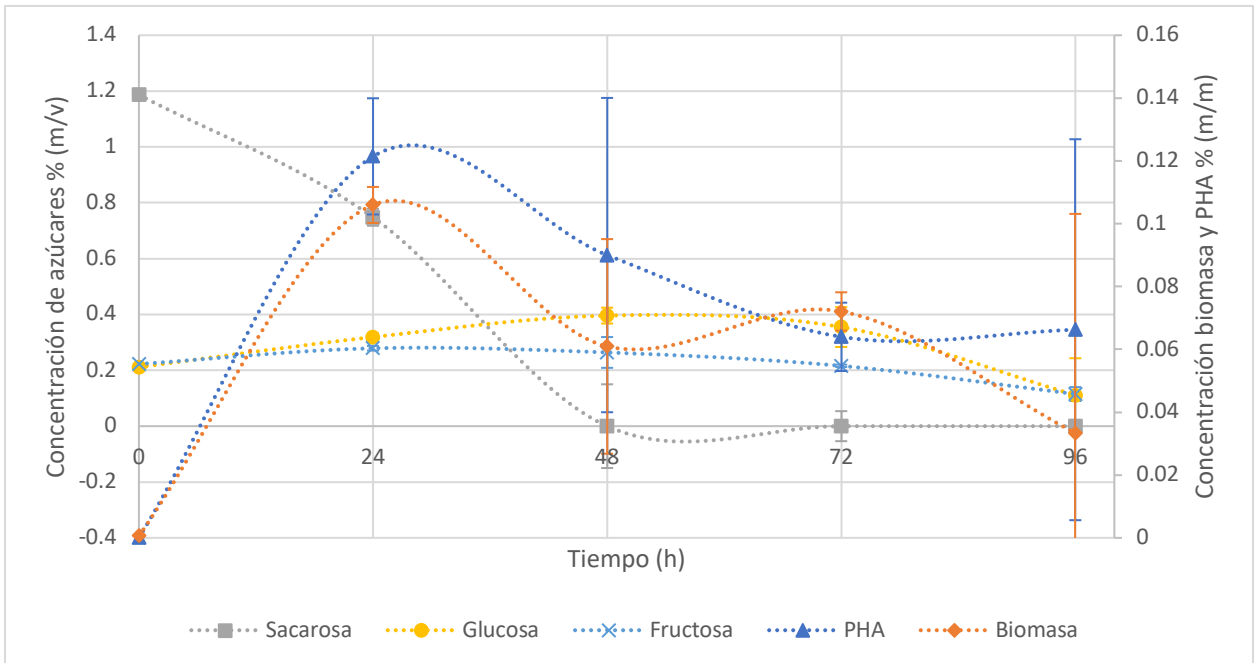


Figura 35. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus subtilis* a 35 °C

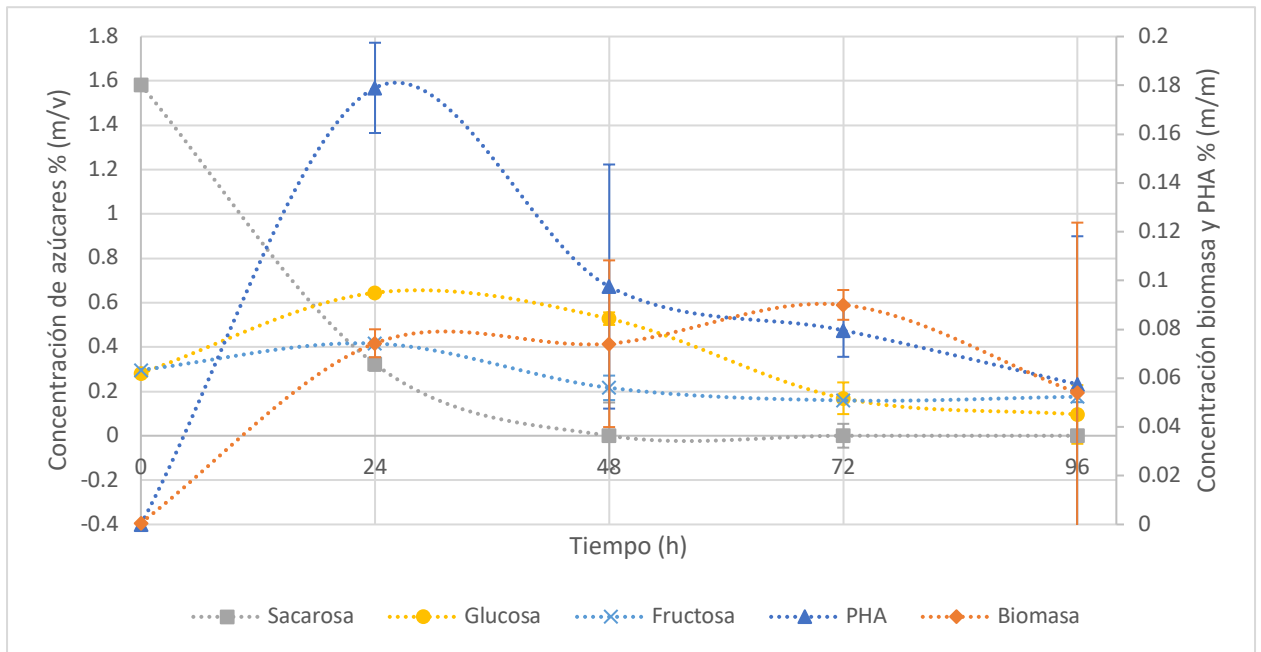


Figura 36. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 1% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus subtilis* a 35 °C

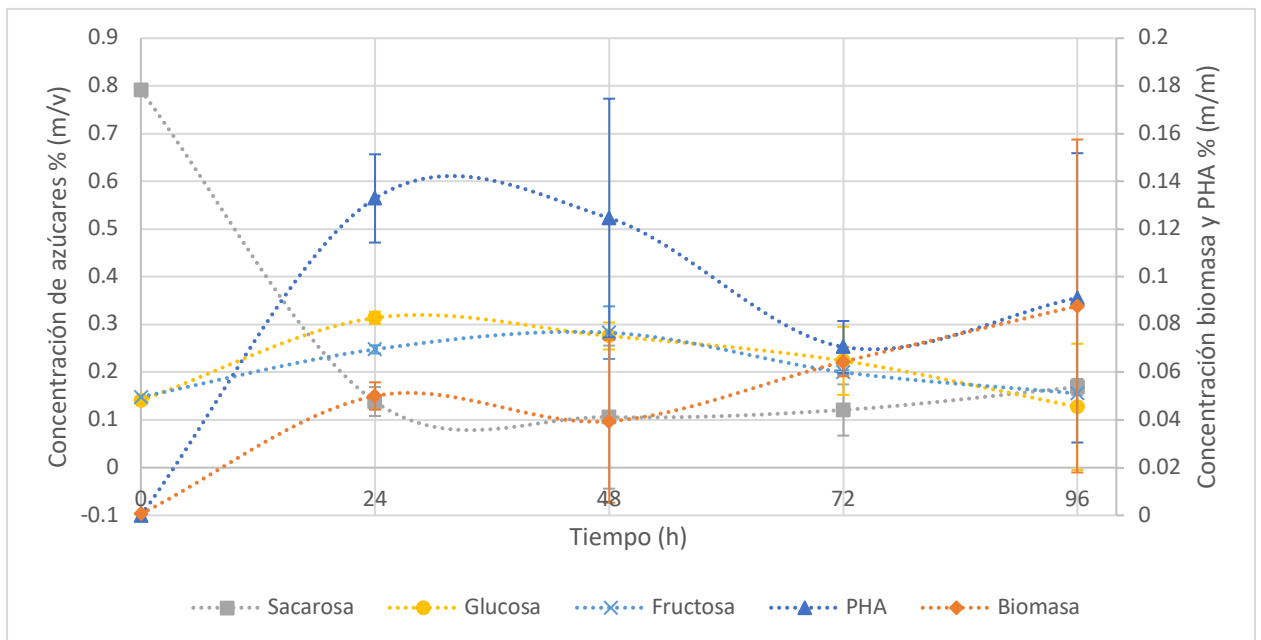


Figura 37. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus subtilis* a 35 °C

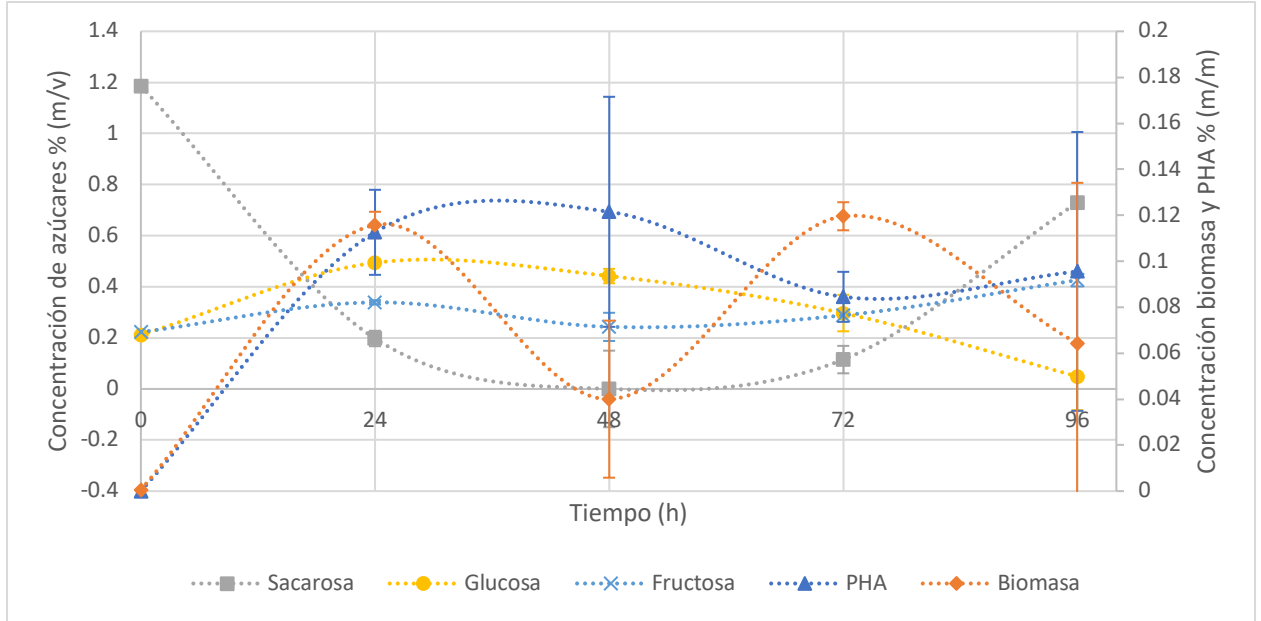


Figura 38. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus subtilis* a 35 °C

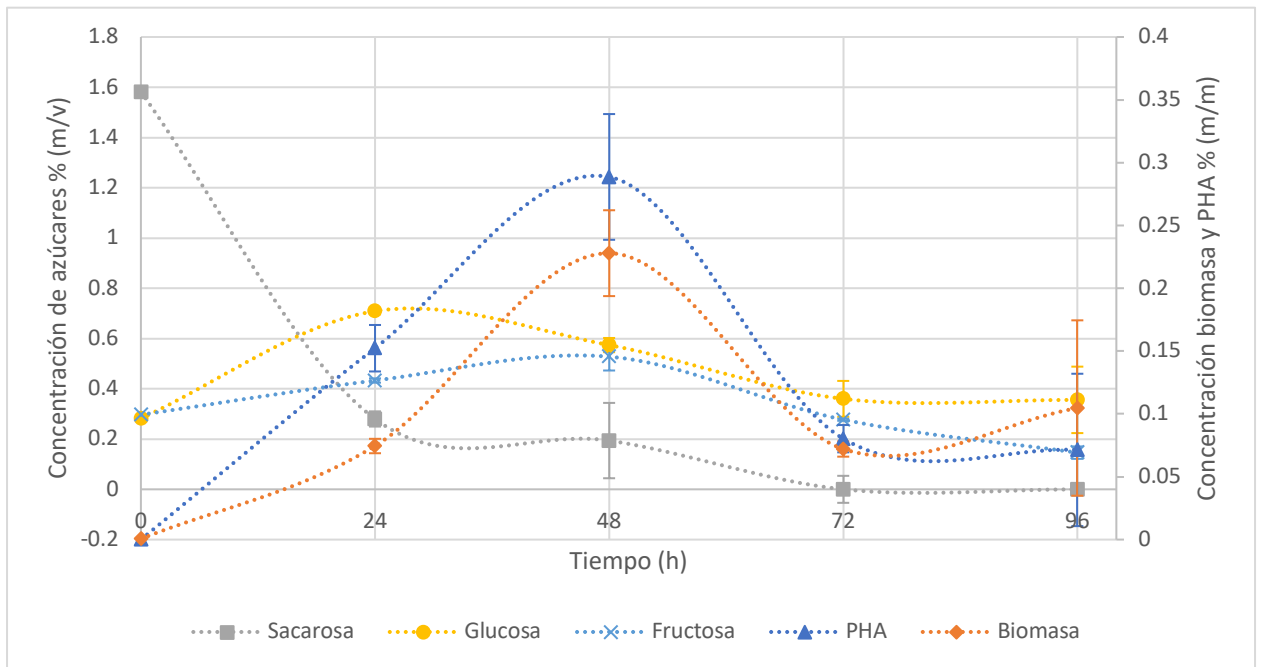


Figura 39. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 2% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus subtilis* a 35 °C

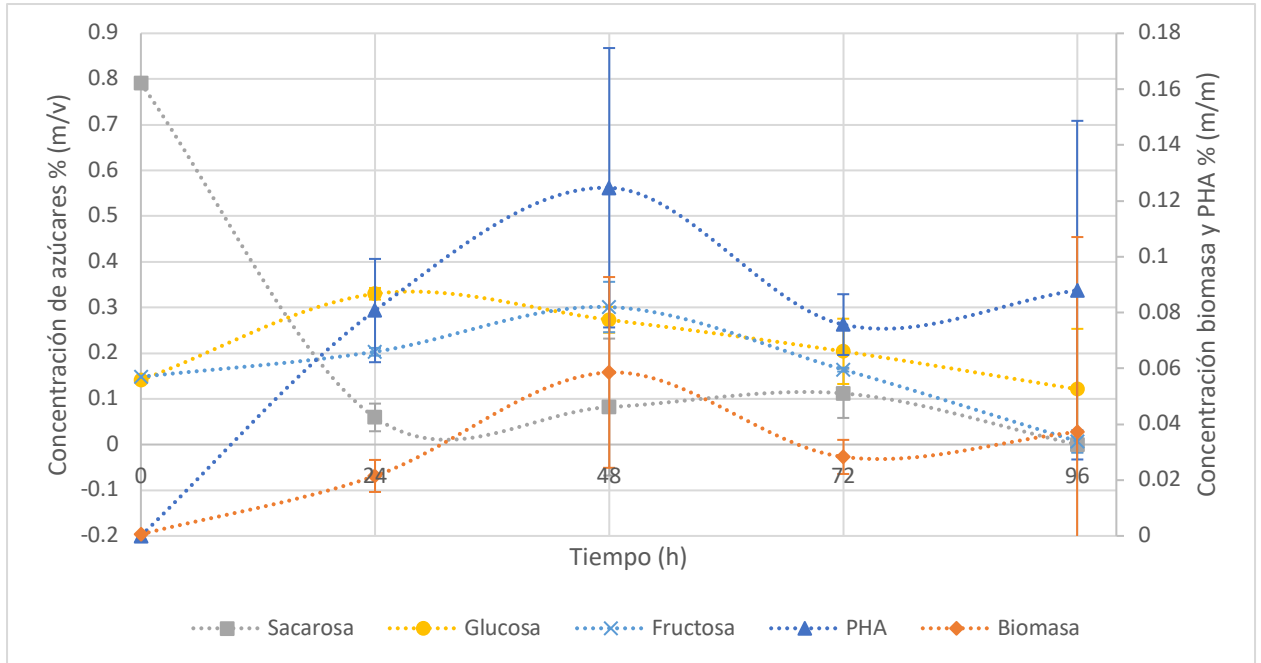


Figura 40. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus subtilis* a 35 °C

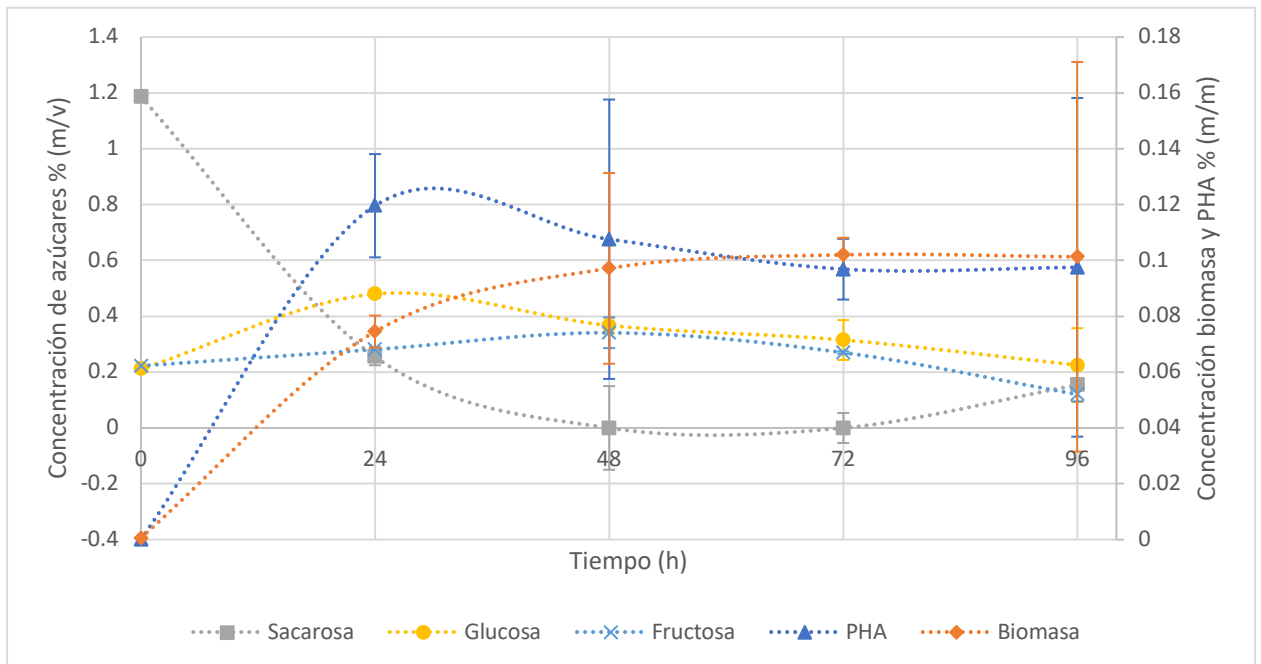


Figura 41. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 3% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus subtilis* a 35 °C

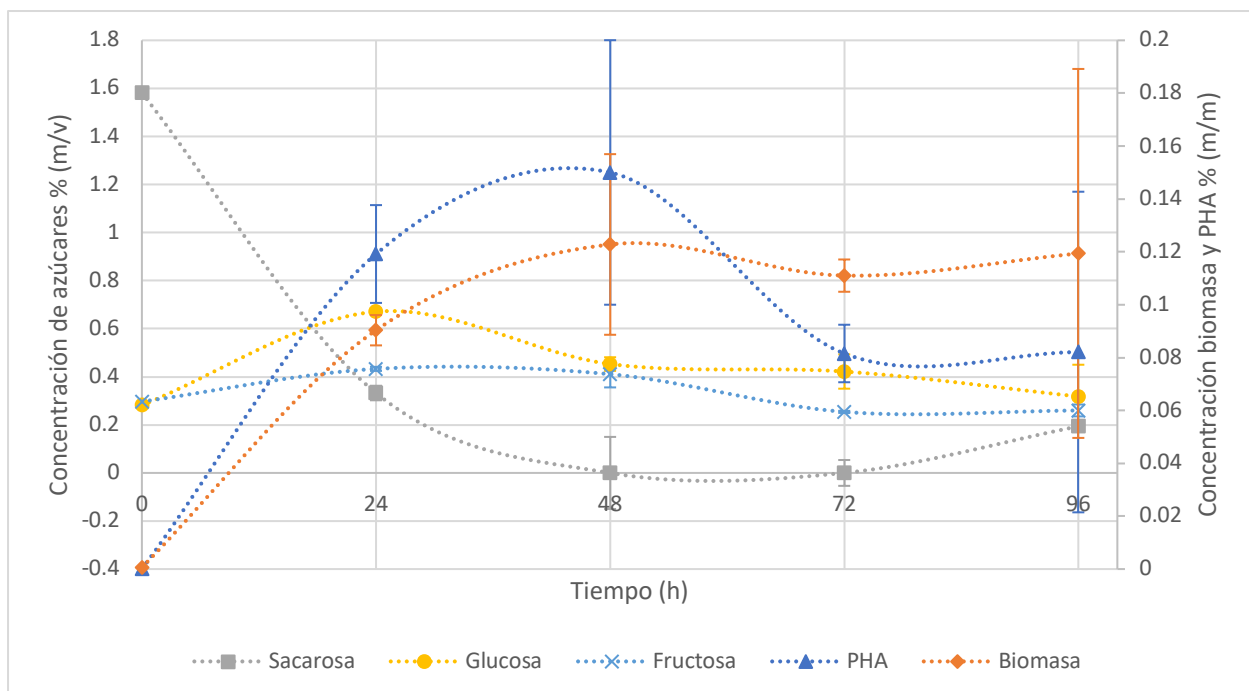


Figura 42. Concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo para la muestra que contiene 3% (v/v) de la solución madre de sales y 4% (m/v) de melaza en la fermentación con *Bacillus subtilis* a 35 °C

Cuadro 12. Rendimientos de polihidroxicarboxilatos respecto al consumo de azúcares totales en función del tiempo para las fermentaciones con *Bacillus subtilis* a 35°C<sup>1</sup>

Nombre de la combinación	Rendimiento <sup>2</sup> a las 24 horas (%m/m)	Rendimiento <sup>2</sup> a las 48 horas (%m/m)	Rendimiento <sup>2</sup> a las 72 horas (%m/m)	Rendimiento <sup>2</sup> a las 96 horas (%m/m)
S1M2	<b>0.333±0.001</b>	0.262±0.003	0.242±0.001	0.235±0.001
S1M3	<b>0.442±0.001</b>	0.094±0.003	0.061±0.001	0.048±0.001
S1M4	<b>0.230±0.001</b>	0.069±0.003	0.043±0.001	0.030±0.001
S2M2	0.411±0.001	<b>0.551±0.003</b>	0.137±0.001	0.184±0.001
S2M3	0.191±0.001	0.130±0.003	0.092±0.001	<b>0.230±0.001</b>
S2M4	0.206±0.001	<b>0.334±0.003</b>	0.053±0.001	0.043±0.001
S3M2	0.165±0.001	<b>0.294±0.003</b>	0.126±0.001	0.092±0.001
S3M3	<b>0.198±0.001</b>	0.118±0.003	0.094±0.001	0.087±0.001
S3M4	<b>0.165±0.001</b>	0.116±0.003	0.055±0.001	0.059±0.001

<sup>1</sup> Datos analizados utilizando la técnica de peso seco de acuerdo con el cálculo 16.

<sup>2</sup> Se encuentran en negrillas los mayores rendimientos en el tiempo de fermentación para cada combinación.

## D. Análisis FTIR

*Cuadro 13. Picos de porcentaje de transmitancia en función de longitud de onda Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de Bacillus cereus*

<b>Grupo<sup>1</sup></b>	<b>Presencia en el espectro<sup>1</sup></b>	<b>Longitud de onda<sup>2</sup> (cm<sup>-1</sup>)</b>
O-H	Sí	3368.56
C-H	Sí	2918.83
C=O	Sí	1635.96
CH <sub>3</sub>	Sí	1408.36
Ácido glucónico, ácido manurónico y ácido urónico	Sí	1021.31

<sup>1</sup> Según los grupos y longitudes de onda presentados en Zakaria 2014

<sup>2</sup> Datos obtenidos a partir de un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier PerkinElmer a una longitud de onda de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

*Cuadro 14. Picos de porcentaje de transmitancia en función de longitud de onda Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de Pseudomona putida*

<b>Grupo<sup>1</sup></b>	<b>Presencia en el espectro<sup>1</sup></b>	<b>Longitud de onda<sup>2</sup> (cm<sup>-1</sup>)</b>
O-H	Sí	3380.07
C-H	Sí	2919.18
C=O	Sí	1636.95
CH <sub>3</sub>	Sí	1411.94
Ácido glucónico, ácido manurónico y ácido urónico	Sí	1055.77

<sup>1</sup> Según los grupos y longitudes de onda presentados en Zakaria 2014

<sup>2</sup> Datos obtenidos a partir de un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier PerkinElmer a una longitud de onda de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

*Cuadro 15. Picos de porcentaje de transmitancia en función de longitud de onda  
Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones  
de Bacillus subtilis*

<b>Grupo<sup>1</sup></b>	<b>Presencia en el espectro<sup>1</sup></b>	<b>Longitud de onda<sup>2</sup> (cm<sup>-1</sup>)</b>
O-H	Si	3370.12
C-H	Si	2922.36
C=O	Si	1638.66
CH <sub>3</sub>	Si	1411.09
Ácido glucónico, ácido manurónico y ácido urónico	Si	1015.66

<sup>1</sup> Según los grupos y longitudes de onda presentados en Zakaria 2014

<sup>2</sup> Datos obtenidos a partir de un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier PerkinElmer a una longitud de onda de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

## VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El objetivo principal de este trabajo de graduación era evaluar tres cepas para la producción de polihidroxicanoatos a escala laboratorio utilizando melaza como fuente de azúcares para comparar su rendimiento de producción. Para esto inicialmente se analizó la melaza a utilizar, con análisis de sus características fisicoquímicas y composición de azúcares. Después se evaluó el efecto en el rendimiento de PHA de los parámetros de concentración inicial de melaza y de sales en el medio fermentativo a escala laboratorio. Para cada fermentación se cuantificó la concentración de células, azúcares y polihidroxicanoatos en función del tiempo.

El primer objetivo de este trabajo era determinar la concentración de azúcares y propiedades físicas de la melaza utilizando técnicas analíticas para definir los componentes que se utilizarán en la preparación de los medios de cultivo. Las propiedades físicas analizadas fueron: el pH, la densidad, viscosidad, sólidos disueltos a partir de grados Brix y porcentaje de compuestos volátiles en la melaza utilizada en la fermentación. Así mismo, se analizó la composición de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa que posteriormente fueron la fuente de carbono durante la fermentación.

Se obtuvo que el pH promedio de la melaza utilizada era de 5.09 a 25 °C, con una desviación estándar de 0.06. Esta medición se realizó utilizando un potenciómetro digital, calibrado con soluciones buffer estándar, a partir de una disolución 0.1 g/mL. Este valor se encuentra dentro del rango de 5 a 7 en el que usualmente se encuentra la melaza según Clark 1993. Como se puede observar, el valor obtenido es más cercano al límite inferior del rango anterior lo que indica un alto grado de acidez en la melaza utilizada. Esto indica que, posiblemente, en el proceso de clarificación, durante el tratamiento de las mieles de caña en el procesamiento del ingenio azucarero, no se generó un aumento de pH hasta neutralizar los ácidos orgánicos; la teoría indica que los ácidos principalmente serían el aconítico, málico y cítrico. Así mismo, se puede inferir una concentración elevada de estos ácidos en la melaza utilizada, principalmente de ácido aconítico, ya que, según Clark 1993, este se presenta en mayor concentración que el resto de los ácidos en las mieles de azúcar

de caña. Si la acidez de la melaza se encontrara debajo del rango mencionado podría propiciar la hidrolización de la sacarosa en glucosa y fructosa, especialmente a las altas temperaturas que se maneja durante los procesos de evaporación durante la cristalización en el ingenio azucarero. Del resultado obtenido se puede observar que la desviación estándar es dos ordenes de magnitud menor que el valor de la medición lo que indica una precisión en el método de medición.

Se encontró que la densidad de la melaza era 1.28 kg/L a 30 °C, con una desviación estándar de 0.01 kg/L. La densidad teórica de la melaza se encuentra dentro de un rango de 1.30 a 1.46 kg/L a una temperatura de 15 °C. El valor obtenido a partir de la medición se encuentra ligeramente debajo de este rango, sin embargo, esta propiedad física tiene una relación inversa con la temperatura y dado que la medición se realizó a una mayor temperatura que la referencia teórica, se espera que la densidad sea más baja. Aún así la densidad obtenida se encuentra dentro de la sección baja del rango de densidad para la melaza. Esto puede ser consecuencia de una baja concentración de ceniza en la melaza, uno de componentes más comunes en esta sustancia que tienen una concentración usual de 7% a 15% m/m y que en este trabajo no fueron analizados.

Se recomienda entonces cuantificar óxido de potasio, óxido de calcio, óxido de magnesio, óxido de sodio, trióxido de azufre, cloruros, óxido de fósforo (V) y silicatos, que son los componentes que conforman la ceniza de la melaza. En cuanto a la precisión de la medición, se puede observar, de nuevo, que la desviación estándar es dos órdenes de magnitud menor en comparación con la densidad obtenida, lo cual indica precisión y repetitividad del valor obtenido con la técnica utilizada.

La viscosidad encontrada de melaza es de 300.03 St a una temperatura de 30 °C con una desviación estándar de 25.40 St. Este valor supera la viscosidad de la melaza grado C, según la clasificación de USDA que tiene una viscosidad promedio de 150 St a 37.78 °C. A pesar de esto se sabe que la viscosidad de la melaza puede variar, incluso en ordenes de magnitud, de acuerdo con su composición inorgánica y de polisacáridos y posee una alta dependencia a la temperatura. La temperatura de la medición es menor a la temperatura de

la viscosidad de referencia, por lo que es lógico que la viscosidad obtenida sea mayor, considerando la relación inversa entre las variables de temperatura y viscosidad. Además, se sabe que la melaza no es un fluido newtoniano por lo cual la viscosidad es dependiente del esfuerzo cortante que se realiza durante su medición. Al utilizar las copas de Zahn el esfuerzo cortante es bajo considerando que es consecuencia de las fuerzas gravitacionales que generan una pequeña cantidad del fluido. Tomando en cuenta que la melaza es un fluido pseudoplástico, las variaciones de la proporcionalidad entre la tensión de corte y el gradiente de velocidad, y por consiguiente de la viscosidad, son bastante altas para bajas tensiones de corte. Este efecto aumenta conforme se vacía la copa. Al trabajar en la región baja de la curva tensión de corte en función de gradiente de velocidad para un fluido pseudoplástico se obtiene una derivada no solo cambiante, sino que también mucho más alta que para la zona en donde tiene una tendencia más proporcional entre estas dos variables. Considerando la naturaleza del fluido, se recomienda entonces medir las características reológicas del fluido para diferentes esfuerzos cortantes utilizando un reómetro.

Otro factor que pudo afectar el resultado es el cambio de temperatura durante la medición, ya que mientras se vaciaba la copa, el fluido estaba entrando en equilibrio térmico con el ambiente y considerando que la viscosidad es altamente sensible a la temperatura pudieron generarse variaciones significativas en la medición. Por lo anterior se recomienda hacer la medición de forma isotérmica utilizando un baño termostático. Para la desviación estándar se obtuvo un valor con un orden de magnitud menor a la viscosidad obtenida. Las causas de esta desviación son principalmente los cambios de temperatura en el ambiente durante las mediciones y la heterogeneidad del fluido. Otra fuente de error fue la extrapolación del modelo que relaciona el tiempo con la viscosidad para el método utilizado, ya que el modelo original fue calculado para un rango de tiempo de 0 a 60 segundos, mientras que el tiempo de vaciado de la copa tomó 1274 segundos en promedio.

En cuanto a los sólidos disueltos en la melaza, se determinó que esta poseía 83.4 °Bx con una desviación estándar de 0.3 °Bx. Este valor se encuentra dentro de lo esperado para esta miel residual, lo cual debe de ser de mayor o igual a 80 °Bx y cumple con el límite

mínimo establecido por la USDA para cualquier grado de melaza el cual es de 78.5 ° Bx. Aunque entre los sólidos disueltos se incluyen los azúcares de la miel, esto no solamente puede significar un alto contenido de azúcares, sino que representa otros sólidos cuya concentración se fue aumentando durante los procesos de cristalización en el ingenio. Es por eso por lo que las mieles vírgenes poseen, usualmente, un valor menor de grados Brix que la melaza. Además, otras sustancias presentes en la medición como alcoholes y ácidos orgánicos pueden afectar la refracción lumínica en el análisis. Es por esto por lo que la medición de los grados Brix es un método limitado y solo se utiliza como una forma rápida de caracterización comúnmente utilizada en la industria azucarera. A pesar de esto, se obtuvo repetitividad y precisión del resultado al contar con una desviación estándar dos grados de magnitud más baja que el valor de sólidos disueltos.

Se determinó una composición de 13.45% (m/m) de compuestos volátiles en la melaza con una desviación estándar de 0.71% (m/m). Los compuestos volátiles que posee la melaza incluyen principalmente agua, con un porcentaje 17% al 25% (m/m), más ácidos orgánicos volátiles que conforman del 2% al 7.5% (m/m) de la melaza. En total se espera entonces que los compuestos volátiles estén dentro de un rango de 19% a 32.5% (m/m). Sin embargo, el valor obtenido se encuentra 5.55% por debajo del límite inferior del rango. Esto es debido a que, durante la medición en la balanza de humedad, se seca inicialmente la superficie de la muestra formando una capa de cristalización que ocluye la evaporación de la humedad interna de la muestra, impidiendo un correcto secado. Este efecto se mitigaba al aumentar el área superficial de secado de la muestra y disminuir el volumen de esta. La desviación estándar obtenida fue dos grados de magnitud menor que el valor encontrado, ya que la distribución de la muestra en el plato de secado afecta la cantidad de compuestos volátiles que se logran evaporar en el ciclo de secado. Se recomienda realizar esta prueba con volúmenes muy pequeños de muestra distribuidos en el plato para alcanzar la mayor área de secado en el mismo.

Con respecto a la concentración de azúcares, se encontró que la concentración de sacarosa en la melaza es de 39.55% (m/m) con una desviación estándar de 0.09% (m/m). El rango de sacarosa esperado para la melaza es de 30% a 40% (m/m). El valor obtenido se

encuentra dentro de este rango, cercano al límite superior. Esto significa que la miel residual del ingenio es rica en sacarosa dentro de los rangos normales para la melaza, lo que es consecuencia de los esfuerzos realizados en Guatemala para obtener un alto contenido de sacarosa en las mieles de caña, evidenciado por el hecho que el país cuenta con el tercer lugar en productividad en toneladas de azúcar por hectárea a nivel mundial, según AZASGUA 2020. En cuanto a la fructosa, se obtuvo una concentración porcentual de 7.417% (m/m) con una desviación estándar de 0.275% (m/m). Como era de esperarse, de acuerdo con lo reportado en la literatura, la concentración de fructosa es menor a la sacarosa para la miel derivada de azúcar de caña. El valor obtenido se encuentra dentro del rango esperado para la concentración de fructosa en melaza, el cual es de 5% a 12% (m/m). Por último, el porcentaje de glucosa encontrado en la melaza fue de 7.051% (m/m) con una desviación estándar de 0.072% (m/m). De igual forma, como era esperado, de acuerdo con lo reportado en la literatura, la concentración de glucosa fue la menor de los tres azúcares evaluados, estando dentro del rango normal para esta especie en melaza, el cual es de 4% a 9% (m/m). Aunque los tres azúcares están dentro de los valores comunes para la melaza, la sacarosa se encuentra cercana al límite superior mientras que los monosacáridos están en valores medios de lo esperado. A partir de esto, se puede inferir que posiblemente la caña de azúcar fue cosechada en momento preciso de madurez de la planta donde el almacenamiento de energía de la planta es mayor que la energía de fácil acceso para sus funciones metabólicas y que probablemente durante el proceso de producción de azúcar de mesa no hubo hidrolización de la sacarosa. Esto último es importante considerando que el pH encontrado en la melaza está dentro del rango esperado para esta sustancia, pero cercano al límite inferior. Sin embargo, se ha encontrado que las sales presentes en la melaza contribuyen a su capacidad buffer, lo que previene la hidrolización de melaza por disminuciones del pH fuera del rango común. Esto es conveniente para la industria manufacturera de azúcar, pero inconveniente para el uso de melaza en la fermentación, ya que el microorganismo fermentativo tiene una mayor facilidad de metabolizar monosacáridos y se encuentra con la dificultad añadida de hidrolizar la sacarosa para consumo de sustrato. En otras palabras, debido a que la melaza utilizada es más rica en sacarosa que en glucosa y fructosa, el consumo de sustrato requerirá una ruta metabólica más prolongada a la célula que si la melaza tuviera mayor contenido, dentro los rangos

comunes, de fructosa y glucosa debido a hidrolización en el procesamiento de azúcar. En cuanto a los azúcares totales, según The Association of American Feed Control este valor no debería de ser menor a 46% (m/m) y el total de azúcares de la melaza utilizada es de 54.02% (m/m), por lo que se puede decir que la melaza utilizada es efectiva como fuente de carbono durante la fermentación.

El segundo objetivo de este trabajo de graduación era determinar el efecto que tiene la concentración inicial de melaza y sales en el medio fermentativo sobre el rendimiento de PHA utilizando sistemas a escala laboratorio. Las concentraciones de melaza analizadas fueron 2%, 3%, 4%, (m/v) las cuales fueron evaluadas en combinaciones con concentraciones de 1%, 2%, 3% (v/v) de una solución concentrada de sales cuyos componentes y concentraciones se encuentran especificados en el Cuadro 3. Esto se realizó de la misma manera para cada cepa.

De acuerdo con varias investigaciones previas a este trabajo de graduación, la concentración inicial de melaza que genera una mayor producción de polihidroxialcanoatos es de 3% (m/v) en diferentes cepas. Considerando que la composición de glucosa, fructosa y sacarosa de la melaza utilizada y utilizada en la fermentación se encuentra dentro de los rangos normales, se decidió utilizar el valor máximo de producción según la literatura para la melaza. A partir de esto se realizó la formulación de los medios fermentativos descrita en el Cuadro 9, evaluando la concentración inicial de melaza correspondiente a 2%, 3% y 4% (m/v). Se seleccionó una variación de 1% (m/v), respecto a la concentración que genera una máxima producción de polihidroxialcanoatos de acuerdo con lo reportado en literatura, ya que se ha encontrado que la producción de PHA por las cepas es muy sensible al parámetro de concentración inicial de sustrato.

Como se observa en las figuras 13 y 14, para la cepa *Bacillus Cereus*, las combinaciones con una concentración de 1% (v/v) de sales generaron los menores rendimientos y producción de PHA, de las tres concentraciones analizadas. Esto puede ser consecuencia de que, aunque la insuficiencia de nutrientes promueve la producción de PHA, cuando se da al extremo impide el crecimiento y división celular lo que a su vez

genera que existan menos células capaces de generar y almacenar PHA. Principalmente las limitaciones de nitrógeno generan deficiencias en la duplicación del material genético, la generación de proteínas y por consiguiente la limitación de la actividad enzimática. Asimismo, las limitaciones en azufre intervienen en la generación de ciertas coenzimas, incluyendo la CoA la cual es fundamental en el ciclo metabólico de la célula para la conversión de la fuente de carbono en polihidroxicanoatos. En cuanto a los rendimientos, a pesar de que se reduce el consumo de sustrato, esto no compensa la disminución en la producción de polihidroxicanoatos siendo los rendimientos para las combinaciones de 1% (v/v) de sales menores que sus combinaciones análogas con 2% y 3% (v/v) de sales.

Para la cepa *Bacillus cereus*, se encontró que el porcentaje de melaza que generaba mayor producción y rendimiento de PHA era el 2% (m/v). Usualmente para esta cepa se ha encontrado que el porcentaje de melaza que tenía mayor rendimiento es de 3% (m/v), sin embargo, como se evaluó anteriormente la cantidad de azúcares totales en la melaza utilizada superaba el límite mínimo esperado para esta sustancia. Esto indica que la producción de polihidroxicanoatos en *Bacillus Cereus* es sensible a las variaciones en la concentración de azúcares en la melaza, que a su vez es consecuencia del procesamiento de las mieles en los ingenios azucareros, de esto se deriva la importancia del análisis de la melaza previo a la preparación de los medios de cultivo. Para las concentraciones mayores de azúcar, pudo haberse generado un envenenamiento al microorganismo por exceso por sustrato que limitó la cantidad de PHA que se obtuvo de estas pruebas.

Para los datos de *Bacillus cereus*, el resultado de mayor importancia en las figuras 13 y 14 es la combinación de parámetros a la cual se obtiene un mayor rendimiento en polihidroxicanoatos, la cual corresponde al 2% (m/v) de melaza y 3% (v/v) de la solución concentrada de sales alcanzando una producción  $0.7045 \pm 0.1084\%$  (m/m) de polihidroxicanoatos y un rendimiento  $0.858 \pm 0.001\%$  (m/m). La producción de esta combinación es 63% más grande que la combinación con la segunda mayor producción de PHA, la cual corresponde a 2% (m/v) de melaza y 2% (v/v) de la solución concentrada de sales, cuya mayor concentración de polihidroxicanoatos fue de  $0.4409 \pm 0.1084\%$  (m/m) con un rendimiento de  $0.780 \pm 0.002\%$  (m/m).

Por otro lado, las barras naranjas de las figuras 13 y 14 muestran la producción máxima de polihidroxicanoatos y su rendimiento respecto al sustrato para las combinaciones de las formulaciones para la cepa *Pseudomona putida*. Todas las combinaciones muestran concentraciones máximas de PHA menores que la cepa anterior, ya que con esta cepa no se logro aumentar la concentración del polímero con el incremento de nutrientes. Sin embargo, cuando se observa el rendimiento, para las todas las combinaciones con 1% (v/v) de sales se obtuvieron mayores rendimientos que con la cepa *Bacillus cereus*, lo que indica que para estas condiciones requiere menos sustrato para producir PHA. A partir de esto se puede establecer que las bajas concentraciones de sales no afectaron la concentración de polihidroxicanoatos por deficiencias en el crecimiento de la población de microorganismos o en división celular en las fermentaciones de *Pseudomona putida*. Además, para las combinaciones con una concentración de 1% de solución de sales, se observa el comportamiento esperado, ya que, al limitarse los nutrientes en el medio fermentativo, se genera más polihidroxicanoatos conforme aumenta la concentración de sustrato. Esto ocurre ya que la limitación de nitrógeno expone a la cepa *Pseudomona putida* a un estado de estrés, que, al tener un exceso de fuentes de carbono, promueve la ruta metabólica de producción de PHA y almacenamiento intracelular del polímero para su uso posterior como fuente de energía. Este comportamiento no se iguala en el rendimiento, ya que este aumenta para la concentración de 3% (m/v) de melaza y vuelve a reducirse para la concentración de 4% (m/v) de melaza, consumiendo más sustrato por masa de PHA producido, en este último.

Para las combinaciones con 2% de soluciones de sales se observa un comportamiento similar, en cuanto a la producción de PHA. Se puede observar que las combinaciones de 3% y 4% de melaza son mayores a la de 2% de melaza. A pesar de que la combinación de 3% melaza es ligeramente mayor a la de 4%, estas son similares entre sí y considerando la incertidumbre de los valores, no tiene una diferencia significativa. En cuanto a los rendimientos, los tres son muy similares entre sí para las combinaciones con 2% de la solución de sales, lo que quiere decir que las diferencias en producción se compensan con el aumento en el consumo de sustrato.

Se encontró que para la cepa *Pseudomona putida* la combinación con mayor producción de polihidroxicanoatos fue 2% (m/v) de melaza y 3% (v/v) de la solución concentrada de sales, que corresponde a la misma combinación con la que se logró la máxima producción en la cepa *Bacillus Cereus*. Como muestra la Figura 13 la máxima concentración de polihidroxicanoatos alcanzada para esta combinación fue de  $0.1734 \pm 0.0069\%$  (m/m). Seguida por la combinación de mayor limitación de nutrientes con 1% (v/v) de solución de sales y mayor concentración de melaza, 4% (m/v), con una producción de PHA de  $0.1397 \pm 0.0186\%$  (m/m). Sin embargo, como se observa en la figura 14, la combinación de mayor rendimiento de fue polihidroxicanoatos 1% (v/v) de sales y 3% (m/v) de melaza con un rendimiento de  $0.551 \pm 0.004\%$  (m/m); que en la figura 13 no destaca por su alta producción de PHA, pero si por su bajo consumo de sustrato para la producción del polímero. Seguido de esta combinación, por rendimiento, se encuentra la fermentación con 2% (m/v) de melaza y 3% (v/v), la cual era la máxima en producción y tiene un rendimiento de  $0.544 \pm 0.001\%$  (m/m), cercano a la combinación con máximo rendimiento. Esto hace necesario que al escalar la producción se evalúen estas dos opciones involucrando factores de costo de melaza y precio de PHA para determinar cuál es más conveniente, ya que a pesar de que la combinación 2% (m/v) de melaza y 3% (v/v) tiene un rendimiento ligeramente menor se espera que su mayor producción de polihidroxicanoatos haga más rentable el proceso considerando que el precio del polímero es mayor al costo de la melaza. Para poder generar una comparación de la factibilidad económica de las combinaciones, con la finalidad del escalamiento del proceso, se recomienda agregar un factor de la razón de precio polímero sobre costo melaza al rendimiento para seleccionar la combinación más favorable a nivel económico.

La Figura 13 compara la concentración máxima de polihidroxicanoatos producidos por *Bacillus subtilis* para las combinaciones de los parámetros de melaza y sales analizadas. Como se puede observar, las concentraciones máximas de PHA obtenido para las combinaciones con 2% (m/v) de melaza, son muy similares para las concentraciones de sales de 1% y 2% (v/v). Este mismo efecto se observa para las combinaciones con 3% (m/v) de melaza, también para las pruebas con 1% y 2% (v/v) de la solución de sales. De

esto se deriva, que para *Bacillus subtilis* el efecto de modificar la concentración de sales del 1% al 2% es despreciable en cuanto a producción de polihidroxicanoatos para concentraciones de melaza de 2% y 3% (m/v). Sin embargo, sí se observan cambios en el rendimiento para estas condiciones. Para las combinaciones de 2% (m/v) de melaza, se obtiene mayor rendimiento y menor consumo de sustrato para la combinación con 2% (v/v) de sales que la de 1% (v/v) y para la combinación de 3% (m/v) de melaza se obtiene mayor rendimiento con las soluciones de 1% (v/v) de sales que la de 2% (v/v). Esto podría ser consecuencia que diferentes combinaciones de sustrato-nutrientes promueven diferentes rutas metabólicas en la célula. Por otro lado, se puede observar que al aumentar la concentración de sales al 3% (v/v), la producción de polihidroxicanoatos y el rendimiento se reduce para todas las combinaciones de melaza. Esto es debido a que se reduce el efecto de nutrientes limitantes que promueven el ciclo metabólico encargado producir PHA intracelular.

En cuanto al efecto de la concentración de melaza en la producción de polihidroxicanoatos por *Bacillus subtilis*, se puede observar que para las tres combinaciones de sales analizadas se obtuvo una mayor producción de PHA cuando la concentración de melaza era la máxima, la cual es de 4%. Esto es debido a que la producción de polihidroxicanoatos es una forma de almacenamiento de energía que se realiza cuando existe en el medio un exceso de azúcares o fuentes de carbono que no utilizará la célula de forma inmediata. Además, se puede apreciar que esta cepa requiere una mayor concentración de azúcares para la producción de PHA que las cepas *Pseudomonas putida* y *Bacillus cereus*. Sin embargo, aunque se genere mayor producción de polihidroxicanoatos, se reduce el rendimiento al haber un mayor consumo de sustrato.

La combinación de parámetros que generó la mayor producción de polihidroxicanoatos para *Bacillus subtilis* fue 2% de la solución concentrada de sales y 4% de melaza obteniendo una concentración máxima de PHA de  $0.2886 \pm 0.0500\%$  (m/m). Al contrario de lo observado con las concentraciones de melaza de 2% y 3%, el efecto aumento de sales para 4% es pronunciado ya que la producción de polihidroxicanoatos es 1.6 mayor con 2% que con 1% de la solución concentrada de sales. En la combinación

con 1% de sales y 4% de melaza, que es la segunda en producción de PHA para *Bacillus subtilis* con una concentración de  $0.1790 \pm 0.0109\%$  (m/m) de polihidroxialcanoatos, la baja concentración de nutrientes limita el ciclo metabólico de producción de PHA en relación para una concentración alta de fuentes de carbono. Sin embargo, la combinación con mayor rendimiento fue 1% de la solución concentrada de sales y 3% de melaza con  $0.442 \pm 0.001\%$  (m/m), la cual es la penúltima en cantidad de producida de polihidroxialcanoatos, pero posee un bajo consumo de sustratos. Esta combinación es también con la que se obtiene un mayor rendimiento con la cepa *Pseudomona putida* y corresponde a la concentración de melaza con la que se han obtenido los mejores rendimientos en investigaciones previas y la mayor limitación de nutrientes en el medio.

Al comparar los rendimientos de cada cepa se observa que *Bacillus cereus* supera a las demás cepas. Aunque *Bacillus subtilis* alcanza mayores concentraciones de polihidroxialcanoatos que *Pseudomona putida*, esta última posee mayores rendimientos que *Bacillus subtilis*. Esto es probablemente generado por una predisposición genética que hace que *Bacillus subtilis* consuma más azúcares en la ruta metabólica de producción de PHA. Como se observa en la Figura 13 *Pseudomona putida* produce menor cantidad polihidroxialcanoatos, pero, de acuerdo con la información de la Figura 14, requiere muy pocos azúcares para producirlo, no obstante, no es lo suficiente para superar en rendimiento a *Bacillus cereus* con su alta producción, en comparación al resto. La productividad de la de la generación de PHA puede ser evaluada a partir de los rendimientos, los cuales son un factor de escalamiento, que en procesos posteriores podrán utilizarse para evaluar condiciones fermentativas y realizar el balance de masa del proceso a escalar.

Por otro lado, la Figura 15 compara la concentración de polihidroxialcanoatos en el tiempo de fermentación de las combinaciones con mayor producción de este polímero para cada cepa analizada. Es evidente que, a partir de las 72 horas de fermentación, la concentración de PHA por la cepa *Bacillus cereus* supera la producción de polihidroxialcanoatos por parte de las cepas *Bacillus subtilis* y *Pseudomona putida*. El punto máximo de concentración de PHA de *Bacillus cereus* se da a las 96 horas de fermentación, obteniendo una concentración 2.4 veces mayor que la máxima concentración

de PHA de la cepa *Bacillus subtilis* y 4 veces mayor que la de *Pseudomona putida*. A partir de esto se puede concluir que la cepa con la que se logra una mayor producción de polihidroxicanoatos es *Bacillus cereus*. Esto es posiblemente debido a que las condiciones genéticas de esta cepa hacen que las limitaciones de nutrientes en el medio fermentativo promuevan la ruta metabólica de producción de PHA.

La siguiente cepa, en cuanto a rendimiento de la producción de PHA es *Bacillus subtilis*, que en las primeras 48 horas de fermentación supera la producción de las otras dos cepas, llegando en este momento a su punto máximo y luego reduciendo la concentración de polihidroxicanoatos en el tiempo. Esto quiere decir que una vez empieza a agotarse el sustrato en el medio, las células de *Bacillus subtilis* empezaron a consumir el PHA que produjeron como fuente de energía. La concentración máxima alcanzada por esta cepa es 1.7 veces la concentración máxima alcanzada por la cepa *Pseudomona putida*. Este valor es menor del que supera *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*.

La cepa *Pseudomona putida* tiene la menor producción máxima de polihidroxicanoatos de las tres cepas analizadas. A las 24 horas de fermentación su concentración de PHA mayor que la de *Bacillus cereus*, pero a partir obtuvo la menor concentración teniendo la velocidad de producción más constante de las tres cepas. Al igual que *Bacillus cereus*, *Pseudomona putida* alcanza su mayor concentración de polihidroxicanoatos a las 96 horas de fermentación.

Si se evaluara qué cepa utilizar al escalar la fermentación en un proceso batch, se debe considerar que a pesar de que *Bacillus cereus* alcanza una concentración de polihidroxicanoatos superior que el resto de las cepas, el tiempo de fermentación para alcanzar esta concentración es mayor que para *Bacillus subtilis*. Por lo que para este tipo de escalamiento se recomienda hacer una evaluación económica para comparar el beneficio económico de una mayor producción de polihidroxicanoatos con los costos asociados a una fermentación 48 horas más prolongada.

El tercer objetivo de este trabajo de graduación era cuantificar las concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en función del tiempo, usando técnicas de análisis fisicoquímico para establecer el efecto del tiempo en el rendimiento. La cuantificación de células y polihidroxicarboxilatos se realizó utilizando los métodos de peso seco mientras que la cuantificación de azúcares se hizo utilizando cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción para determinación de sacarosa, glucosa y fructosa. Las temperaturas utilizadas durante la fermentación fueron seleccionadas de acuerdo con la información bibliográfica de esta variable para el mayor crecimiento celular para cada cepa, siendo 35°C *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* y 30°C para *Pseudomonas putida*. La desviación estándar, que se presenta como las líneas de error en cada punto de las fermentaciones fue determinada a partir del análisis de las muestras de una combinación de los parámetros trabajada en duplicado para cada cepa. Con la variación obtenida se generalizó para el resto de las combinaciones de esa cepa.

Las figuras 16 a 24, muestran las concentraciones de células, azúcares y polihidroxicarboxilatos en el medio fermentativo durante las 96 horas de fermentación de *Bacillus cereus*. Se puede apreciar como el contenido de sacarosa supera al inicio de la fermentación el contenido de fructosa y glucosa. Esto es debido a que la melaza es rica en sacarosa de acuerdo con lo establecido en la cuantificación de azúcares del sustrato. Para la mayoría de las fermentaciones, conforme aumenta el tiempo en la fermentación se reduce progresivamente la concentración de sacarosa. En las primeras 24, el cambio en la concentración de este azúcar no es tan grande como la reducción en la concentración que se genera de las 24 a las 48, en la mayoría de las combinaciones. En algunas otras combinaciones ocurre una mayor reducción en sacarosa en las horas 48 a 72, como es el caso de la fermentación con 2% de la solución concentrada de sales y 4% de melaza. Para la glucosa y fructosa se puede observar una reducción en la concentración más lenta en el tiempo que con la sacarosa, al presentarse estas en menor concentración. En algunos casos se puede ver un ligero aumento en estos azúcares conforme se reduce la concentración de sacarosa, que puede ser resultado de la hidrólisis de la sacarosa por medio de la enzima invertasa en la pared celular.

En cuanto al crecimiento celular de las fermentaciones de *Bacillus cereus*, se observa el aumento de la concentración celular a través del tiempo. En la mayoría no se alcanza la fase estacionaria de crecimiento celular en 96 horas de fermentación ya que no llega a obtener concentraciones constantes de células en el tiempo. Excepción a estos son las combinaciones de 1% de sales y 4% de melaza y 3% de sales y 4% de melaza, en donde se alcanza la fase de muerte, ya que se reduce la concentración celular en la hora 96 de fermentación. Se puede apreciar el efecto de las bajas concentraciones de sustrato en células acondicionadas a altas concentraciones iniciales de sustrato.

En cuanto a la producción de polihidroxicanoatos por la cepa *Bacillus cereus* se logra apreciar que la concentración de está aumentando en el tiempo. Para casi todas las fermentaciones con esta cepa alcanzan su mayor concentración a las 96 horas de fermentación y solo se logra observar una disminución de PHA después de las 72 horas de fermentación para las combinaciones de 1% sales con 4% melaza, y 2% sales con 3% melaza. Esto coincide con el crecimiento celular, analizado anteriormente, que, al no llegar la población celular a fase estacionaria debido a limitaciones de sustrato, las células no consumieron los polihidroxicanoatos que almacenaron como fuente de carbono. Además, se observa que para la mayoría de las combinaciones analizadas se logra un aumento mayor en la concentración de PHA de las 48 horas en adelante, lo que indica que la mayor producción de este polímero se genera durante la fase exponencial de crecimiento celular.

Las figuras 25 a 33 muestran las concentraciones de azúcares, células y polihidroxicanoatos durante las fermentaciones utilizando *Pseudomonas putida* como organismo productor. El consumo de sacarosa fue similar al de la cepa anterior siendo casi constante la concentración de este azúcar en las primeras 24 horas. Durante este tiempo se observa una disminución en los monosacáridos para la mayoría de las fermentaciones. Esto es debido a que estos microorganismos poseen mayor afinidad a la glucosa y fructosa, ya que son fuentes de energía inmediata y les toma menos energía utilizarlas en su ciclo metabólico ya que no deben realizar la hidrolización que es necesaria con la sacarosa. A partir de las 24 horas se ve un leve aumento en la glucosa y fructosa del medio, donde justo ocurre la disminución de sacarosa, lo que sugiere que en este momento inicia la

hidrolización del disacárido para la obtención de azúcares consumibles. A partir de las 48 horas se observan concentraciones constantes o en disminución de la glucosa y fructosa.

A diferencia de la cepa anterior, con *Pseudomonas putida* muchas de las combinaciones analizadas alcanzan la fase estacionaria y de muerte antes de alcanzar las 96 horas de fermentación. El 44% de las fermentaciones con esta cepa alcanzaron la fase estacionaria a las 48 horas de fermentación, el 22% a las 72 horas y el 33% a las 96. En general se puede observar que esta cepa posee tiempos menores de fermentación que la anterior, donde el crecimiento empieza a parar antes y la muerte de la población celular ocurre de forma más prematura.

En cuanto a la producción de polihidroxicanoatos por *Pseudomonas putida*, se observa un comportamiento concordante con el crecimiento celular. La concentración máxima que se obtiene del polímero está en la mayoría de las fermentaciones alrededor de las 48 horas, y para algunas incluso alrededor de las 24 horas, como en las combinaciones de 2% melaza con 2% sales y 3% melaza con 2% sales. A partir de los puntos máximos en concentración de PHA se genera una reducción en la concentración de este polímero. Este comportamiento es el esperado para una producción de polihidroxicanoatos. Al principio cuando hay un exceso de fuentes de carbono la célula inicia un almacenamiento de polímero como una posible fuente de mantenimiento energético. Posteriormente, conforme se reduce la concentración de azúcares en el medio la población microbiana inicia la degradación del polímero aculado de forma intracelular para la obtención de energía de esta fuente de carbono. La limitación de fuente de sustrato genera una estabilización en la concentración de la población celular y posteriormente la muerte debido las limitaciones de fuentes de carbono en el medio. A partir de lo anterior, al escalar el proceso, se recomienda utilizar una fermentación fed-batch que mantenga la concentración de sustrato en el medio para evitar una reducción en la concentración de polihidroxicanoatos intracelular generada por escasas de fuente de carbono. Si se trabaja en una operación por lotes también es recomendable parar la fermentación en el momento donde se alcanza la concentración máxima de PHA.

Las figuras 34 a 42 muestran la concentración celular, de azúcares y de polihidroxicanoatos durante la fermentación de *Bacillus subtilis*. Con esta cepa, a diferencia de las dos anteriores, el mayor consumo de sacarosa se da durante las primeras 24 horas para la mayoría de las fermentaciones. A partir de este momento la concentración de sacarosa sigue reduciéndose hasta llegar a valor cercanos a cero. En la hora 24 de las fermentaciones se puede apreciar el aumento en las concentraciones de glucosa y fructosa por la hidrólisis de sacarosa, pero luego se observa una reducción progresiva de la concentración de estos azúcares en el tiempo. Esto probablemente indica que las primeras 24 horas de ocurre inicialmente la reducción de la concentración de monosacáridos con concentración constante de sacarosa, seguido un elevado consumo por hidrólisis de sacarosa donde se observa el aumento de glucosa y fructosa. La primera parte no se observa en esta cepa como en las anteriores ya que al tener un consumo mucho más rápido de sustrato no se registra en los tiempos de muestreo y solo se logra apreciar la reducción de la sacarosa a las 24 horas.

Todas las combinaciones de las formulaciones del medio fermentativo con *Bacillus subtilis* alcanzaron la fase estacionaria en las 96 horas de fermentación. La mayoría de las combinaciones alcanzaron la fase estacionaria a las 48 horas y muchas otras a las 24 horas. Esto es consecuencia del rápido agotamiento de los azúcares en el medio consecuencia de un alto consumo de sustrato al inicio de la fermentación. Sin embargo, se puede observar en estas fermentaciones que la fase estacionaria fue más larga que para las cepas anteriores. A pesar de que esta cepa alcanzó la fase estacionaria de forma prematura al compararla con las otras dos, solo cuatro de las nueve fermentaciones alcanzaron la fase de muerte.

En cuanto a los polihidroxicanoatos producidos en las fermentaciones con *Bacillus subtilis*, solo una fermentación de las nueve tuvo la mayor concentración de polihidroxicanoatos a las 96 horas, y del resto cuatro tuvieron la mayor concentración de PHA a las 24 horas y las otras 4 a las 48 horas. Este comportamiento coincide con la rapidez del crecimiento celular y consumo de azúcares al inicio de la fermentación. Después de este punto máximo se observa una reducción progresiva del polímero en la prolongada fase estacionaria de microorganismo. Esto significa que la supervivencia de la población celular

durante esta fase fue en gran proporción gracias al conversión energética del PHA acumulado al inicio de la fermentación. Para esta cepa, al igual que la anterior, se recomienda parar la fermentación en el momento que se alcanza la mayor concentración de polihidroxicanoatos según esta investigación, cuando la intención de la fermentación sea la producción del biopolímero plástico. Esto ya que al prolongar la fermentación después de este punto máximo no solo se reduce e PHA como consecuencia de las limitaciones de sustrato sino pierde energía innecesaria en la agitación y regulación de la temperatura durante las fermentaciones. Considerando, también, su alto y rápido consumo de sustrato, esta cepa podría tener mejores resultados al escalarse el proceso utilizando un reactor fed-batch que mantenga las concentraciones de sustrato en el medio evitando el consumo intracelular de polihidroxicanoatos.

A pesar que cada una de las cepas alcanzó una máxima concentración de polihidroxicanoatos en diferente momento durante la fermentación, con las tres cepas se obtuvo un mayor rendimiento a las 24 horas de fermentación, para la mayoría de las combinaciones, como se observa en los cuadros 10, 11 y 12. Esto concuerda con el hecho que la derivada de la concentración de polihidroxicanoatos en el tiempo es usualmente mayor en al principio de fermentación, como se observa con las pendientes en las curvas. Con esto se puede inferir que en las primeras 24 horas se posee una mayor velocidad de producción de PHA, donde se utiliza menor cantidad de sustrato por polihidroxicanoatos producidos. La reducción en el rendimiento a partir de este tiempo podría deberse a una mayor proporción en el consumo de sustrato para mantenimiento y reproducción celular, respecto al utilizado para producir polihidroxicanoatos. El rendimiento es un parámetro de evaluación de la productividad del proceso, considerando que evalúa cuanto se utiliza de sustrato para producir el polímero. A partir de esto, se recomienda que si al escalar el proceso se pretende utilizar una fermentación continua en lugar de por lotes se deberían utilizar las condiciones de las primeras 24 horas de fermentación, donde se obtiene mayor rendimiento, y por siguiente mayor productividad, y se posee una producción más rápida de polihidroxicanoatos. Se recomienda obtener el modelo cinético para seleccionar las mejores condiciones de operación y, a partir de esto, dimensionar un biorreactor.

Para muchos puntos de las todas las fermentaciones realizadas la concentración en peso seco de polihidroxialcanoatos en el medio es mayor que la concentración celular en peso seco. Esto imposible ya que la concentración de PHA intracelular esta considerada en el peso seco celular y la capacidad máxima de almacenamiento de polihidroxialcanoatos es el 80% en peso seco, según investigaciones previas. Con esto se puede deducir que existe una contaminación durante los procesos de extracción de polihidroxialcanoatos de las células y el producto obtenido debe poseer una baja pureza. Usualmente se utilizan solventes orgánicos, principalmente cloroformo, para la extracción del biopolímero que logran solubilizar los polihidroxialcanoatos y separarlos de contaminantes del medio acuoso por medio de una operación de extracción líquido-líquido. Sin embargo, en esta investigación se utilizó hipoclorito de sodio grado comercial. Esta forma de extracción no solo tiene la limitación de generar una purificación deficiente del producto obtenido, sino que puede simular un peso seco mayor final al añadir a las muestras analizadas residuos de sales al evaporar el producto líquido que aparenta una mayor concentración de polihidroxialcanoatos que la verdaderamente obtenida. Al ser esto una fuente de error sistemática, ya que las extracciones fueron realizadas de la misma forma para todas las muestras, afecta la exactitud en cuantificación de PHA, pero no en el comportamiento en el tiempo y la comparación entre cepas y combinaciones de los parámetros analizados. Se recomienda experimentar con nuevas formas de extracción y determinar el efecto que estas poseen en la pureza final del producto.

Otras fuentes de error que pudieron haber afectado las fermentaciones incluyen la escala de trabajo, la heterogeneidad de la melaza y las sales presentes en ella. La primera se refiere a la magnificación del error en los resultados al trabajar en pequeña escala. La segunda es una fuente de error aleatoria que no permite comparar fácilmente las concentraciones iniciales de los medios fermentativos y las condiciones a las que se someten las células. La tercera se refiere a las sales que se encuentran en la ceniza de la melaza que, al no haberse identificado ni cuantificado, no fue posible determinar su efecto en las fermentaciones.

Para la identificación de los polihidroxicanoatos en la muestra se realizó un análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. Los cuadros 13 a 15 muestran los picos correspondientes a los grupos funcionales de los espectros obtenidos para las fermentaciones con cada cepa analizada. El espectro IR de una muestra representa la composición total ya que cada compuesto, y grupo funcional en el, hace su propia contribución en la absorbancia del espectro. Los polímeros obtenidos muestran una intensa absorción en 3368.56, 3380.07 y 3370.12  $\text{cm}^{-1}$ , lo que corresponde a la presencia del grupo funcional O-H en las muestras analizadas. Una alta transmitancia, para esta banda de absorción, podría significar la presencia de azúcares en la muestra analizada, consecuencia de la baja pureza por el método de extracción, discutido anteriormente. Al no hacerse una extracción con un solvente orgánico no se logró hacer una separación de sustancias y contaminantes polares del medio fermentativo y el polímero, lo que podría generar las altas transmitancias observadas para este grupo funcional. Como se puede observar con los espectros IR, la cepa con mayor transmitancia para este grupo funcional fue *Bacillus cereus*, seguida por *Pseudomona putida* y por último *Bacillus subtilis*. Esto coincide con lo analizado anteriormente, considerando que *Bacillus subtilis* tuvo un mayor consumo de sustrato por lo que había una menor presencia de azúcares en el medio fermentativo que para las otras dos cepas y por consiguiente menor cantidad de estas en el sólido obtenido.

También se observan bandas de absorción en 2918.83, 2919.18 y 2922.36  $\text{cm}^{-1}$  que identifican la presencia del grupo funcional C-H correspondiente. Se observan picos de absorbancia en 1635.96, 1636.95 y 1638.66  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden al carbonilo (C=O) del grupo funcional éster que es una forma de común de identificación de polihidroxicanoatos con FTIR. La transmitancia para estas absorbancias no indica altas concentraciones corroborando la baja pureza esperada del producto obtenido, especialmente para la cepa *Bacillus subtilis*. Se identificó, también, en los espectros las absorbancias en 1408.36, 1411.94 y 1411.09  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al grupo funcional -CH<sub>3</sub>. Se encontró una pequeña absorbancia en 1021.31, 1055.77 y 1015.66  $\text{cm}^{-1}$  que se conoce como una característica típica de la presencia de derivados de azúcares en la muestra como ácido glucónico, ácido manurónico y ácido urónico.

A partir del análisis anterior es imposible determinar la estructura monomérica del polímero y el peso molecular del mismo. Es por esto por lo que se recomienda generar un análisis de cromatografía de gases acoplado con un detector de masas y la resonancia magnética nuclear (RMN) además de cromatografía de filtración en gel para identificar si los polímeros obtenidos son PHA de cadena corta o media e identificar qué polihidroxicanoato fue obtenido. Asimismo, se recomienda realizar pruebas a las propiedades físicas del polímero para determinar sus posibles aplicaciones como termoplástico o elastómero. Para esto se recomienda el uso de la técnica de calorimetría diferencial de barrido ya que los polihidroxicanoatos son polímeros parcialmente cristalinos, y la descripción de sus propiedades físicas y mecánicas se encuentra en función de la temperatura de transición de la fase amorfa y de la temperatura de fusión de la fase cristalina.

## IX. CONCLUSIONES

1. Se determinó que las concentraciones de fructosa, glucosa y sacarosa en la melaza eran de 7.4169%, 7.0506% y 39.5479% (m/m), respectivamente, las cuales están dentro de los rangos esperados para esta sustancia.
2. La cepa con mayor rendimiento de polihidroxicanoatos respecto al sustrato fue *Bacillus cereus* con un rendimiento de  $0.858 \pm 0.001\%$  (m/m), seguida por *Pseudomona putida* con un rendimiento de  $0.551 \pm 0.004\%$  (m/m) y, por último, *Bacillus subtilis* con un rendimiento de  $0.442 \pm 0.001\%$ .
3. Al comparar la concentración máxima de polihidroxicanoatos en las fermentaciones, la cepa de mayor producción es *Bacillus cereus* con una concentración 2.4 veces mayor que la máxima concentración de PHA de la cepa *Bacillus subtilis* y 4 veces mayor que la de *Pseudomona putida*.
4. La combinación con mayor rendimiento de polihidroxicanoatos tanto para *Pseudomona putida* como para *Bacillus subtilis* fue de 3% (m/v) de melaza y de 1% (v/v) de la solución concentrada de sales, mientras que para *Bacillus Cereus* fue de 2% (m/v) de melaza y de 3% (v/v) de la solución concentrada de sales.
5. Cada una de las cepas alcanzó una máxima concentración de polihidroxicanoatos en diferente momento durante la fermentación. Para la mayoría de los casos, con *Bacillus Cereus*, sucedió a las 96 horas, con *Pseudomonas putida* a las 48 horas y con *Bacillus subtilis* a las 24 y 48 horas



## X. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda cuantificar óxido de potasio, óxido de calcio, óxido de magnesio, óxido de sodio, trióxido de azufre, cloruros, óxido de fósforo (V) y silicatos, que son los componentes que conforman la ceniza de la melaza para determinar el efecto que estas sales pueden tener en la producción de polihidroxialcanoatos utilizando la técnica de determinación de ceniza por la técnica de secado en medio ácido.
2. Considerando la naturaleza pseudoplástica de la melaza, se recomienda medir las características reológicas del fluido para diferentes esfuerzos cortantes utilizando un reómetro.
3. Se recomienda hacer la medición de la viscosidad de forma isotérmica utilizando un baño termostático, para evitar variaciones de esta variable como consecuencia de los cambios de temperatura.
4. Se recomienda realizar la prueba de composición de componentes volátiles en la balanza de humedad con volúmenes muy pequeños de muestra distribuidos en el plato para alcanzar la mayor área de secado en el mismo.
5. Se recomienda evaluar otras condiciones y parámetros fermentativos como la adición de etanol al medio, el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en la solución de sales, pretratamiento de melaza, variaciones en el pH y concentración inicial de microorganismos, para comparar su rendimiento de producción de polihidroxialcanoatos.
6. Se recomienda identificar de forma experimental el funcionamiento de las rutas metabólicas que impactan la producción de PHA para encontrar microorganismos capaces de generar mayores rendimientos de polihidroxialcanoatos y proponer modificaciones genéticas a las cepas.

7. Se recomienda experimentar con nuevas formas de extracción de polihidroxialcanoatos utilizando diferentes solventes para determinar el efecto de estos en la pureza final del producto.
8. Se recomienda determinar la cinética de producción de polihidroxialcanoatos en función de las concentraciones analizadas en este trabajo de graduación para obtener un modelo matemático que describa la producción del polímero en el tiempo.
9. Se recomienda analizar el producto obtenido por las técnicas de cromatografía de gases acoplado con un detector de masas y resonancia magnética nuclear (RMN) además de cromatografía de filtración en gel para identificar la estructura monomérica de los polihidroxialcanoatos y determinar si los polímeros obtenidos son PHA de cadena corta o media.
10. Se recomienda realizar pruebas a las propiedades termomecánicas del polímero por medio de la técnica de calorimetría diferencial de barrido para determinar sus posibles aplicaciones como termoplástico o elastómero

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, A.; Alcaraz, W.; y Cardona, M. (2018) *Sugarcane molasses and vinasse as a substrate for polyhydroxyalkanoates (PHA) production*. Research Group on Biotransformation, School of Microbiology, University of Antioquia, Medellín, Colombia.
- Akiyama, H.; Okuhata, H.; Onizuka, T.; Kanai, S.; Hirano, M.; Tanaka, S.; Sasaki, K. y Miyasaka, H. (2011) *Antibiotics-free stable polyhydroxyalkanoate (PHA) production from carbon dioxide by recombinant cyanobacteria*. Toray Industries, Inc., New Frontiers Laboratories, Kamakura, Kanagawa 248-8555, Japan.
- Albuquerque M.; Eiroa, C.; Torres, B.; Nunes, M.; Reis, M.; (2007) *Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses*. Journal of Biotechnology. Volume 130, Pages 411-421.
- Alva, L. y Riley, M. (2008) *Utilization of Cellulosic Waste From Tequila Bagasse and Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Bioplastics by Saccharophagus degradans*. Agricultural and Biosystems Engineering, The University of Arizona, Tucson, Arizona
- ASAZGUA (2020) *El azúcar de Guatemala en el mundo*. Obtenido de: <https://www.azucar.com.gt/azucar-de-guatemala-en-el-mundo/>

- Bhatia, C. (2014) *Advanced Renewable Energy Systems*. WPI, pág. 523-572.  
<https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-269-3.50021-8>
- Carvalho, G.; Oehmen, A.; Albuquerque, M.; y Reis, M. (2013). *The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses*. *New biotechnology*. 31. 10.1016/j.nbt.2013.08.010.
- Chang, R. y Goldsby, K. (2013) *Química*. 11<sup>a</sup> ed. México D.F. McGraw Hill. 1107 págs.
- Chaudhry, N.; Jamil, N. y Ali, I. (2011) *Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources*. *Ann Microbiol*. 61: 623.  
<https://doi.org/10.1007/s13213-010-0181-6>
- Choi, J. y Lee, S. (1999) *Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 51: 13.  
<https://doi.org/10.1007/s002530051357>
- Chuaa, A.; Takabatakeb, H.; Satoha, H. y Minoa, T., (2003) *Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent*. *Water Research*. Volume 37, Issue 15. Pages 3602-3611
- Ciardelli, F (2019) *Polymers from Fossil and Renewable Resources*. Springer Nature Switzerland. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-94434-0>

Clarke, M. (1993) *Syrups*. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Sugar Processing Research Institute Incorporated, New Orleans, LA, USA

El-Sayed, S.; Abdel-Rahman, M.; Salah, M. y Esmael, M. (2017) *Batch and fed-batch production of polyhydroxyalkanoates from sugarcane molasses by Bacillus flexus Azu-A2*. Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences (JIPBS) ISSN: 2349-2759

Gomaa, E. (2014). *Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by Bacillus subtilis and Escherichia coli grown on cane molasses fortified with ethanol*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 57(1), 145-154. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132014000100020o>

González, Y.; Meza J.; González O. y Córdova J. (2013). *Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano*. Revista internacional de contaminación ambiental, 29(1), 77-115

Greenpeace (2007) *Reporte de plásticos en los océanos*. Extraído de: [https://archivos.greenpeace.org/espana/Global/espana/2016/report/plasticos/plasticos\\_en\\_los\\_oceanos\\_LR.pdf](https://archivos.greenpeace.org/espana/Global/espana/2016/report/plasticos/plasticos_en_los_oceanos_LR.pdf)

Guerra-Blanco, P.; Cortes, O.; Poznyak, T.; Chairez, I. y García-Peña, E. (2017) *Polyhydroxyalkanoates (PHA) production by photoheterotrophic microbial consortia: Effect of culture conditions over microbial population and biopolymer yield and composition*. European Polymer Journal, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.11.007>

- Hermann-Krauss, C.; Koller, M.; Muhr, A.; Fasl, H.; Stelzer F. y Braunegg, G. (2013) *Archaeal Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Co- and Terpolyesters from Biodiesel Industry-Derived By-Products*. *Archaea*, vol. 2013, Article ID 129268, 10 pages, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/129268>.
- Macrotrends LLC, (2020) *Sugar Prices - 37 Year Historical Chart*. Obtenido de: <https://www.macrotrends.net/2537/sugar-prices-historical-chart-data>
- McCabe, W. (2007) *Operaciones unitarias en ingeniería química*. 7ª ed. México D.F. McGraw Hill. 1189 págs.
- Morgan-Sagastume F.; Valentino, M.; Hjort, D.; Cirne, L.; Karabegovic, F.; Gerardin, P.; Johansson, A.; Karlsson, P.; Magnusson, T.; Alexandersson, S.; Bengtsson, M.; Majone A. y Werker A. (2014) *Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sludge and municipal wastewater treatment*. *Water Sci Technol*. 69(1):177-84. doi: 10.2166/wst.2013.643.
- Naheed, N. y Jamil, N. (2014). *Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in Enterobacter sp. SEL2*. *Brazilian journal of microbiology*. Brazilian Society for Microbiology.
- Oehmen, A.; Pinto, F.; Silva, V.; Albuquerque, M. y Reis, M. (2014). *The impact of pH control on the volumetric productivity of mixed culture PHA production from fermented molasses*. *Engineering in Life Sciences*. 14. 10.1002/elsc.201200220.

- Rhu D.; Lee W.; Kim J. y Choi E. (2003) Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water Sci Technol.* 2003;48(8):221-8.
- Santhanam, A. y Sreenivasan, S. (2010) *Microbial production of polyhydroxy alkanotes (PHA) from Alcaligens spp. and Pseudomonas oleovorans using different carbon sources*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(21), pp. 3144-3150.
- Serafim, L.; Lemos, P. y Albuquerque, M. (2008) *Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81: 615. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1757-y>
- Skoog, D. (2015) *Química Analítica*. 9ª ed. México. CENGAGE Learning. 958 págs.
- Song, H.; Jeon, J.; Choi, H, y Woojun, P. (2008). *Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by Pseudomonas sp. strain DR2*. *Journal of microbiology and biotechnology.* 18. 1408-15.
- Sum, N. (2009) *Measurements of cell biomass concentration* Department of Chemical & Biomolecular Engineering. University of Maryland
- USDA (1959) *United States Standars for Grades of Sugar Cane Molasses*. Obtenido de:  
[www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Sugarcane\\_Molasses\\_Standard%5B1%5D.pdf](http://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Sugarcane_Molasses_Standard%5B1%5D.pdf)
- Vaverková, M. (2012) *Study of the Biodegradability of Degradable/Biodegradable Plastic Material in a Controlled Composting Environment*. *Ecological*

Chemistry and Engineering. Vol 19. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10216-011-0025-8>

Venkateswar R.; Motakatla N. y Venkata M. (2011). *Influence of aerobic and anoxic microenvironments on polyhydroxyalkanoates (PHA) production from food waste and acidogenic effluents using aerobic consortia*. Bioresource technology. 103. 313-21. 10.1016/j.biortech.2011.09.040.

Wade, L. (2017) *Química Orgánica*. 9ª ed. México. Pearson. 1307 págs.

Young, R. (2001) *Introduction to Polymers*. 3ª ed. Estados Unidos. CRC Press. 1384 págs.

## XII. APÉNDICES

### A. Datos de placa

*Cuadro 16. Información del equipo utilizado durante la fase experimental*

<b>Nombre del equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Capacidad</b>	<b>Descripción</b>	<b>Incertidumbre</b>
Potenciómetro digital	Oakton	1 - 14	Modelo PCSTestr 35 Impermeable Mide pH, conductividad y salinidad	±0.01
Copas Zahn	Gardco	1400 cSt	Copa número 5 Acero inoxidable	3% de la medición
Balanza analítica	Boeco	0.01- 220 g	Tiempo de estabilización 3.5 seg temperatura de trabajo de 10 °C a 40 °C	±0.0001
Refractómetro digital	Atago	0-120 g	Modelo PAL-3	±0.2%
Balanza de humedad	Ohaus	0.5 -120 g 0% -100%	Calentador tipo lámpara halógena	±1mg o ±0.01%

Nombre del equipo	Marca	Capacidad	Descripción	Incertidumbre
Cromatógrafo de alta resolución	Agilent	Desde cero hasta concentración del estándar más concentrado utilizado en la calibración	Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5um. Fase móvil agua a temperatura de 75°C, 55 °C en el detector y 25 °C en el automostreador Detector de índice de refracción	N/A
Espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier	PerkinElmer	5 - 45 °C	Versión 10.5.4	N/A

## B. Datos originales

*Cuadro 17. pH de una solución 0.1 g/mL de melaza medido con un potenciómetro digital<sup>1</sup>*

Corrida	pH ( $\pm 0.01$ )
1	6.28
2	6.20
3	6.20

<sup>1</sup> Mediciones realizadas a una temperatura de 25 °C.

*Cuadro 18. Tara, peso del beaker y volumen a máxima capacidad del recipiente con melaza para la determinación de la densidad de esta sustancia<sup>1</sup>*

<b>Corrida</b>	<b>Peso tara (<math>\pm 0.0001</math>g)</b>	<b>Peso lleno (<math>\pm 0.0001</math>g)</b>	<b>Volumen (<math>\pm 0.5</math>mL)</b>
1	18.8181	65.1324	36.0
2	18.8181	64.6315	36.0
3	18.8181	65.1117	36.0

<sup>1</sup> Mediciones realizadas a una temperatura de 30 °C.

*Cuadro 19. Tiempo de vaciado de la copa Zahn número cinco para la determinación de viscosidad<sup>1</sup>*

<b>Corrida</b>	<b>Tiempo (<math>\pm 0.01</math> s)</b>
1	1377.66
2	1282.86
3	1162.52

<sup>1</sup> Mediciones realizadas a una temperatura de 30 °C.

*Cuadro 20. Grados Brix de melaza medido con un refractómetro digital medidos a 30 °C*

<b>Corrida</b>	<b>Grados Brix (<math>\pm 0.2</math>%)</b>
1	83.7
2	83.2
3	83.5

*Cuadro 21. Porcentaje de compuestos volátiles en melaza utilizando una balanza de humedad<sup>1</sup>*

<b>Corrida</b>	<b>Compuestos Volátiles (<math>\pm 0.01</math>%)</b>
1	12.83
2	13.28
3	14.23

<sup>1</sup> Ciclo tipo rampa con un aumento gradual de temperatura de 40°C a 230°C.

Cuadro 22. Concentración de azúcares para una solución de melaza al 0.03 (m/v)<sup>1</sup>

Corrida	Sacarosa ( $\pm 0.002 \times 10^{-2}$ g/mL)	Glucosa ( $\pm 0.021 \times 10^{-3}$ g/mL)	Fructosa ( $\pm 0.082 \times 10^{-3}$ g/mL)
1	$1.191 \times 10^{-02}$	$2.104 \times 10^{-3}$	$2.171 \times 10^{-3}$
2	$1.187 \times 10^{-02}$	$2.135 \times 10^{-3}$	$2.288 \times 10^{-3}$

<sup>1</sup> Mediciones realizadas con un cromatógrafo líquido de alta resolución con una columna Agilent Hi Plex Ca 300x7.8mm, 5um, fase móvil agua a temperatura de 75°C, 55 °C en un detector de índice de refracción y 25 °C en el automostreador.

Cuadro 23. Peso de especies químicas utilizadas para la preparación de una solución concentrada con la cual se realizó la solución madre utilizada para la preparación de los medios fermentativos<sup>1</sup>

Especie	Peso ( $\pm 0.0001$ g)
(NH <sub>4</sub> )Cl	7.4921
NaHCO <sub>3</sub>	3.7529
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.0983
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15.4995
MgSO <sub>4</sub>	3.7469
CaCl <sub>2</sub> 2-hidratado	0.0793
FeSO <sub>4</sub>	0.4081

<sup>1</sup> Las sales se cuantificaron usando una balanza analítica

Cuadro 24. Parámetros utilizados para la inoculación de los medios fermentativos para las tres cepas evaluadas<sup>1</sup>

Cepa	Porcentaje de humedad del caldo ( $\pm 0.01\%$ m/m) <sup>2</sup>	Peso de 1 mL de caldo ( $\pm 0.001$ g)	Volumen de caldo para cada tubo ( $\pm 0.001$ ml)	Agua añadida a cada tubo ( $\pm 0.001$ ml)
<i>Pseudomona putida</i>	99.03	0.927	5.00	8.50

<b>Cepa</b>	<b>Porcentaje de humedad del caldo (<math>\pm 0.01\%</math> m/m)<sup>2</sup></b>	<b>Peso de 1 mL de caldo (<math>\pm 0.001</math>g)</b>	<b>Volumen de caldo para cada tubo (<math>\pm 0.001</math>ml)</b>	<b>Agua añadida a cada tubo (<math>\pm 0.001</math>ml)</b>
<i>Bacillus cereus</i>	98.83	0.939	4.00	8.50
<i>Bacillus subtilis</i>	99.48	0.959	7.00	7.00

<sup>1</sup> Los pesos y volúmenes fueron obtenidos a una temperatura de 25 °C

<sup>2</sup> Esta variable se obtuvo utilizando una balanza de humedad con un ciclo tipo rampa con un aumento gradual de temperatura de 40°C a 230°C.

*Cuadro 25. Tara, peso del medio y peso obtenido del sólido seco de biomasa y de polihidroxicanoatos para la cepa Bacillus Cereus*

<b>Muestra<sup>1</sup></b>	<b>Peso beaker (<math>\pm 0.0001</math>g)</b>	<b>Peso de medio 1<sup>2</sup> (<math>\pm 0.0001</math>g)</b>	<b>Peso del medio 2 (<math>\pm 0.0001</math>g)</b>	<b>Peso del beaker con biomasa (<math>\pm 0.0001</math>g)</b>	<b>Peso del beaker con PHA (<math>\pm 0.0001</math>g)</b>
1S1M2	32.2243	46.4870	46.4850	32.2951	32.2860
1S1M3	55.4493	45.7717	48.4415	55.5405	55.5448
1S1M4	47.6633	46.7849	46.5683	47.7803	47.7416
1S2M2	60.3925	47.3395	43.7021	60.4628	60.5078
1S2M3	54.2020	47.0499	45.4593	54.2872	54.2877
1S2M4	118.9879	46.4415	47.3469	119.0823	119.0675
1S3M2	124.5290	45.8639	48.2493	124.5909	124.5877

<sup>1</sup> El nombre de cada muestra simboliza la combinación de variables analizadas y el momento cuando se tomó la muestra. El primer carácter representa el número del día en que se tomó la muestra, el tercer carácter representa el porcentaje de la solución concentrada de sales y el último carácter representa el porcentaje de melaza en la muestra. La excepción es la muestra que está conformada por solo dos dígitos, en la cual el primero de ellos indica el día que fue tomada y el segundo indica que es el duplicado de la muestra S2M2.

<sup>2</sup> El medio de la muestra analizada fue dividido en dos partes que al sumarse conforman el contenido total de la fermentación para cada combinación.

<b>Muestra<sup>1</sup></b>	<b>Peso beaker (±0.0001g)</b>	<b>Peso de medio 1<sup>2</sup> (±0.0001g)</b>	<b>Peso del medio 2 (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con biomasa (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con PHA (±0.0001g)</b>
1S3M3	81.3613	46.3616	47.9684	81.4503	81.4532
1S3M4	82.5740	46.1173	48.3959	82.6695	82.6579
1.2	96.5445	46.6981	47.1043	96.6236	96.6288
2S1M2	49.3525	46.0493	46.7305	49.4053	49.4475
2S1M3	59.6278	46.3005	46.7202	59.7245	59.7519
2S1M4	60.2965	46.7091	45.0747	60.4342	60.4205
2S2M2	62.7225	44.9845	49.6294	62.8917	62.8346
2S2M3	76.8645	46.2590	47.4084	76.9330	76.9858
2S2M4	56.5272	46.7008	47.5410	56.6948	56.6549
2S3M2	75.5424	46.2302	44.2788	75.6443	75.6468
2S3M3	80.8510	46.6780	44.9001	80.9221	80.9527
2S3M4	78.4651	46.1260	47.0394	78.6138	78.5728
2.2	111.1958	46.6328	46.8624	111.2534	111.3127
3S1M2	32.2244	45.9354	41.8304	32.3019	32.3260
3S1M3	55.4504	47.4588	41.5465	55.6147	55.5838
3S1M4	47.6609	46.5304	46.8128	47.8390	47.8365
3S2M2	60.3841	46.4089	41.6125	60.5330	60.5279
3S2M3	54.1921	46.9928	40.9160	54.4166	54.5041
3S2M4	118.9953	45.5718	45.0184	119.1148	119.1671
3S3M2	124.5286	42.1910	45.2968	124.7149	124.9581
3S3M3	81.3601	46.0172	45.9886	81.4728	81.5132
3S3M4	82.5750	46.7699	44.9122	82.7478	82.7487
3.2	96.5414	44.7827	43.2027	96.6494	96.7575

<b>Muestra<sup>1</sup></b>	<b>Peso beaker (±0.0001g)</b>	<b>Peso de medio 1<sup>2</sup> (±0.0001g)</b>	<b>Peso del medio 2 (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con biomasa (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con PHA (±0.0001g)</b>
4S1M2	49.3525	45.3687	45.9994	49.5003	49.4949
4S1M3	59.6278	45.9748	40.0386	59.9470	59.7975
4S1M4	60.2965	44.6912	46.8741	60.4479	60.4447
4S2M2	62.7225	44.6035	43.1094	62.9528	63.1091
4S2M3	76.8645	45.0603	44.5033	77.2271	77.1249
4S2M4	56.5272	44.5717	41.7196	56.7145	56.7165
4S3M2	75.5424	44.7648	45.3081	75.9022	76.1770
4S3M3	80.8510	44.7616	48.1622	81.0309	81.0719
4S3M4	78.4651	45.0876	48.0713	78.6088	78.6837
4.2	111.1958	43.6869	46.8825	111.3831	111.4561

*Cuadro 26. Tara, peso del medio y peso obtenido del sólido seco de biomasa y de polihidroxialcanoatos para la cepa Pseudomona putida*

<b>Muestra<sup>3</sup></b>	<b>Peso beaker (±0.0001g)</b>	<b>Peso de medio 1<sup>4</sup> (±0.0001g)</b>	<b>Peso del medio 2 (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con biomasa (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con PHA (±0.0001g)</b>
1S1M2	32.2267	45.1933	49.3455	32.2745	32.2608

<sup>3</sup> E El nombre de cada muestra simboliza la combinación de variables analizadas y el momento cuando se tomó la muestra. El primer carácter representa el número del día en que se tomó la muestra, el tercer carácter representa el porcentaje de la solución concentrada de sales y el último carácter representa el porcentaje de melaza en la muestra. La excepción es la muestra que está conformada por solo dos dígitos, en la cual el primero de ellos indica el día que fue tomada y el segundo indica que es el duplicado de la muestra S2M2.

<sup>4</sup> El medio de la muestra analizada fue dividido en dos partes que al sumarse conforman el contenido total de la fermentación para cada combinación.

<b>Muestra<sup>3</sup></b>	<b>Peso beaker (±0.0001g)</b>	<b>Peso de medio 1<sup>4</sup> (±0.0001g)</b>	<b>Peso del medio 2 (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con biomasa (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con PHA (±0.0001g)</b>
1S1M3	55.4545	47.9941	45.4274	55.5191	55.5423
1S1M4	47.6615	44.7209	50.2146	47.7333	47.7514
1S2M2	60.3904	46.9574	47.4904	60.4357	60.456
1S2M3	96.5098	46.9257	48.2844	96.5598	96.635
1S2M4	118.9873	49.8563	43.5824	119.0514	119.0861
1S3M2	124.5724	49.4678	44.4742	124.6092	124.6545
1S3M3	81.3183	45.194	50.1089	81.3718	81.3972
1S3M4	82.5758	46.1884	47.2839	82.6264	82.6639
1.2	54.1461	44.6906	49.5925	54.1837	54.3133
2S1M2	49.3528	46.7826	43.5353	49.4389	49.4383
2S1M3	59.6273	45.7358	45.2335	59.741	59.7227
2S1M4	60.2961	46.3928	45.6082	60.6271	60.4246
2S2M2	62.7217	45.3522	49.8724	62.8055	62.7956
2S2M3	58.6101	47.1273	47.0668	58.6843	58.6885
2S2M4	56.5282	47.8809	47.5017	56.6252	56.6177
2S3M2	75.5421	45.6095	45.4127	75.6003	75.6121
2S3M3	80.8585	45.4295	49.0663	80.9265	80.939
2S3M4	78.4679	47.5645	44.2691	78.6058	78.5813
2.2	76.8000	47.0563	45.8576	76.9115	76.8966
3S1M2	32.2233	45.8488	45.2207	32.3463	32.2954
3S1M3	55.4453	45.7785	49.1764	55.5597	55.5300
3S1M4	47.6569	46.9139	48.0320	47.7688	47.7540
3S2M2	60.3886	46.6262	47.7872	60.4506	60.4650

<b>Muestra<sup>3</sup></b>	<b>Peso beaker (±0.0001g)</b>	<b>Peso de medio 1<sup>4</sup> (±0.0001g)</b>	<b>Peso del medio 2 (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con biomasa (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con PHA (±0.0001g)</b>
3S2M3	96.4999	47.6618	46.5159	96.5935	96.5950
3S2M4	118.9802	47.7353	44.3859	119.0769	119.096
3S3M2	124.5595	47.1333	45.0862	124.6767	124.6871
3S3M3	81.3142	47.4063	46.2977	81.502	81.4354
3S3M4	82.5718	46.6284	47.9777	82.6801	82.6739
3.2	54.1461	46.2578	46.7143	54.2635	54.2149
4S1M2	49.3521	44.0991	46.4647	49.4657	49.4437
4S1M3	59.6273	43.8073	48.0584	59.7678	59.7107
4S1M4	60.2959	43.9218	42.3253	60.4255	60.3792
4S2M2	62.7214	43.9844	39.2184	62.7904	62.7683
4S2M3	76.8956	43.9684	50.0407	76.9944	76.9765
4S2M4	56.5278	44.4851	50.0438	56.607	56.6010
4S3M2	75.5418	43.9214	48.2412	75.7707	75.7016
4S3M3	80.8579	43.8811	44.4387	81.1086	80.9649
4S3M4	78.4679	46.8395	46.0531	78.5448	78.5331
4.2	111.3803	43.1076	36.9425	111.4449	111.4176

*Cuadro 27. Tara, peso del medio y peso obtenido del sólido seco de biomasa y de polihidroxicanoatos para la cepa Bacillus subtilis*

<b>Muestra<sup>5</sup></b>	<b>Peso beaker (±0.0001g)</b>	<b>Peso de medio 1<sup>6</sup> (±0.0001g)</b>	<b>Peso del medio 2 (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con biomasa (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con PHA (±0.0001g)</b>
1S1M2	54.2245	45.4896	47.5875	54.2758	54.3324
1S1M3	59.7762	44.0691	44.5330	59.8701	59.8838
1S1M4	124.6569	44.8046	35.9965	124.7169	124.8015
1S2M2	89.1504	44.8111	48.9278	89.1935	89.2872
1S2M3	81.0199	45.3658	48.3474	81.1284	81.1254
1S2M4	91.0517	44.3081	32.6424	91.1090	91.1689
1S3M2	51.4553	44.2231	49.8128	51.4755	51.5312
1S3M3	81.3543	44.4169	48.0619	81.4232	81.4649
1S3M4	82.5777	46.0591	47.2495	82.6620	82.6889
1.2	49.4890	44.7298	48.4432	49.5394	49.6006
2S1M2	119.6944	44.2917	48.9888	119.7318	119.7942
2S1M3	82.0297	44.1846	50.0170	82.0871	82.1145
2S1M4	111.6671	44.4596	45.1671	111.7335	111.7545
2S2M2	111.6173	43.7429	44.4387	111.6734	111.7584
2S2M3	71.6414	43.7708	49.9748	71.6789	71.7553
2S2M4	119.0025	42.2415	52.3417	119.2181	119.2755
2S3M2	75.5304	41.9043	48.9546	75.5836	75.6437

<sup>5</sup> El nombre de cada muestra simboliza la combinación de variables analizadas y el momento cuando se tomó la muestra. El primer carácter representa el número del día en que se tomó la muestra, el tercer carácter representa el porcentaje de la solución concentrada de sales y el último carácter representa el porcentaje de melaza en la muestra. La excepción es la muestra que está conformada por solo dos dígitos, en la cual el primero de ellos indica el día que fue tomada y el segundo indica que es el duplicado de la muestra S2M2.

<sup>6</sup> El medio de la muestra analizada fue dividido en dos partes que al sumarse conforman el contenido total de la fermentación para cada combinación.

<b>Muestra<sup>5</sup></b>	<b>Peso beaker (±0.0001g)</b>	<b>Peso de medio 1<sup>6</sup> (±0.0001g)</b>	<b>Peso del medio 2 (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con biomasa (±0.0001g)</b>	<b>Peso del beaker con PHA (±0.0001g)</b>
2S3M3	60.5532	44.2884	44.0044	60.6390	60.6482
2S3M4	78.4603	43.6915	50.2925	78.5757	78.6013
2.2	56.6642	43.8197	45.6994	56.6779	56.7441
3S1M2	54.2343	47.7619	36.3803	54.4012	54.3333
3S1M3	55.4566	41.4627	40.2694	55.5155	55.5089
3S1M4	124.6646	40.9311	46.5185	124.7433	124.7342
3S2M2	89.1549	39.4685	48.1432	89.2151	89.2235
3S2M3	81.0199	45.3449	46.2388	81.1294	81.0973
3S2M4	91.0443	44.4046	49.6165	91.1121	91.1198
3S3M2	51.4620	43.6852	42.1902	51.4863	51.5270
3S3M3	81.3605	45.2387	48.0951	81.4557	81.4509
3S3M4	82.5773	44.5839	49.1087	82.6813	82.6537
3.2	49.4939	43.9416	40.6149	49.5447	49.5471
4S1M2	119.6990	44.6795	35.3163	119.8109	119.8270
4S1M3	82.0192	44.2973	48.9716	82.0503	82.0810
4S1M4	111.6729	42.7554	52.7361	111.7244	111.7278
4S2M2	111.6215	44.4821	47.4891	111.7476	111.7448
4S2M3	71.6324	45.0556	41.6931	71.6882	71.7153
4S2M4	62.8615	46.0050	36.4114	62.9478	62.9203
4S3M2	75.5351	43.5529	41.5406	75.5668	75.6100
4S3M3	60.5569	43.6463	49.1500	60.6509	60.6474
4S3M4	78.4671	46.6719	39.9327	78.5705	78.5382
4.2	56.6673	44.9217	43.0602	56.7011	56.7098

*Cuadro 28. Concentración de sacarosa, fructosa y glucosa de todas las combinaciones durante la fermentación con Bacillus cereus*

<b>Muestra<sup>7</sup></b>	<b>Sacarosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>	<b>Glucosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>	<b>Fructosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>
1S1M2	0.612	0.071	0.155
1S1M3	0.985	0.152	0.252
1S1M4	1.458	0.178	0.285
1S2M2	0.738	0.044	0.136
1S2M3	1.125	0.106	0.215
1S2M4	1.371	0.234	0.302
1S3M2	0.702	0.053	0.136
1S3M3	1.133	0.096	0.198
1S3M4	1.452	0.166	0.375
1.2	0.741	0.037	0.139
2S1M2	0.360	0.079	0.215
2S1M3	0.552	0.121	0.316
2S1M4	0.799	0.248	0.342
2S2M2	0.383	0.068	0.181
2S2M3	0.528	0.163	0.271
2S2M4	1.295	0.171	0.188
2S3M2	0.055	0.061	0.145
2S3M3	0.608	0.126	0.259
2S3M4	0.745	0.186	0.118
2.2	0.131	0.057	0.216

<sup>7</sup> El nombre de cada muestra simboliza la combinación de variables analizadas y el momento cuando se tomó la muestra. El primer carácter representa el número del día en que se tomó la muestra, el tercer carácter representa el porcentaje de la solución concentrada de sales y el último carácter representa el porcentaje de melaza en la muestra. La excepción es la muestra que está conformada por solo dos dígitos, en la cual el primero de ellos indica el día que fue tomada y el segundo indica que es el duplicado de la muestra S2M2.

<b>Muestra<sup>7</sup></b>	<b>Sacarosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>	<b>Glucosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>	<b>Fructosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>
3S1M2	0.071	0.030	0.305
3S1M3	0.291	0.090	0.239
3S1M4	0.623	0.140	0.319
3S2M2	0.887	0.162	0.162
3S2M3	0.055	0.088	0.449
3S2M4	0.173	0.049	0.234
3S3M2	0.112	0.060	0.299
3S3M3	0.161	0.066	0.377
3S3M4	0.547	0.159	0.143
3.2	0.000	0.031	0.285
4S1M2	0.006	0.016	0.286
4S1M3	0.099	0.041	0.451
4S1M4	0.458	0.145	0.213
4S2M2	0.215	0.033	0.111
4S2M3	0.192	0.058	0.273
4S2M4	0.333	0.112	0.238
4S3M2	0.373	0.028	0.093
4S3M3	0.581	0.066	0.368
4S3M4	0.931	0.106	0.360
4.2	0.189	0.042	0.227

*Cuadro 29. Concentración de sacarosa, fructosa y glucosa de todas las combinaciones durante la fermentación con Pseudomonas putida*

<b>Muestra<sup>8</sup></b>	<b>Sacarosa (±0.001% m/v)</b>	<b>Glucosa (±0.001% m/v)</b>	<b>Fructosa (±0.001% m/v)</b>
1S1M2	0.717	0.048	0.122
1S1M3	1.222	0.048	0.180
1S1M4	1.584	0.075	0.246
1S2M2	0.784	0.025	0.109
1S2M3	1.129	0.045	0.181
1S2M4	1.712	0.104	0.276
1S3M2	0.745	0.022	0.101
1S3M3	1.154	0.042	0.174
1S3M4	1.605	0.089	0.248
1.2	0.772	0.026	0.106
2S1M2	0.358	0.169	0.146
2S1M3	0.379	0.304	0.287
2S1M4	1.473	0.122	0.192
2S2M2	0.123	0.075	0.190
2S2M3	0.486	0.274	0.280
2S2M4	1.002	0.290	0.354
2S3M2	0.125	0.556	0.258
2S3M3	0.922	0.183	0.219
2S3M4	0.650	0.446	0.420
2.2	0.136	0.061	0.233

<sup>8</sup> El nombre de cada muestra simboliza la combinación de variables analizadas y el momento cuando se tomó la muestra. El primer carácter representa el número del día en que se tomó la muestra, el tercer carácter representa el porcentaje de la solución concentrada de sales y el último carácter representa el porcentaje de melaza en la muestra. La excepción es la muestra que está conformada por solo dos dígitos, en la cual el primero de ellos indica el día que fue tomada y el segundo indica que es el duplicado de la muestra S2M2.

<b>Muestra<sup>8</sup></b>	<b>Sacarosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>	<b>Glucosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>	<b>Fructosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>
3S1M2	0.606	0.042	0.035
3S1M3	0.839	0.064	0.271
3S1M4	0.922	0.208	0.439
3S2M2	0.533	0.367	0.167
3S2M3	1.022	0.184	0.433
3S2M4	1.014	0.190	0.438
3S3M2	0.000	0.031	0.155
3S3M3	0.367	0.165	0.292
3S3M4	1.092	0.230	0.445
3.2	0.181	0.098	0.137
4S1M2	0.000	0.026	0.112
4S1M3	0.798	0.060	0.250
4S1M4	0.841	0.299	0.403
4S2M2	0.206	0.112	0.150
4S2M3	0.449	0.116	0.066
4S2M4	0.809	0.123	0.200
4S3M2	0.115	0.028	0.122
4S3M3	0.160	0.064	0.205
4S3M4	0.890	0.129	0.233
4.2	0.017	0.040	0.185

*Cuadro 30. Concentración de sacarosa, fructosa y glucosa de todas las combinaciones durante la fermentación con Bacillus subtilis*

<b>Muestra<sup>9</sup></b>	<b>Sacarosa (±0.001% m/v)</b>	<b>Glucosa (±0.001% m/v)</b>	<b>Fructosa (±0.001% m/v)</b>
1S1M2	0.168	0.318	0.246
1S1M3	0.748	0.319	0.279
1S1M4	0.323	0.645	0.416
1S2M2	0.160	0.323	0.242
1S2M3	0.198	0.494	0.339
1S2M4	0.280	0.709	0.433
1S3M2	0.059	0.330	0.203
1S3M3	0.255	0.480	0.281
1S3M4	0.333	0.671	0.433
1.2	0.117	0.305	0.254
2S1M2	0.132	0.271	0.269
2S1M3	0.000	0.396	0.264
2S1M4	0.000	0.528	0.216
2S2M2	0.212	0.256	0.322
2S2M3	0.000	0.442	0.243
2S2M4	0.194	0.574	0.528
2S3M2	0.082	0.273	0.301
2S3M3	0.000	0.367	0.341
2S3M4	0.000	0.453	0.411
2.2	0.000	0.296	0.244

<sup>9</sup> El nombre de cada muestra simboliza la combinación de variables analizadas y el momento cuando se tomó la muestra. El primer carácter representa el número del día en que se tomó la muestra, el tercer carácter representa el porcentaje de la solución concentrada de sales y el último carácter representa el porcentaje de melaza en la muestra. La excepción es la muestra que está conformada por solo dos dígitos, en la cual el primero de ellos indica el día que fue tomada y el segundo indica que es el duplicado de la muestra S2M2.

<b>Muestra<sup>9</sup></b>	<b>Sacarosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>	<b>Glucosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>	<b>Fructosa</b> <b>(±0.001% m/v)</b>
3S1M2	0.110	0.217	0.267
3S1M3	0.000	0.355	0.216
3S1M4	0.000	0.169	0.159
3S2M2	0.188	0.123	0.197
3S2M3	0.115	0.297	0.288
3S2M4	0.000	0.360	0.277
3S3M2	0.112	0.204	0.164
3S3M3	0.000	0.315	0.270
3S3M4	0.000	0.422	0.254
3.2	0.112	0.224	0.203
4S1M2	0.165	0.075	0.158
4S1M3	0.000	0.111	0.115
4S1M4	0.000	0.096	0.176
4S2M2	0.181	0.034	0.138
4S2M3	0.730	0.049	0.426
4S2M4	0.000	0.356	0.146
4S3M2	0.000	0.121	0.007
4S3M3	0.154	0.225	0.120
4S3M4	0.194	0.318	0.260
4.2	0.157	0.221	0.173

## C. Cálculo de muestra

Cálculo 1. Corrección del pH de la corrida 1 utilizando la curva de calibración del potenciómetro digital mostrada en la

1

$$pH_{\text{corregido}} = 5.8462 * pH_{\text{medido}} - 30.923$$

$$pH_{\text{corregido}} = 5.8462 * (6.28 \pm 0.01) - 30.923$$

$$pH_{\text{corregido}} = 6.25 \pm 0.01$$

1 Este cálculo se efectúa utilizando la regresión lineal de la curva de calibración del potenciómetro digital para encontrar el pH corregido. Este cálculo se realizó de la misma manera para las corridas dos y tres de la medición del pH.

Cálculo 2. Concentración del ion hidronio de melaza utilizando los datos obtenidos en la corrida 1 de una solución 0.1 g/mL de un potenciómetro digital<sup>1</sup>

$$[H^+] = 10^{-pH}$$

$$[H^+] = \left( 10^{-6.25 \pm 0.01} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ de sol} \right) \left( \frac{0.100 \text{ L sol}}{10.3312 \pm 0.0001 \text{ g melaza}^2} \right) \left( \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} \right) \left( 1.28 \pm 0.04 \frac{\text{kg}}{\text{L}} \text{ melaza}^3 \right)$$

$$[H^+] = 6.93 * 10^{-6} \pm 0.27 * 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

1 Se utiliza la definición de pH para encontrar la concentración en la melaza a partir de una solución. Este cálculo se realizó de la misma manera para las corridas dos y tres de la medición del pH.

2 Corresponde a la cantidad en masa de melaza utilizada para preparación de la solución 0.1 g/mL de esta sustancia.

3 Densidad promedio de la melaza encontrada de forma experimental.

Cálculo 3. pH de melaza encontrado a partir de la concentración de ion hidronio utilizando la ecuación de la definición del pH para la corrida 1<sup>1</sup>

$$pH = -\text{Log}_{10}[H^+]$$

$$pH = -\text{Log}_{10} \left[ 6.93 * 10^{-6} \pm 0.01 * 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$$

$$pH = 5.16 \pm 0.02$$

1 Con este cálculo se determina el pH de la melaza utilizando la ecuación de definición de pH, a partir de su concentración de iones hidronio encontrada. Este cálculo se realizó de la misma manera para las corridas dos y tres de la medición del pH.

*Cálculo 4. Peso del contenido del beaker lleno de melaza sin la tara para la corrida 1<sup>1</sup>*

$$\begin{aligned} \text{Peso}_{real} &= \text{Peso}_{lleno} - \text{Tara} \\ \text{Peso}_{real} &= 65.1324 \pm 0.0001g - 18.8181 \pm 0.0001g \\ \text{Peso}_{real} &= 46.3143 \pm 0.0001g \end{aligned}$$

1 Este cálculo se efectuó restando al peso del beaker con melaza el peso del beaker vacío. Se realizó de la misma manera para las corridas dos y tres para encontrar el peso real.

*Cálculo 5. Densidad de la melaza encontrada con el peso y el volumen para la corrida 1<sup>1</sup>*

$$\begin{aligned} \rho &= \frac{\text{Peso}}{\text{Volumen}} \\ \rho &= \frac{46.3143 \pm 0.0001g}{36 \pm 1 \text{ mL}} \\ \rho &= 1.29 \pm 0.4 \text{ g/mL} \end{aligned}$$

1 Este cálculo se realizó dividiendo el peso dentro del volumen de melaza medidos a 30°C. Esto se realizó de la misma manera para las corridas dos y tres para encontrar la densidad y para determinar la densidad de los caldos nutritivos utilizados para el crecimiento de las tres cepas antes de la inoculación.

*Cálculo 6. Viscosidad encontrada a partir del tiempo en la corrida 1 utilizando la curva de calibración de la copa Zahn número 5 de la Figura 56<sup>1</sup>*

$$\begin{aligned} v &= 23.56 * t(s) - \frac{744}{t(s)} \\ v &= 23.56 * (1377.66 \pm 0.01) - \frac{744}{(1377.66 \pm 0.01)} \\ v &= 32457.13 \pm 2540 \text{ cSt} \end{aligned}$$

1 Se determinó la viscosidad de la melaza a 30°C a partir del tiempo de vaciado de la copa Zahn número 5 utilizando el modelo del proveedor que relaciona ambas variables. Este cálculo se realizó de la misma manera para las corridas dos y tres para encontrar la viscosidad.

*Cálculo 7. Concentración de sacarosa en melaza determinada a partir de una solución de 0.03 g/mL para la primera corrida<sup>1</sup>*

$$[S]_{real} = [S]_{sol} * \left( \frac{\text{Volumen solución}}{\text{Peso melaza}} \right)$$

$$[S]_{real} = (1.19087 * 10^{-2} \pm 2.85671 * 10^{-5}) \frac{g}{mL} * \left( \frac{3.0061 \pm 0.0001 g}{100.0 \pm 0.1 mL} \right)$$

$$[S]_{real} = 3.96151 * 10^{-1} \pm 9.50305 * 10^{-4} g/g$$

1 En este cálculo se determinó la concentración de sacarosa en la melaza a partir de los resultados obtenidos con cromatografía líquida de alta resolución para una solución de melaza diluida a 25°C. Este cálculo se realizó de la misma manera para todas las corridas de los azúcares evaluados.

*Cálculo 8. Concentración de cloruro de amonio de la solución concentrada de sales utilizada para la preparación de los medios fermentativos, a partir de la inicialmente preparada<sup>1</sup>*

$$[(NH_4)Cl] = \frac{\text{Peso de } (NH_4)Cl}{\text{Volumen total sol concentrada}} * \frac{\text{Volumen sol concentrada}}{\text{Volumen total sol madre}}$$

$$[(NH_4)Cl] = \frac{7.4921 \pm 0.0001g}{1.000 \pm 0.001 L} * \frac{65.00 \pm 0.05 mL}{500.0 \pm 0.5 mL}$$

$$[(NH_4)Cl] = 0.9740 \pm 0.0012 g/L$$

1 Con este cálculo se determina la concentración de la solución concentrada de sales a partir de la concentración de la solución madre inicialmente generada con la disolución de sales a 25°C. Este cálculo se realizó de la misma manera para todas las especies utilizadas para la elaboración de la solución madre de sales presentadas en el cuadro 5.

*Cálculo 9. Volumen de la solución concentrada de sales utilizado para la preparación del medio fermentativo al 1%<sup>1</sup>*

*Volumen sol madre = Concentración \* Volumen del medio fermentativo*

$$\text{Volumen sol madre} = 1\% \left( \frac{v}{v} \right) * 100.0 \pm 0.1 mL$$

$$\text{Volumen sol madre} = 1.00 mL$$

1 Determinación del volumen necesario de la solución concentrada de sales para que el medio fermentativo tenga una concentración de 1% (v/v) a 25°C. Este cálculo se realizó de la misma manera para las combinaciones de concentración de la solución madre de sales de 2% y 3% (v/v).

*Cálculo 10. Concentración de la solución madre de melaza utilizada para la preparación de los medios fermentativos*

$$[Melaza] = \frac{\text{Peso de melaza}}{\text{Volumen de solución}}$$

$$[Melaza] = \frac{500.0 \pm 0.1 g}{1000 \pm 1 mL}$$

$$[Melaza] = 0.5000 \pm 0.0005 g/mL$$

<sup>1</sup> Este cálculo se efectúa dividiendo la masa de melaza dentro del volumen de la solución concentrada de melaza para la determinación de la concentración de la solución utilizada para la formulación de los medios fermentativos a 25°C.

*Cálculo 11. Volumen de la solución madre de melaza utilizado para la preparación del medio fermentativo al 2%<sup>1</sup>*

$$\text{Volumen sol madre} = \frac{[\text{Melza}]_{\text{medio}}}{[\text{Melaza}]_{\text{sol madre}}} * \text{Volumen del medio fermentativo}$$

$$\text{Volumen sol madre} = \frac{0.02 \text{ g/mL}}{0.5000 \pm 0.0005 \text{ g/mL}} * 100.0 \pm 0.1 \text{ mL}$$

$$\text{Volumen sol madre} = 4.00 \text{ mL}$$

<sup>1</sup> Determinación del volumen necesario de la solución concentrada de melaza para que el medio fermentativo tenga una concentración de 2% (m/v) a 25°C. Este cálculo se realizó de la misma manera para las combinaciones de concentración de la solución madre de sales de 3% y 4% (m/v).

*Cálculo 12. Concentración celular en el caldo nutritivo de crecimiento de la cepa Pseudomona putida utilizado para la inoculación del medio fermentativo<sup>1</sup>*

$$[\text{Células}]_{\text{caldo}} = \frac{(1 - [\text{Humedad}]) * \rho_{\text{caldo}}}{8.50 * 10^{-11} \frac{\text{g}}{\text{cel}}}$$

$$[\text{Células}]_{\text{caldo}} = \frac{(1 - 0.9903 \pm 0.0001) * 0.927 \pm 0.001 \text{ g}}{1.00 \pm 0.01 \text{ mL} * 8.50 * 10^{-11} \text{ g/cel}}$$

$$[\text{Células}]_{\text{caldo}} = 1.06 * 10^8 \pm 0.01 * 10^8 \text{ cel/mL}$$

<sup>1</sup> Este cálculo se efectuó por medio del análisis del caldo inoculado y masa celular teórica para las cepas. Se realizó de la misma manera para los caldos nutritivos de *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*. Las variables de humedad y densidad del caldo se obtuvieron utilizando una balanza de humedad con un ciclo tipo rampa con un aumento gradual de temperatura de 40°C a 230°C.

*Cálculo 13. Concentración celular en el medio fermentativo de la cepa Pseudomona putida después de la inoculación<sup>1</sup>*

$$[\text{Células}]_{\text{medio fermentativo}} = \frac{\text{Volumen}_{\text{caldo}} * [\text{Células}]_{\text{caldo}}}{\text{Volumen}_{\text{agua resuspensión}} * \text{Volumen}_{\text{medio fermentativo}}}$$

$$[\text{Células}]_{\text{medio fermentativo}} = \frac{5.00 \pm 0.01 \text{ mL} * 1.06 * 10^8 \pm 0.02 * 10^8 \text{ cel/mL}}{5.00 \pm 0.01 \text{ mL} * 101.00 \pm 0.01 \text{ mL}}$$

$$[\text{Células}]_{\text{medio fermentativo}} = 6.16 * 10^5 \pm 0.12 * 10^5 \text{ cel/mL}$$

<sup>1</sup> Determinación de la concentración de células en los medios fermentativos durante el proceso de inoculación. Se realizó de la misma manera para los caldos nutritivos de *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*.

*Cálculo 14. Determinación de la concentración de células en peso seco para la muestra que contiene 1% de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con Bacillus cereus a 35 °C después de 24 horas de fermentación*

$$[Células]_{\text{peso seco}} = \frac{\text{Peso beaker con células} - \text{Tara}}{(\text{Medio 1} + \text{Medio 2})} * 100\%$$

$$[Células]_{\text{peso seco}} = \frac{32.2951 \pm 0.0001g - 32.2243 \pm 0.0001g}{46.4870 \pm 0.0001g + 46.4850 \pm 0.0001g} * 100\%$$

$$[Células]_{\text{peso seco}} = 0.0762 \pm 0.0002\% (m/m)$$

<sup>1</sup> Este cálculo se realizó dividiendo el peso seco de las células del medio partido el volumen de total de medio conformado por la suma entre “Medio 1” y “Medio 2”. Este cálculo se realizó de la misma manera para todas las combinaciones de melaza y sales de las tres cepas y en todos los tiempos evaluados en la fermentación.

*Cálculo 15. Determinación de la concentración de polihidroxicanoatos para la muestra que contiene 1% de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con Bacillus cereus a 35 °C después de 24 horas de fermentación*

$$[Células]_{\text{peso seco}} = \frac{\text{Peso beaker con PHA} - \text{Tara}}{(\text{Medio 1} + \text{Medio 2})} * 100\%$$

$$[Células]_{\text{peso seco}} = \frac{32.2860 \pm 0.0001g - 32.2243 \pm 0.0001g}{46.4870 \pm 0.0001g + 46.4870 \pm 0.0001g} * 100\%$$

$$[Células]_{\text{peso seco}} = 0.0664 \pm 0.0002\% (m/m)$$

<sup>1</sup> Este cálculo se realizó dividiendo el peso seco de PHA del medio partido el volumen de total de medio conformado por la suma entre “Medio 1” y “Medio 2”. Este cálculo se realizó de la misma manera para todas las combinaciones de melaza y sales de las tres cepas y en todos los tiempos evaluados en la fermentación.

*Cálculo 16. Rendimiento de la muestra que contiene 1% de la solución madre de sales y 2% (m/v) de melaza en la fermentación con Bacillus cereus a 35 °C después de 24 horas de fermentación<sup>1</sup>*

$$\text{Rendimiento} = - \frac{[PHA]_{\text{actual}} - [PHA]_{\text{inicial}}}{[Azúcares \text{ totales}]_{\text{actual}} - [Azúcares \text{ totales}]_{\text{inicial}}}$$

$$\text{Rendimiento} = - \frac{0.0664 \% \left(\frac{m}{m}\right) - 0.0000 \% \left(\frac{m}{m}\right)}{1.0803 \% \left(\frac{m}{v}\right) - 0.8380 \% \left(\frac{m}{v}\right)}$$

$$\text{Rendimiento} = 0.274 \pm 0.002 \% \left(\frac{v}{m}\right)$$

1 Este cálculo se realizó dividiendo el aumento de PHA partido la reducción de azúcares totales incluyendo sacarosa fructosa y glucosa. Este cálculo se realizó de la misma manera para todas las combinaciones de melaza y sales de las tres cepas y en todos los tiempos evaluados en la fermentación.

## D. Datos calculados

*Cuadro 31. pH de una solución 0.1 g/mL de melaza corregido con la curva de calibración de un potenciómetro digital<sup>1</sup>*

Corrida	pH (±0.01)
1	6.25
2	6.15
3	6.15

1 Datos obtenidos del cálculo 1 a partir de mediciones realizadas a una temperatura de 25 °C.

*Cuadro 32. Concentración del ion hidronio en melaza encontrada a partir de la ecuación de la definición de pH utilizando los datos de una solución 0.1 g/mL de un potenciómetro digital<sup>1</sup>*

Corrida	[H <sup>+</sup> ] (±0.27×10 <sup>-6</sup> )
1	6.93×10 <sup>-6</sup>
2	8.74×10 <sup>-6</sup>
3	8.74×10 <sup>-6</sup>

1 Datos obtenidos del cálculo 2 a partir de mediciones realizadas a una temperatura de 25 °C.

*Cuadro 33. pH de melaza a partir de la ecuación de la definición de pH utilizando los datos de una solución 0.1 g/mL de un potenciómetro digital<sup>1</sup>*

Corrida	pH (±0.02)
1	5.16
2	5.06

<b>Corrida</b>	<b>pH (<math>\pm 0.02</math>)</b>
3	5.06

1 Datos obtenidos del cálculo 3 a partir de mediciones realizadas a una temperatura de 25 °C.

*Cuadro 34. Peso de melaza medido en un beaker y densidad de melaza<sup>1</sup>*

<b>Corrida</b>	<b>Peso real (<math>\pm 0.0001\text{g}</math>)</b>	<b>Densidad (<math>\pm 0.02\text{ kg/L}</math>)</b>
1	46.3143	1.29
2	45.8134	1.27
3	46.2936	1.29

1 Datos obtenidos de los cálculos 4 y 5 a partir de mediciones realizadas a una temperatura de 30 °C.

*Cuadro 35. Viscosidad de melaza obtenido con tiempos de vaciado para la copa Zahn número cinco<sup>1</sup>*

<b>Corrida</b>	<b>Viscosidad (<math>\pm 9.01\text{ St}</math>)</b>
1	324.57
2	302.24
3	273.88

1 Datos obtenidos del cálculo 6 a partir de mediciones realizadas a una temperatura de 30 °C.

*Cuadro 36. Concentración de azúcares en melaza encontrada a partir de una solución de melaza al 0.03 (m/v)<sup>1</sup>*

<b>Corrida</b>	<b>Sacarosa (<math>\pm 0.009 \times 10^{-1}\text{g/g}</math>)</b>	<b>Glucosa (<math>\pm 0.072 \times 10^{-2}\text{g/g}</math>)</b>	<b>Fructosa (<math>\pm 0.275 \times 10^{-2}\text{g/g}</math>)</b>
1	$3.962 \times 10^{-1}$	$6.999 \times 10^{-2}$	$7.223 \times 10^{-2}$
2	$3.948 \times 10^{-1}$	$7.102 \times 10^{-2}$	$7.612 \times 10^{-2}$

1 Datos obtenidos del cálculo 7 a partir del método de cromatografía líquida de alta resolución para una solución de melaza diluida a 25°C

*Cuadro 37. Concentración celular en el caldo nutritivo de crecimiento y en el medio fermentativo después de la inoculación.*

<b>Cepa</b>	<b>Concentración de células en el caldo (<math>\pm 0.01 \times 10^8</math>/mL)</b>	<b>Concentración de células en el medio fermentativo (<math>\pm 0.01 \times 10^5</math> cel./mL)</b>
Pseudomona putida	$1.06 \times 10^8$	$6.16 \times 10^5$
Bacillus cereus	$1.29 \times 10^8$	$6.02 \times 10^5$
Bacillus subtilis	$5.87 \times 10^7$	$5.81 \times 10^5$

<sup>1</sup> Datos obtenidos del cálculo 12 a partir de mediciones realizadas a una temperatura de 30 °C datos obtenidos utilizando una balanza de humedad con un ciclo tipo rampa con un aumento gradual de temperatura de 40°C a 230°C y masa celular teórica para las cepas.

## E. Análisis de error

*Cálculo 17. Media muestral del pH de melaza de tres muestras evaluadas con un potenciómetro digital<sup>1</sup>*

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

$$\bar{x} = \frac{5.16 \pm 0.01 + 5.06 \pm 0.01 + 5.06 \pm 0.01}{3}$$

$$\bar{x} = 5.09 \pm 0.01$$

<sup>1</sup> En este cálculo se sumaron los valores obtenidos y se dividieron dentro del número de pruebas realizadas. Este cálculo se realizó de la misma manera para la determinación de la media muestral de todos los parámetros evaluados en el análisis de la melaza y para la combinación de 2% de solución de sales y 2% de melaza trabajada en duplicado.

*Cálculo 18. Desviación estándar del pH de melaza de tres muestras evaluadas con un potenciómetro digital<sup>1</sup>*

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$$s = \sqrt{\frac{(5.16 - 5.09)^2 + (5.06 - 5.09)^2 + (5.06 - 5.09)^2}{3 - 1}}$$

$$s = 0.06$$

<sup>1</sup> En este cálculo se resta cada valor obtenido con la media de los valores y se eleva cada término al cuadrado. Cada término se suma entre sí y se divide el total dentro de el número de pruebas menos uno, por último, se saca la raíz del resultado. Este cálculo se realizó de la misma manera para la determinación de la desviación estándar de todos los parámetros evaluados en el análisis de la melaza y para la combinación de 2% de solución de sales y 2% de melaza trabajada en duplicado.

*Cálculo 19. Incertidumbre del peso del contenido del beaker lleno de melaza sin la tara para la corrida 1<sup>1</sup>*

$$\Delta P_{\text{Peso}_{\text{real}}} = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}$$

$$\Delta P_{\text{Peso}_{\text{real}}} = \sqrt{0.0001g^2 + 0.0001g^2}$$

$$\Delta P_{\text{Peso}_{\text{real}}} = 0.0001g$$

<sup>1</sup> Este cálculo se realizó de la misma manera para la determinación de la incertidumbre de las sumas y restas realizadas durante el manejo de datos, elevando cada incertidumbre al cuadrado, sumándolas y obteniendo su raíz.

*Cálculo 20. Incertidumbre de la densidad de la melaza encontrada con el peso y el volumen para la corrida 1<sup>1</sup>*

$$\Delta \rho = \rho * \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{|x|}\right)^2 + \left(\frac{\Delta y}{|y|}\right)^2}$$

$$\Delta \rho = 1.29 \frac{g}{mL} * \sqrt{\left(\frac{0.0001g}{|46.3143g|}\right)^2 + \left(\frac{0.5mL}{|36mL|}\right)^2}$$

$$\Delta \rho = 0.02 \frac{g}{mL}$$

<sup>1</sup> Este cálculo se realizó de la misma manera para la determinación de la incertidumbre de productos y razones realizadas durante el manejo de datos. Para esto se encontró la razón entre la incertidumbre y el valor medido, se elevó cada término al cuadrado, se sumaron los términos, se sacó la raíz del total y se multiplicó por el resultado.

*Cálculo 21. Incertidumbre de la concentración del ion hidronio de una solución 0.1 g/mL de melaza de la corrida 1<sup>1</sup>*

$$\Delta[H^+]_{sol} = |[H^+]_{sol}| * |\ln(10) * \Delta pH|$$

$$\Delta[H^+]_{sol} = \left| 5.58 * 10^{-7} \frac{mol}{L} \right| * |\ln(10) * 0.01|$$

$$\Delta[H^+]_{sol} = 1.29 * 10^{-8} \frac{mol}{L}$$

<sup>1</sup> Este cálculo se realizó de la misma manera para determinar la incertidumbre de la concentración del ion hidronio en la solución de las corridas 2 y 3 multiplicando el logaritmo natural de 10 por la incertidumbre del pH y la concentración del ion hidronio resultante.

*Cálculo 22. Incertidumbre del pH de melaza encontrado a partir de la concentración de ion hidronio utilizando la ecuación de la definición del pH para la corrida 1<sup>1</sup>*

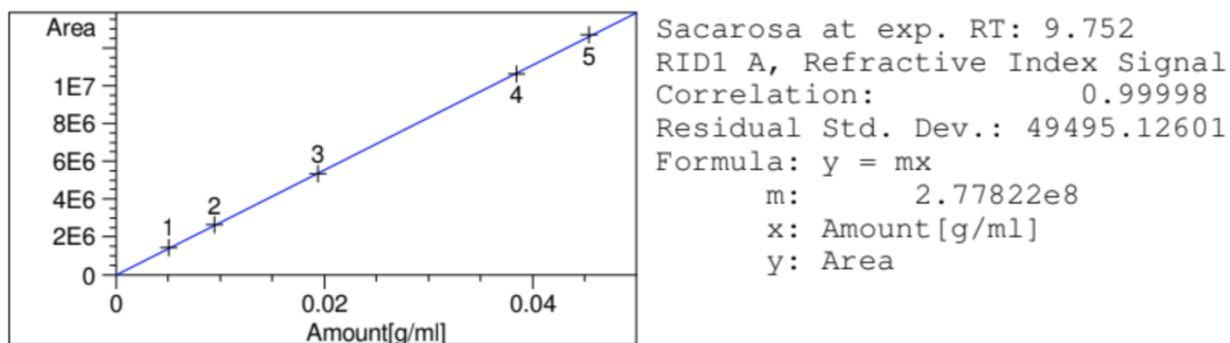
$$\Delta pH = \left| \frac{\Delta[H^+]_{melaza}}{pH * \ln(10)} \right|$$

$$\Delta pH = \left| \frac{0.27 * 10^{-6} \frac{mol}{L}}{5.16 * \ln(10)} \right|$$

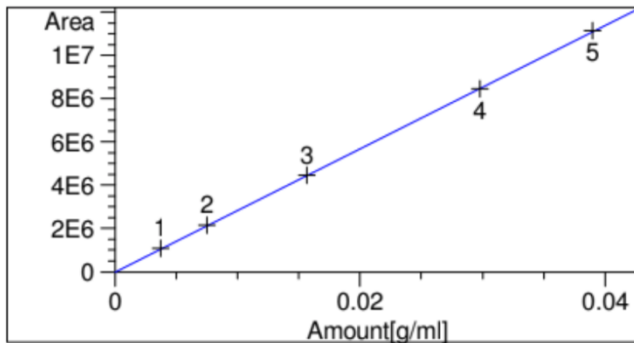
$$\Delta pH = 0.02$$

<sup>1</sup> Este cálculo se realizó de la misma manera para determinar la incertidumbre del pH de melaza en las corridas 2 y 3 dividiendo la incertidumbre de la concentración del ion hidronio en la melaza dentro del resultado del pH por el logaritmo natural de 10.

## F. Curvas de calibración

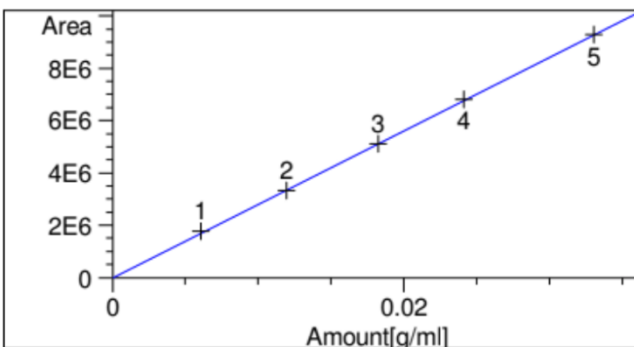


*Figura 43. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de sacarosa en la melaza*



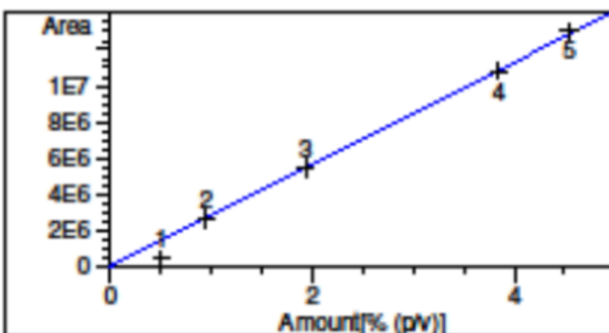
Glucosa at exp. RT: 11.192  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99999  
 Residual Std. Dev.: 30582.69657  
 Formula:  $y = mx$   
 m: 2.85079e8  
 x: Amount [g/ml]  
 y: Area

Figura 44. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de glucosa en la melaza



Fructosa at exp. RT: 15.502  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99998  
 Residual Std. Dev.: 42606.60443  
 Formula:  $y = mx$   
 m: 2.81120e8  
 x: Amount [g/ml]  
 y: Area

Figura 45. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de fructosa en la melaza



Sacarosa at exp. RT: 9.643  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99856  
 Residual Std. Dev.: 481726.99685  
 Formula:  $y = mx$   
 m: 2.81848e6  
 x: Amount [% (p/v)]  
 y: Area

Figura 46. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de sacarosa para las muestras de *Bacillus cereus*

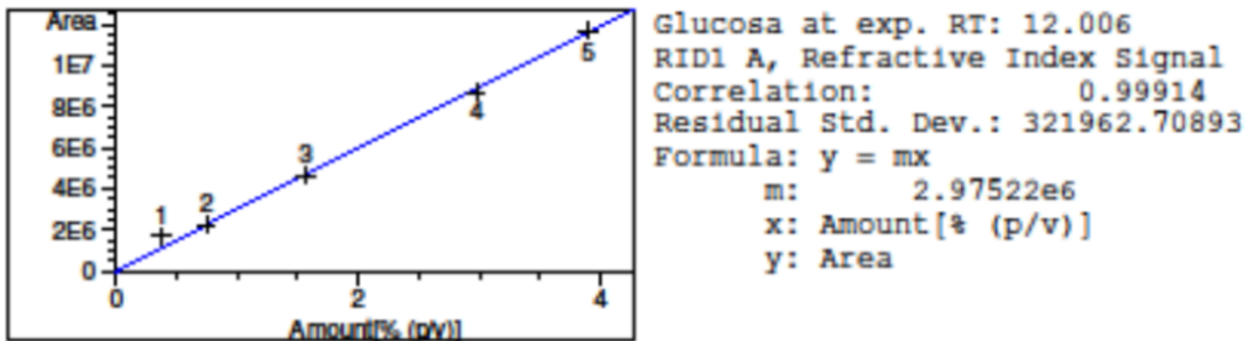


Figura 47. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de glucosa para las muestras de *Bacillus cereus*

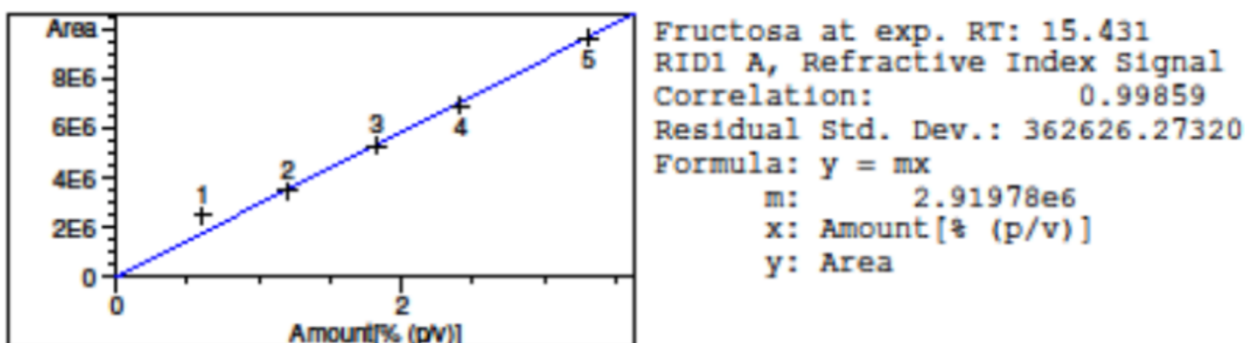


Figura 48. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de fructosa para las muestras de *Bacillus cereus*

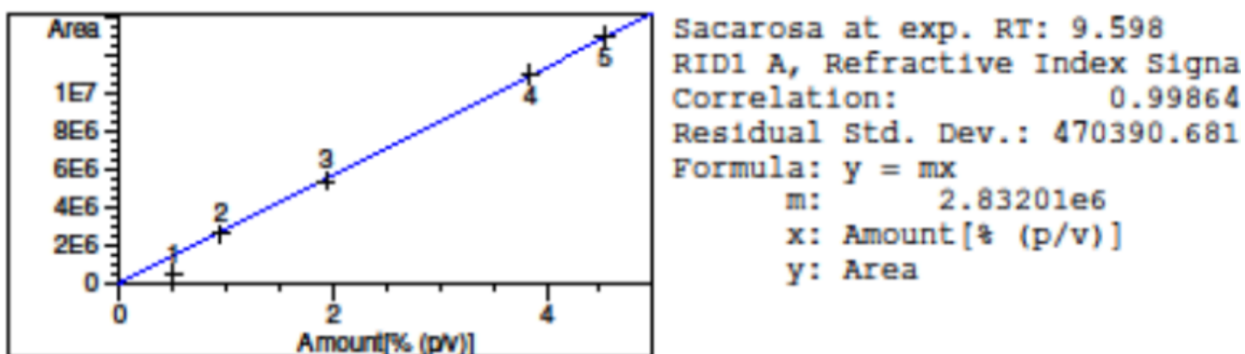


Figura 49. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de sacarosa para las muestras de *Pseudomona putida*

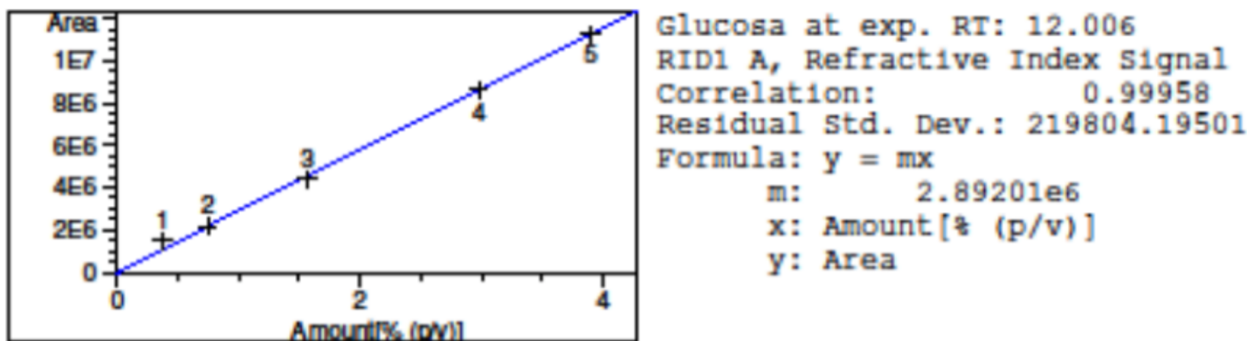


Figura 50. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de glucosa para las muestras de *Pseudomona putida*

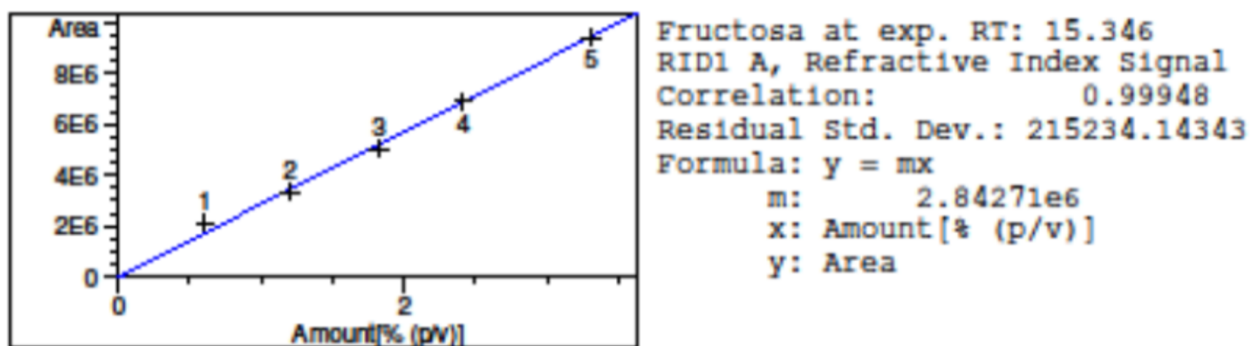


Figura 51. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de fructosa para las muestras de *Pseudomona putida*

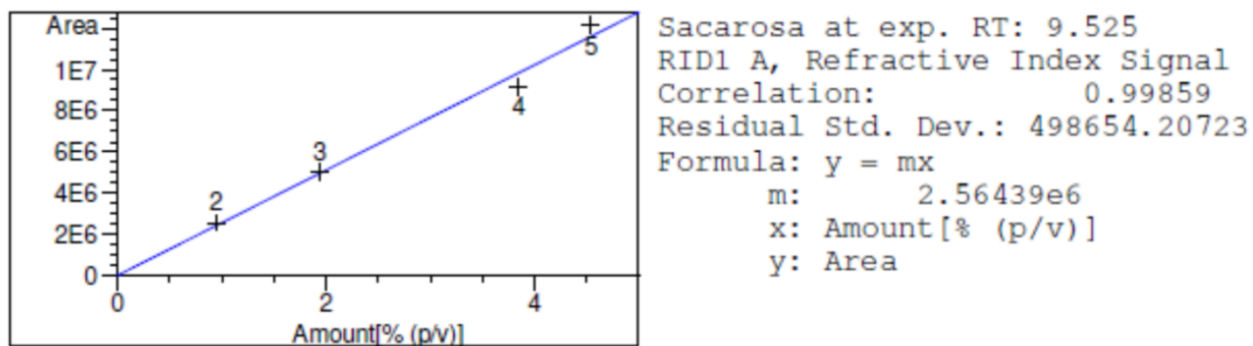


Figura 52. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de sacarosa para las muestras de *Bacillus subtilis*

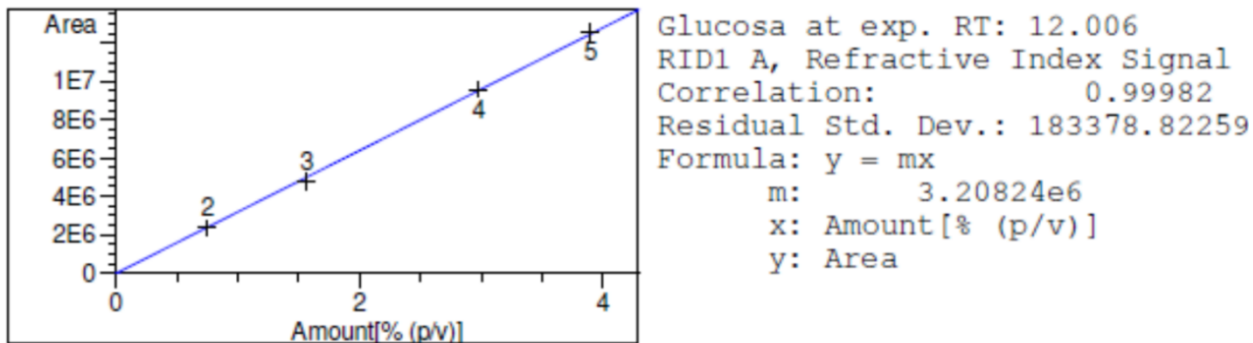


Figura 53. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de glucosa para las muestras de *Bacillus subtilis*

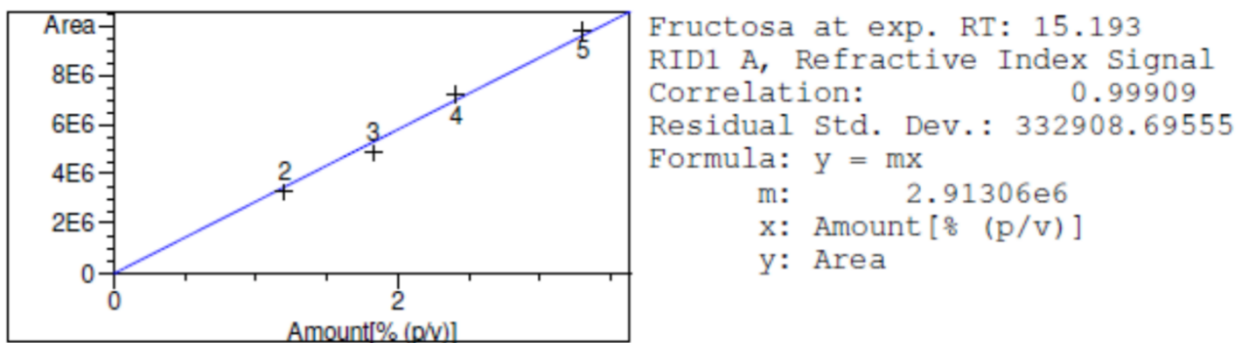


Figura 54. Curva de calibración del cromatógrafo líquido de alta eficacia utilizada para la cuantificación de fructosa para las muestras de *Bacillus subtilis*

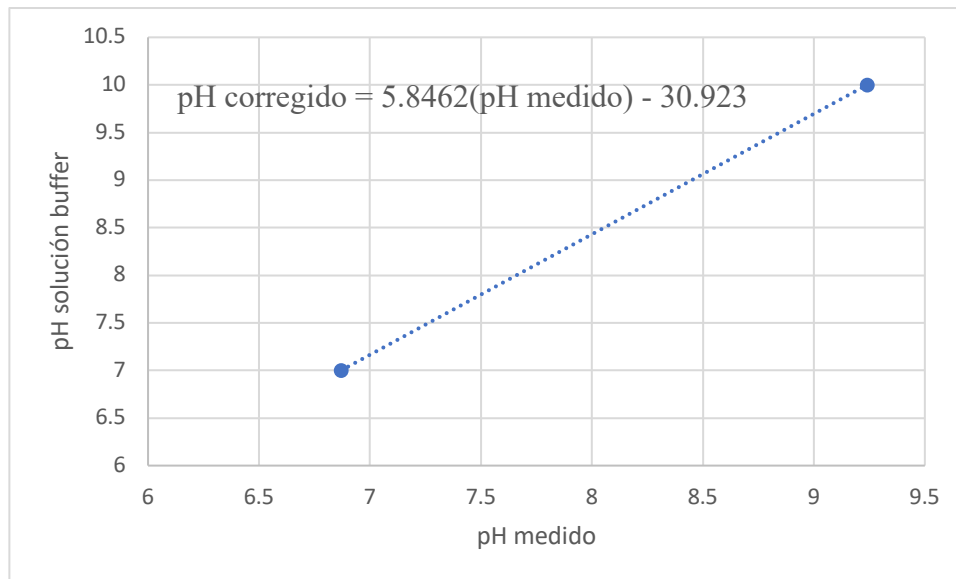


Figura 55. Curva de calibración del potenciómetro digital usando soluciones buffer con un pH de 7 y 10

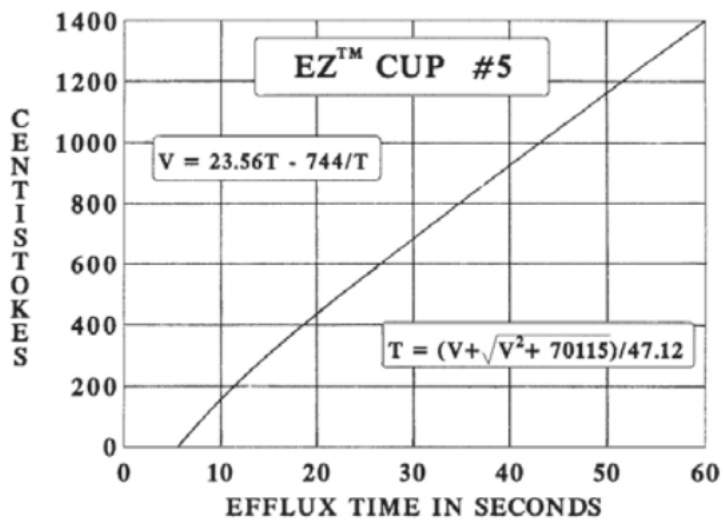


Figura 56. Curva de calibración del proveedor de copas Zahn, Gardco que relaciona el tiempo de vaciado con la viscosidad cinemática para la copa número cinco.

## G. Espectros FTIR

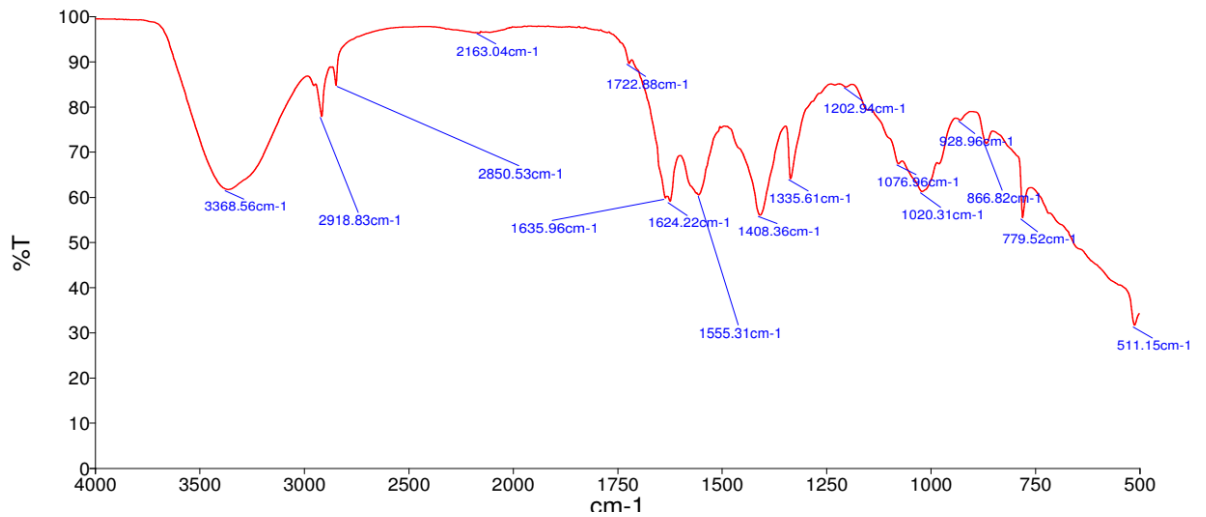


Figura 57. Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de *Bacillus cereus*

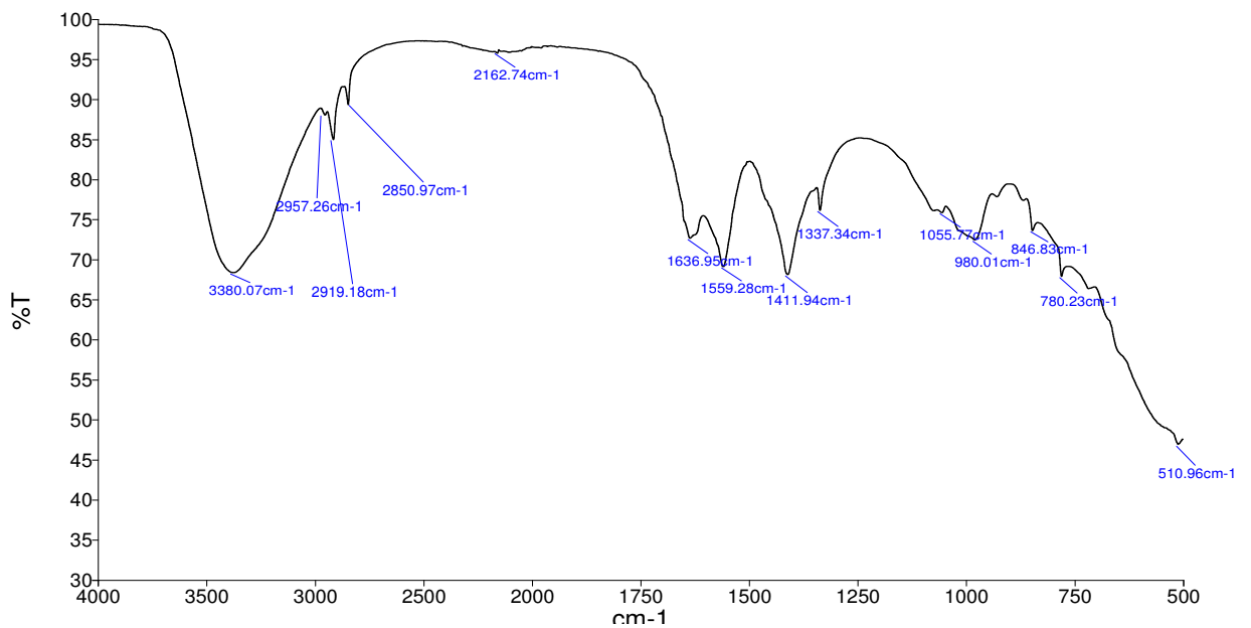


Figura 58. Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de *Pseudomonas putida*

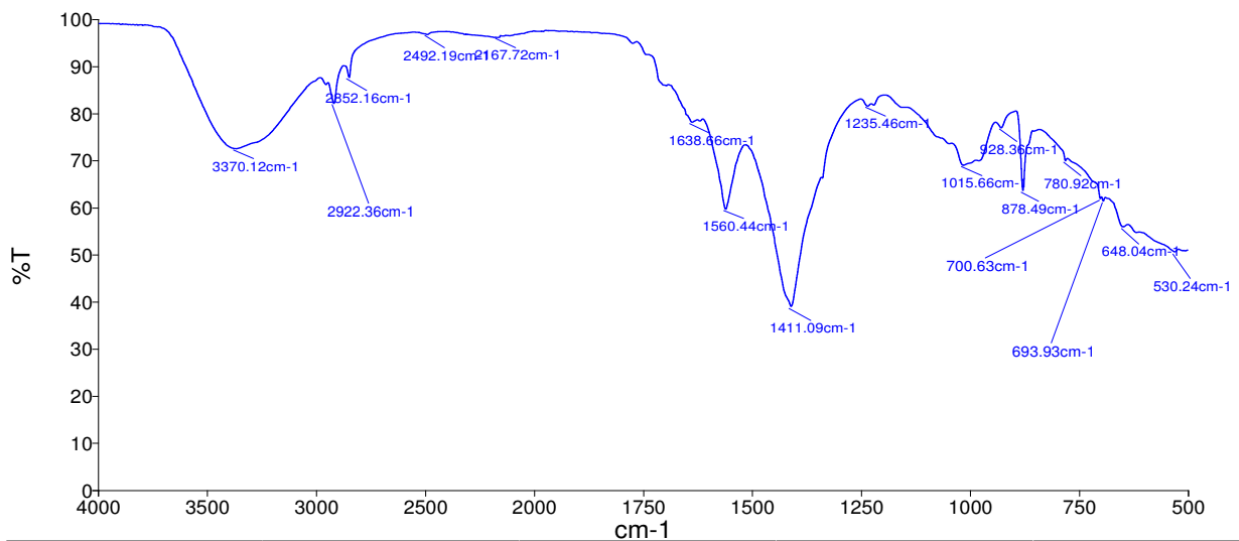


Figura 59. Espectro FTIR de la muestra de polihidroxicanoatos obtenidos con las fermentaciones de *Bacillus subtilis*

## H. Cromatogramas

A continuación, se presentan algunos ejemplos de cromatogramas del análisis de cromatografía líquida de alta resolución para algunas de las muestras analizadas con el fin de determinar la concentración de azúcares en el medio.

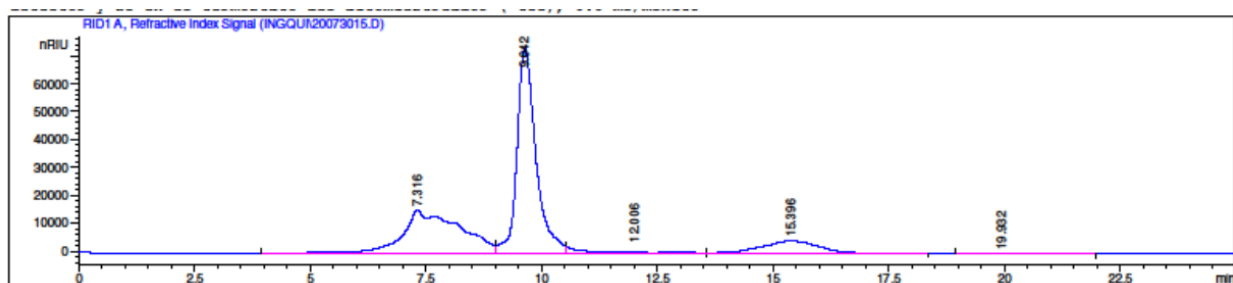


Figura 60. Cromatograma del duplicado de la muestra que contiene 2% de la solución madre de sales y 2% de melaza a las 24 horas en la fermentación con *Bacillus cereus*

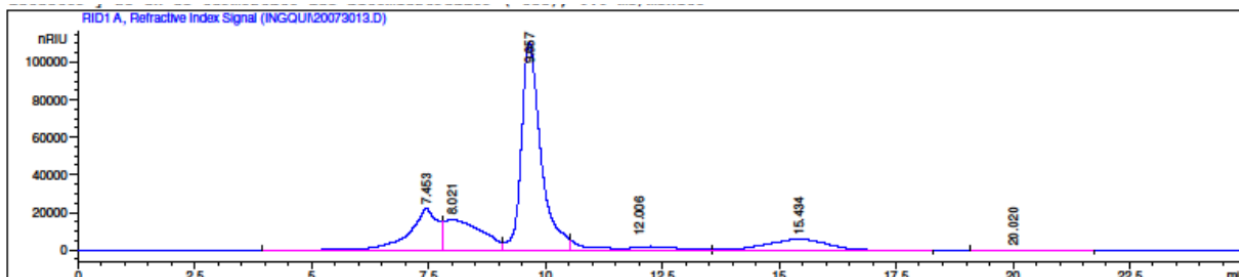


Figura 61. Cromatograma de la muestra que contiene 3% de la solución madre de sales y 3% de melaza a las 24 horas en la fermentación con *Bacillus cereus*

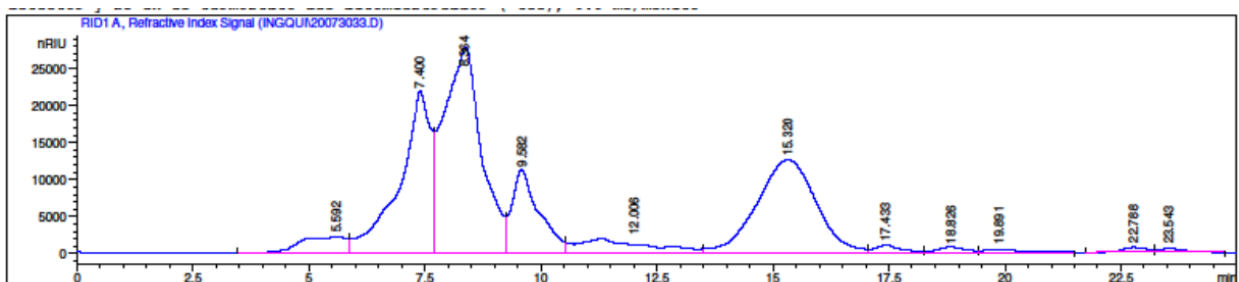


Figura 62. Cromatograma de la muestra que contiene 3% de la solución madre de sales y 3% de melaza a las 72 horas en la fermentación con *Bacillus cereus*

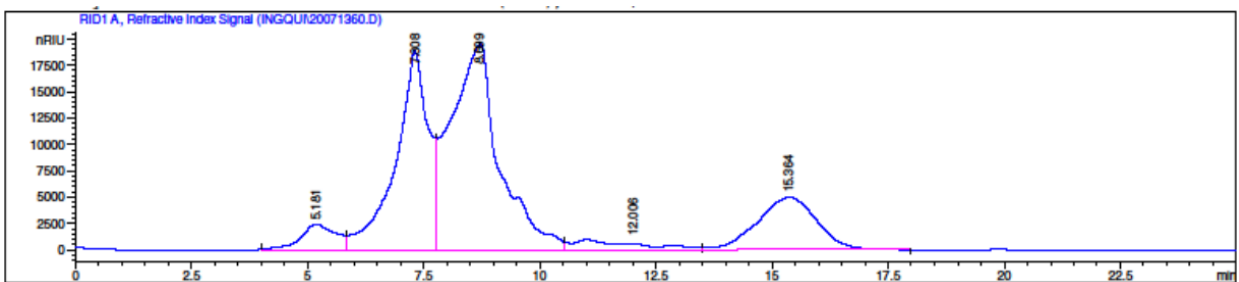


Figura 63. Cromatograma de la muestra que contiene 3% de la solución madre de sales y 2% de melaza a las 72 horas en la fermentación con *Pseudomonas putida*

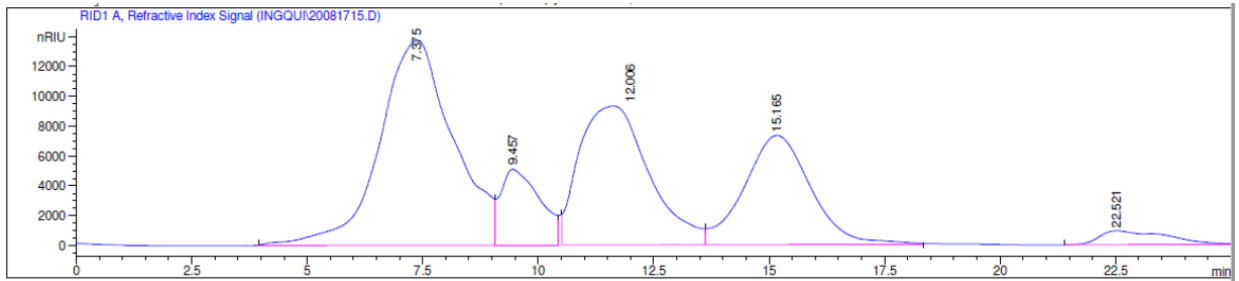


Figura 64. Cromatograma del duplicado de la muestra que contiene 2% de la solución madre de sales y 2% de melaza a las 24 horas en la fermentación con *Bacillus subtilis*

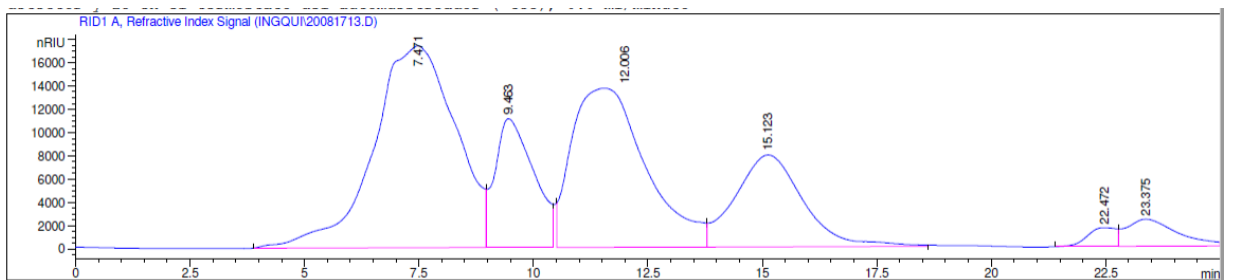


Figura 65. Cromatograma de la muestra que contiene 3% de la solución madre de sales y 3% de melaza a las 24 horas en la fermentación con *Bacillus subtilis*