

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química



Excelencia que trasciende

DEL VALLE
GRUPO EDUCATIVO

PROPUESTA DE MODELO CINÉTICO PARA LA
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A
PARTIR DE MELAZA

Trabajo de graduación presentado por
Angie Nohemí Vitola Sanchinelli
para optar por el grado académico de Licenciada en Ingeniería Química
Industrial

Guatemala,

2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química



Excelencia que trasciende

DELVALLE
GRUPO EDUCATIVO

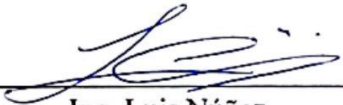
PROPUESTA DE MODELO CINÉTICO PARA LA
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A
PARTIR DE MELAZA

Trabajo de graduación presentado por
Angie Nohemí Vitola Sanchinelli
para optar por el grado académico de Licenciada en Ingeniería Química
Industrial

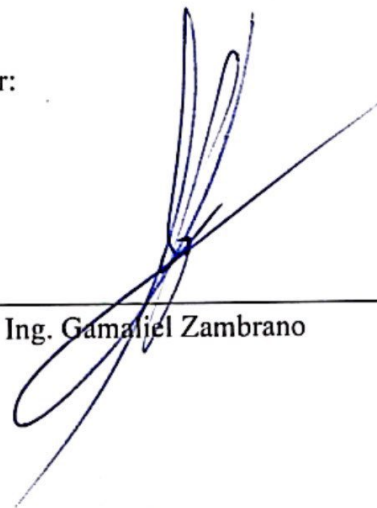
Guatemala,


2021


Vo.Bo.:

(f) 
Ing. Luis Núñez

Tribunal Examinador:

(f) 
Ing. Gamaliel Zambrano

(f) 
Ing. Luis Núñez

(f) 
Ing. Carmen Ortiz

Fecha de aprobación: Guatemala, 15 de diciembre del 2021.

PREFACIO

Quiero rendir mi profunda gratitud a Dios, por darme la fortaleza y salud para realizar no solo este proyecto de investigación, sino todo lo que he logrado en mi vida. Agradezco también el sacrificio, esfuerzo y amor incondicional de mis Padres a quienes admiro, respeto y amo con todas mis fuerzas. Agradezco también el amor y apoyo de mis dos hermanos, los cuales me inspiran y motivan a dar lo mejor de mí.

Deseo también dar las gracias a la Universidad del Valle de Guatemala por la formación profesional que me ha dado, especialmente al Ingeniero Gamaliel Zambrano, mi director de carrea; quien me apoyó durante los 6 años de estudios. Así también, deseo agradecer especialmente al Ingeniero Luis Núñez, por su dedicación y apoyo como asesor de mi trabajo de graduación; y como mentor y catedrático de muchos de mis cursos de formación profesional. También agradezco a todos mis catedráticos y auxiliares que brindaron su conocimiento y experiencia a mi educación. Finalmente agradezco el apoyo recibido por la Licenciada Ana Luisa Mendizábal en todos los análisis físicoquímicos especializados.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN	XIV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. ANTECEDENTES	4
A. SUSTRATOS EMPLEADOS EN LA PRODUCCIÓN DE PHA	4
B. CONDICIONES DE FERMENTACIÓN	6
C. EXTRACCIÓN DE PHA.....	7
D. MODELOS CINÉTICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PHA.....	7
IV. JUSTIFICACIÓN	9
V. MARCO TEÓRICO.....	11
A. POLÍMEROS	11
1. <i>Tipos de polímeros</i>	11
b. Polímeros por crecimiento en etapas	12
2. <i>Estructura y propiedades de los polímeros</i>	12
B. BIODEGRADABILIDAD.....	13
C. COMPOSTABILIDAD	13
D. BIOPOLÍMEROS.....	14
E. CLASIFICACIÓN DE BIOPOLÍMEROS.....	15
F. FERMENTACIÓN	16
1. <i>Crecimiento celular</i>	17
G. REACTORES	19
H. CINÉTICA.....	22
1. <i>Cinética de crecimiento celular</i>	22
2. <i>Rendimientos</i>	25
3. <i>Cinética de consumo de sustrato</i>	28
4. <i>Cinética de formación de producto</i>	29
5. <i>Fenómenos físicos en modelos cinéticos</i>	30
I. MODELOS CINÉTICOS.....	33
J. CLASIFICACIÓN DE LOS ORGANISMOS VIVOS	35
1. <i>Principales tipos de microorganismos</i>	36
a. Bacterias.....	36
b. Hongos	37
K. BACILLUS.....	37

1. <i>Bacillus cereus</i>	38
L. POLIHIDROXIALCANOATO (PHA)	39
1. <i>Propiedades del los polihidroxicanoatos</i>	40
2. <i>Microorganismos productores de polihidroxicanoatos</i>	42
3. <i>Melaza como fuente de carbono para la producción de polihidroxicanoatos</i>	42
VI. METODOLOGÍA	44
VII. RESULTADOS.....	55
A. CÁLCULO DE MASAS FINALES DE LA FERMENTACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES FINALES	56
B. COMPORTAMIENTO DE SUSTRATO, MICROORGANISMOS, POLIHIDROXIALCANOATOS Y SUBPRODUCTOS CON EL TIEMPO.....	57
C. ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE SEÑALES CARACTERÍSTICAS EN ESPECTROS IR PARA EL PHA OBTENIDO EN CADA FERMENTACIÓN.....	63
D. MODELOS MATEMÁTICOS PARA LA PREDICCIÓN DE SUSTRATO, MICROORGANISMOS Y POLIHIDROXIALCANOATOS CON EL TIEMPO.....	64
E. BALANCES DE MASA MOLECULARES CALCULADOS A PARTIR DE LA EXPERIMENTACIÓN REALIZADA.....	79
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	80
IX. CONCLUSIONES	93
X. RECOMENDACIONES.....	95
XI. BIBLIOGRAFÍA	97
XII. ANEXOS	102
A. DATOS ORIGINALES	102
B. CALCULOS DE MUESTRA	133
C. ANÁLISIS DE ERROR	144
D. DATOS CALCULADOS.....	147
E. ESPECTROS IR.....	166
F. ESPECIFICACIONES DE REACTIVOS Y EQUIPO	170
G. ILUSTRACIÓN DEL BALANCE DE MASA DEL SISTEMA.....	182

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. MODELOS CINÉTICOS UTILIZADOS PARA DESCRIBIR LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	34
CUADRO 2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE ESPECIES DE <i>BACILLUS</i>	38
CUADRO 3. PROPIEDADES DE PHAS COMPARADOS CON POLIÉSTERES, POLIPROPILENO (PP), TEREFTALATO DE POLIETILENO(PETP) Y NYLON 6,6 (N6,6)	41
CUADRO 4. CANTIDAD DE SALES PESADAS PARA CADA CORRIDA DE FERMENTACIÓN	45
CUADRO 5. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LAS EXPERIMENTACIONES Y ANÁLISIS REALIZADOS DURANTE LA FERMENTACIÓN DE AZUCARES INVERTIDAS DE MELAZA PARA LA PRODUCCIÓN DE PHA	55
CUADRO 6. RELACIÓN DE CONCENTRACIONES Y CONDICIONES EMPLEADAS EN LAS CORRIDAS EXPERIMENTALES	56
CUADRO 8. COMPARATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATO EN LAS FASES DE CRECIMIENTO CELULAR DETECTADAS PARA CADA CORRIDA EXPERIMENTAL.....	57
CUADRO 9. COMPARATIVO DE SEÑALES CARACTERÍSTICAS EN ESPECTROS IR PARA CADA CORRIDA EXPERIMENTAL Y ESTÁNDARES DE REFERENCIA	63
CUADRO 10. PARÁMETROS CINÉTICOS DEL MODELO DE CONTOIS PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1 CON EL MODELO DE LAS ECUACIONES 23 A 25	65
CUADRO 11. CONTINUACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DEL MODELO DE CONTOIS PARA LAS CORRIDAS EXPERIMENTALES 2 Y 3 CON EL MODELO DE LAS ECUACIONES 23 A 25	66
CUADRO 12. CONTINUACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DEL MODELO DE CONTOIS PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4 CON EL MODELO DE LAS ECUACIONES 23 A 25	67
CUADRO 13. PARÁMETROS CINÉTICOS DEL MODELO DE CONTOIS MODIFICADO PARA LAS CORRIDAS EXPERIMENTALES Y MODELO DE LAS ECUACIONES 26 A 35	74

CUADRO 14. FORMULACIÓN UTILIZADA PARA LA INVERSIÓN DE AZÚCARES DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	102
CUADRO 15. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRA TOMADAS CON EL TIEMPO ...	102
CUADRO 16. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA FERMENTACIÓN DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	103
CUADRO 17. DATOS OBTENIDOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA, SACAROSA Y FRUCTOSA PRESENTE EN LA MEZCLA REACTIVA A DIFERENTES TIEMPOS DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	104
CUADRO 18. MEDICIONES DE PH EN LA MEZCLA REACTIVA A DIFERENTES TIEMPOS DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	105
CUADRO 19. MASAS OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	106
CUADRO 20. MASAS OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA LUEGO DE PURIFICARLO Y SECARLO PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	106
CUADRO 21. CONCENTRACIONES DE AZÚCARES FERMENTABLES OBTENIDOS EN LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1 CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	107
CUADRO 22. DATOS CALCULADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PH EN LA MEZCLA REACTIVA A DIFERENTES TIEMPOS DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	107
CUADRO 23. FORMULACIÓN UTILIZADA PARA LA INVERSIÓN DE AZÚCARES DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	109
CUADRO 24. COMPOSICIÓN DEL BUFFER EMPLEADO EN LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	109
CUADRO 25. CANTIDADES EMPLEADAS EN LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA FERMENTACIÓN DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	110
CUADRO 26. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS PARA LA CORRIDA 2 TOMADAS CON EL TIEMPO.....	110
CUADRO 29. MEDICIÓN DE PH A DIFERENTES TIEMPOS PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2.....	112
CUADRO 31. MASAS OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2.....	113

CUADRO 32. MASAS OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA LUEGO DE PURIFICARLO Y SECARLO Y PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	114
CUADRO 33. DATOS OBTENIDOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SUBPRODUCTO DE LA FERMENTACIÓN DE AZÚCARES INVERTIDAS A DIFERENTES TIEMPOS DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	114
CUADRO 34. CONTINUACIÓN DE DATOS OBTENIDOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SUBPRODUCTO DE LA FERMENTACIÓN DE AZÚCARES INVERTIDAS A DIFERENTES TIEMPOS DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	115
CUADRO 35. DATOS OBTENIDOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA, SACAROSA Y FRUCTOSA PRESENTE EN LA MEZCLA REACTIVA A DIFERENTES TIEMPOS DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	115
CUADRO 36. MEDICIÓN DE PH A DIFERENTES TIEMPOS PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	116
CUADRO 37. FORMULACIÓN UTILIZADA PARA LA INVERSIÓN DE AZÚCARES DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	117
CUADRO 38. CANTIDADES DE REACTIVOS EMPLEADOS EN LA PREPARACIÓN DEL BUFFER PARA LA FERMENTACIÓN DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	118
CUADRO 39. CANTIDADES DE REACTIVOS EMPLEADOS EN LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA FERMENTACIÓN DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	118
CUADRO 40. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS PARA LA CORRIDA 3 TOMADAS CON EL TIEMPO.....	119
CUADRO 41. CONCENTRACIONES OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	120
CUADRO 42. MEDICIÓN DE PH A DIFERENTES TIEMPOS PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	121
CUADRO 43. MASAS OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	121
CUADRO 44. MASAS OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA LUEGO DE PURIFICARLO Y SECARLO PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	122
CUADRO 45. CONCENTRACIONES OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	122

CUADRO 46. MEDICIÓN DE PH A DIFERENTES TIEMPOS PARA TRIPLICADO DE CORRIDA EXPERIMENTAL 3.....	123
CUADRO 47. FORMULACIÓN UTILIZADA PARA LA INVERSIÓN DE AZÚCARES DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4	124
CUADRO 48. CANTIDAD EMPLEADA DE HIDRÓXIDO DE SODIO EN LA PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO 0.88 M PARA LA FERMENTACIÓN DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	125
CUADRO 49. CANTIDADES DE REACTIVOS EMPLEADOS EN LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA FERMENTACIÓN DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	125
CUADRO 50. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS PARA LA CORRIDA 4 TOMADAS CON EL TIEMPO.....	126
CUADRO 51. CONCENTRACIONES OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	127
CUADRO 52. MEDICIÓN DE PH A DIFERENTES TIEMPOS PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	128
CUADRO 53. MEDICIÓN DE PH A DIFERENTES TIEMPOS PARA TRIPLICADO DE CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	129
CUADRO 54. MASAS OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	129
CUADRO 55. MASAS OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA LUEGO DE PURIFICARLO Y SECARLO PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4	130
CUADRO 56. DATOS OBTENIDOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN DE AZÚCARES INVERTIDAS A DIFERENTES TIEMPOS DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4	131
CUADRO 57. CONCENTRACIONES OBTENIDAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	132
CUADRO 58. BALANCEO DE CARBONO, HIDRÓGENO Y OXÍGENO EN LA FERMENTACIÓN DE PHA	137
CUADRO 59. VALORES DE COEFICIENTES PARA LA ECUACIÓN (45).....	137
CUADRO 60. CANTIDAD DE SUSTANCIA AGREGADA PARA LAS FUENTES DE N, P Y SUSTRATO	141

CUADRO 61. DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES PARA LA ECUACIÓN (46)	143
CUADRO 62. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	147
CUADRO 63. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA LUEGO DE PURIFICARLO Y SECARLO PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	147
CUADRO 64. CONCENTRACIONES DE AZÚCARES FERMENTABLES CALCULADOS EN LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1 CON CROMATOGRFÍA LÍQUIDA Y TOMANDO EN CUENTA LAS DISOLUCIONES PREPARADAS	148
CUADRO 65. CONCENTRACIONES DE AZÚCARES FERMENTABLES TOTALES CALCULADOS EN LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1 CON CROMATOGRFÍA LÍQUIDA	149
CUADRO 66. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	150
CUADRO 67. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA LUEGO DE PURIFICARLO Y SECARLO Y PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 1	150
CUADRO 68. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	151
CUADRO 69. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA LUEGO DE PURIFICARLO Y SECARLO PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	151
CUADRO 70. CONCENTRACIONES CALCULADAS DE AZÚCARES FERMENTABLES EN LA MEZCLA REACTIVA A DIFERENTES TIEMPOS, PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	152
CUADRO 71. CONCENTRACIONES CALCULADAS DE AZÚCARES FERMENTABLES TOTALES EN LA MEZCLA REACTIVA A DIFERENTES TIEMPOS, PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	153
CUADRO 72. CONCENTRACIONES CALCULADAS DE SUBPRODUCTO PARA LA FERMENTACIÓN DE AZÚCARES INVERTIDAS A DIFERENTES TIEMPOS, PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	154

CUADRO 73. RENDIMIENTO DE SUBPRODUCTO CON RESPECTO AL CONSUMO DE SUSTRATO PARA LA CORRIDA 2.....	155
CUADRO 74. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	155
CUADRO 75. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 2	155
CUADRO 76. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	156
CUADRO 77. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA LUEGO DE PURIFICARLO Y SECARLO PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	156
CUADRO 78. CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	157
CUADRO 79. CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES TOTALES CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	158
CUADRO 80. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	159
CUADRO 81. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA CON LA TÉCNICA DE PESO SECO, LUEGO DE PURIFICAR Y SECAR Y PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	159
CUADRO 82. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4	160
CUADRO 83. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA LUEGO DE PURIFICARLO Y SECARLO PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	160
CUADRO 84. CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	161

CUADRO 85. CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES TOTALES CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	162
CUADRO 86. CONCENTRACIONES CALCULADAS DE SUBPRODUCTOS PARA LA FERMENTACIÓN DE AZÚCARES INVERTIDAS A DIFERENTES TIEMPOS, PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	163
CUADRO 87. CONCENTRACIONES TOTALES DE SUBPRODUCTOS PARA LA FERMENTACIÓN DE AZÚCARES INVERTIDAS A DIFERENTES TIEMPOS, PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4.....	164
CUADRO 88. RENDIMIENTO DE SUBPRODUCTO CON RESPECTO AL CONSUMO DE SUSTRATO PARA LA CORRIDA 4.....	165
CUADRO 89. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON LA TÉCNICA DE PESO SECO DE LA CORRIDA EXPERIMENTAL 3	165
CUADRO 90. MASAS Y CONCENTRACIONES CALCULADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PHA CON LA TÉCNICA DE PESO SECO, LUEGO DE PURIFICAR Y SECAR PARA LA CORRIDA EXPERIMENTAL 4	165
CUADRO 91. DATOS DE CALDO NUTRITIVO USADO EN PREPARACIÓN DE INÓCULOS.	170
CUADRO 92. DATOS DE ÁCIDO SULFÚRICO USADO EN LA INVERSIÓN DE AZÚCARES INVERTIDAS	170
CUADRO 93. DATOS DE HIDRÓXIDO DE SODIO USADO EN LA INVERSIÓN DE AZÚCARES INVERTIDAS	170
CUADRO 94. DATOS DE FOSFATO MONOPOTÁSICO USADO EN LA FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	170
CUADRO 95. DATOS DE FOSFATO SE DISÓDIO USADO EN LA FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.	170
CUADRO 96. DATOS DE BICARBONATO DE SODIO USADO EN LA FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	171
CUADRO 97. DATOS DE SULFATO DE MAGNESIO USADO EN LA FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	171
CUADRO 98. DATOS DE CLORURO DE CALCIO DIHIDRATADO USADO EN LA FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	171
CUADRO 99. DATOS DE CITRATO DE AMONIO FÉRRICO EN LA FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	171

CUADRO 100. DATOS DE SULFATO DE ZINC HEPTAHIDRATADO USADO EN LA FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.	171
CUADRO 101. DATOS DE CLORURO DE MANGANESO TETRAHIDRATADO USADO EN LA FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.	172
CUADRO 102. DATOS DE ÁCIDO BÓRICO USADO EN LA FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.	172
CUADRO 103. DATOS DE MOLIBDATO DE SODIO DIHIDRATADO USADO EN LA FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.	172
CUADRO 104. DATOS DE CLOROFORMO USADO EN LA EXTRACCIÓN DE PHA	172
CUADRO 105. DATOS DE AUTOMUESTREADOR ALS EQUIPO HPLC	172
CUADRO 106. DATOS DE BOMBA CUATERNARIA EQUIPO HPLC.....	173
CUADRO 107. DATOS DE COLUMNA EQUIPO HPLC.....	173
CUADRO 108. DATOS DE ESPECTRÓMETRO FTIR	173
CUADRO 109. DATOS DE MUESTREADOR ESPECTRÓMETRO FTIR	173
CUADRO 110. DATOS DE REACTOR EMPLEADO EN LA FERMENTACIÓN.....	173
CUADRO 112. DATOS DE POTENCIÓMETRO UTILIZADO EN LA MEDICIÓN DE PH PARA LAS FERMENTACIONES	173
CUADRO 113. DATOS DE INCUBADORA USADO EN LA EXTRACCIÓN DE PHA	173
CUADRO 114. DATOS DE VORTEX USADO EN EXTRACCIÓN DE PHA.....	174
CUADRO 115. DATOS DE ESTUFA UTILIZADA PARA LA INVERSIÓN DE AZÚCARES	174
CUADRO 116. DATOS DE BALANZA ANALÍTICA USADA PARA LA MEDICIÓN DE SALES PARA MEDIO DE CULTIVO, PESO SECO Y PRODUCCIÓN DE PHA	174
CUADRO 117. DATOS DE REACTOR PORTÁTIL HACH.....	174
CUADRO 118. DATOS DE KIT PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL	174
CUADRO 119. DATOS DE CENTRÍFUGA USADA PARA LA EXTRACCIÓN DE PHA.....	174

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS BIOPOLÍMEROS DE ACUERDO A SU FUENTE DE MATERIA PRIMA	16
FIGURA 2. FASES DE CRECIMIENTO CELULAR EN FUNCIÓN DEL TIEMPO....	18
FIGURA 3. REACTORES IDEALES A) REACTOR CONTINUO DE TANQUE AGITADO CSTR, B) REACTOR DE FLUJO PISTÓN PFR, C) REACTOR POR LOTES BATCH.....	20
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA OPERACIÓN DE UN REACTOR POR LOTES CON DENSIDAD CONSTANTE.....	21
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA OPERACIÓN DE UN CSTR CON DENSIDAD CONSTANTE.	22
FIGURA 6. DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO LIMITANTE SEGÚN LA ECUACIÓN DE MONOD.	24
FIGURA 7. CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS MICROORGANISMOS EN FUNCIÓN DE LA TIPOLOGÍA DE CÉLULAS DE LAS QUE ESTÁN CONSTITUIDOS.	35
FIGURA 8. ILUSTRACIÓN DE UNA CÉLULA TÍPICA BACTERIANA Y SUS ORGANELOS.	36
FIGURA 9. PROPUESTA DE METABOLISMO CENTRAL DE <i>B. CEREUS</i>	39
FIGURA 10. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y PRODUCTO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO PARA LA CORRIDA 1	57
FIGURA 11. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y MICROORGANISMOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO PARA LA CORRIDA 1	58
FIGURA 12. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y PRODUCTO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO PARA LA CORRIDA 2	58
FIGURA 14. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y SUBPRODUCTOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO PARA LA CORRIDA 2	59
FIGURA 15. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y PRODUCTO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO PARA LA CORRIDA 3	60
FIGURA 16. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y MICROORGANISMOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO PARA LA CORRIDA 3	60

FIGURA 17. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y PRODUCTO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO PARA LA CORRIDA 4	61
FIGURA 18. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y MICROORGANISMOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO PARA LA CORRIDA 4	61
FIGURA 19. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y SUBPRODUCTOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO PARA LA CORRIDA 4	62
FIGURA 21. MODELO CINÉTICO Y SU PREDICCIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA LA CORRIDA 2.....	69
FIGURA 22. MODELO CINÉTICO Y SU PREDICCIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA LA CORRIDA 3.....	70
FIGURA 23. MODELO CINÉTICO Y SU PREDICCIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA LA CORRIDA 4.....	71
FIGURA 24. MODELO CINÉTICO MODIFICADO Y SU PREDICCIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA LA CORRIDA 3	75
FIGURA 25. MODELO CINÉTICO MODIFICADO Y SU PREDICCIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA LA CORRIDA 4	76
FIGURA 26. CONTINUACIÓN DE MODELO CINÉTICO MODIFICADO Y SU PREDICCIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL PH EN LA CORRIDA 4	77
FIGURA 27. CONTINUACIÓN DE MODELO CINÉTICO MODIFICADO Y SU PREDICCIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA LA RELACIÓN C:N EN LA CORRIDA 4	78
FIGURA 28. COMPORTAMIENTO DEL PH PARA LA CORRIDA 1 CON EL TIEMPO.....	108
FIGURA 29. IDENTIFICACIÓN DE LAS FASES DE CRECIMIENTO CELULAR PARA LA CORRIDA 1.....	108
FIGURA 30. COMPORTAMIENTO DEL PH PARA CORRIDA 2 CON EL TIEMPO	116
FIGURA 31. IDENTIFICACIÓN DE LAS FASES DE CRECIMIENTO CELULAR PARA LA CORRIDA 2.....	117
FIGURA 32. COMPORTAMIENTO DE PH PARA CORRIDA 3 CON EL TIEMPO.	123
FIGURA 33. IDENTIFICACIÓN DE LAS FASES DE CRECIMIENTO CELULAR PARA LA CORRIDA 3.....	124
FIGURA 34. COMPORTAMIENTO DE PH PARA CORRIDA 4 CON EL TIEMPO.	132

FIGURA 35. IDENTIFICACIÓN DE LAS FASES DE CRECIMIENTO CELULAR PARA LA CORRIDA 4.....	133
FIGURA 36. ESPECTRO IR PARA LA CORRIDA 1.....	166
FIGURA 37. ESPECTRO IR PARA LA CORRIDA 2.....	166
FIGURA 38. ESPECTRO IR PARA LA CORRIDA 3.....	167
FIGURA 39. ESPECTRO IR PARA LA CORRIDA 4.....	167
FIGURA 40. COMPARACIÓN DE ESPECTROS IR DE CORRIDA 2 Y CORRIDA 3 CON ESTÁNDARES DE PHA.....	168
FIGURA 41. COMPARACIÓN DE ESPECTROS IR DE CORRIDA 2 Y CORRIDA 3 CON ESTÁNDARES DE PHA.....	168
FIGURA 42. COMPARACIÓN DE ESPECTROS IR DE CORRIDA 4 CON ESTÁNDARES DE PHA.....	169
FIGURA 43. COLUMNA AGILENT HI-PLEX H.....	175
FIGURA 44. EQUIPO HPLC UTILIZADO EN LOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	176
FIGURA 47. DATOS PLAZA DE BALANZA ANALÍTICA UTILIZADA PARA LA MEDICIÓN DE SALES EN EL MEDIO DE CULTIVO, PESO SECO Y GENERACIÓN DE PHA.....	178
FIGURA 48. ESPECTRÓMETRO FTIR PERKINELMER.....	178
FIGURA 49. ACCESORIO DE MUESTREO PARA EL ESPECTRÓMETRO FT-IR.....	179
FIGURA 50. POTENCIÓMETRO STARTER300.....	179
FIGURA 51. KIT DE REACTIVOS HACH UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL.....	180
FIGURA 52. INCUBADORA DE CONVECCIÓN VWR SYMPHONY.....	180
FIGURA 53. CENTRÍFUGA EPPENDORF 5804R.....	181
FIGURA 54. PIEZA FABRICADA CON EL PHA EXTRAÍDO DE LAS DIFERENTES CORRIDAS REALIZADAS.....	181
FIGURA 55. BALANCE DE MASA DEL SISTEMA FERMENTATIVO.....	182

RESUMEN

La fermentación de PHA con *B. cereus* es una reacción compleja que involucra una cantidad considerable de variables. Por lo tanto, para determinar una cinética que englobe la complejidad de dicha fermentación, se cuantificaron microorganismos, azúcares totales y producto, variando las condiciones de pH y relación C:N elemental en cuatro arreglos experimentales, utilizando azúcares invertidas como sustrato en un reactor New Brunswick 3364M. Se determinó que las relaciones C:N 172.53 ± 1.46 (m/m) a pH promedio 5.70 ± 0.78 y C:N 20 ± 0.62 (m/m) a pH promedio 6.5420 ± 0.44 presentaron los mayores rendimientos de las condiciones evaluadas. Teniendo rendimientos de microorganismos con respecto a sustrato ($y_{x/s}$) de $72.96 \pm 1.81\%$ (m/m) y $60.53 \pm 1.35\%$ (m/m) respectivamente; y rendimientos de concentración de producto con respecto a consumo de sustrato ($y_{p/s}$) de $71.45 \pm 1.63\%$ (m/m) y $52.27 \pm 1.11\%$ (m/m) respectivamente.

Se determinó que el modelo de Contois predice las concentraciones de microorganismos, PHA y azúcares cuando no hay incidencia externa en el pH, ya sea por el uso de un buffer o dejando libre el rango de concentración de hidronios generados en el medio. Mientras que en el caso de la regulación del pH, se observó la necesidad de modificar el modelo de Contois con coeficientes viriales, o una forma derivada del modelo de Tissier y coeficientes de transferencia de masa, para predecir el comportamiento de las variables medidas y calculadas.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de plásticos a partir de petróleo, ha provocado una generación de desechos que no son degradables y repercuten de forma negativa en los ecosistemas. Estos desechos se han ido acumulando en agua y suelos, creando preocupaciones por parte de la población; ya que no son degradables y su disposición no se realiza de acuerdo a las normativas y procedimientos técnicamente desarrollados. Por otro lado, se sabe que las reservas de petróleo se están agotando lo cual representa un obstáculo para el uso de los polímeros convencionales a largo plazo. A partir de esto se ha establecido la necesidad de desarrollar nuevas fuentes de producción de polímeros; en donde se empleen procesos sostenibles, con productos y materiales amigables al ambiente.

De este contexto surgen como una potencial solución los biopolímeros. Debido a su origen y proceso de producción, han sido un foco para múltiples estudios en donde se han analizado estructuras y aplicaciones. Uno de los tipos de biopolímeros que más resaltan son los polihidroxialcanoatos, puesto que sus propiedades físicoquímicas y mecánicas son similares a las de algunos polímeros derivados del petróleo. Realizando una comparación entre polímeros convencionales y los polihidroxialcanoatos, estos últimos se podrían considerar una de las mejores alternativas en términos de sostenibilidad; dado que se caracterizan por ser un producto que se puede obtener de múltiples fuentes de carbono y con diferentes tipos de microorganismos en una fermentación controlada.

Entre las fuentes potenciales de carbono, los azúcares residuales de los ingenios azucareros, que se obtienen del proceso de cristalización, con el nombre de melaza, son una fuente para la producción de PHA, ya que presenta una opción a los productos tradicionales para los que se emplea este subproducto. Mientras que los microorganismos utilizados, comúnmente pertenecen al género *Bacillus*, por sus acelerados crecimientos reportados y sensibilidad a concentraciones de componentes fermentativos, que inducen la formación de polímeros buscados.

Para contar con la información necesaria para escalar el proceso y poder predecir el comportamiento de la fermentación, es esencial contar con un modelo cinético, que logre expresar las concentraciones de los componentes de la fermentación en función del tiempo. Su determinación se basa comúnmente en técnicas de simulación de procesos con modelos matemáticos, que emplean modelos explicativos del crecimiento microbiano para correlacionar variables. Estos modelos son la base para determinar rendimientos y concentraciones a diferentes escalas; además son fundamentales para calcular el volumen de los biorreactores.

En el presente estudio, se encuentran en los apartados de resultados, discusión y conclusiones, las principales deducciones efectuadas respecto a modelos cinéticos de la fermentación de melaza para producir PHA. Los apartados de Anexos, metodología, marco teórico y antecedentes, completan la información presentada con las bases y cálculos efectuados.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Proponer un modelo cinético para la producción de polihidroxicarboxilatos a partir de Melaza, utilizando condiciones previamente reportadas.

B. Objetivos específicos

1. Cuantificar concentración de azúcares, microorganismos y polihidroxicarboxilatos utilizando métodos analíticos para establecer rendimientos de reacción.
2. Determinar un modelo matemático que permita predecir concentraciones de azúcares, microorganismos y polihidroxicarboxilatos con el tiempo.
3. Determinar la influencia de las principales condiciones de fermentación sobre la producción de polihidroxicarboxilatos para incluirla en el modelo cinético.

III. ANTECEDENTES

En una fermentación es importante considerar el tipo sustrato a emplear y las condiciones a la cual se efectuará la reacción. Finalizada la fermentación, se debe de tomar en cuenta un método de purificación del producto de interés, que sea adecuado para lograr la mayor cantidad de extracción de producto posible y lograr así rendimientos altos. Con base en los resultados obtenidos, se pueden realizar simulaciones para determinar el modelo cinético que presente un mejor ajuste a los datos experimentales.

A. Sustratos empleados en la producción de PHA

Para la producción de PHA se busca el uso de fuentes de carbono procedentes de residuos industriales. Tales residuos vienen desde el uso de los ácidos grasos presentes en residuos de aceites vegetales, hasta el uso de los lodos producidos en el tratamiento de aguas residuales. La búsqueda de estas fuentes alternas de sustrato, se fundamenta en la reducción de costos que fomenta el uso de un residuo [1]. Además le brinda a la empresa, la capacidad de generar un producto de una materia prima que no se estaba aprovechando [2].

Un primer ejemplo del uso de residuos industriales como sustrato para producir PHA, corresponde al uso de Glicerol, un subproducto de la industria del Biodiesel. Al utilizar este sustrato con el microorganismo de *B. cereus*, se reportan rendimientos de crecimiento celular de 3.72 g/L y un rendimiento de producción de PHA de 2.54 g/L [3]. Otro material residual a mencionar se encuentra en la industria lechera; en donde se puede observar el uso de la proteína de leche proveniente del proceso de producción de quesos. En esta investigación se determinó que utilizando

P. Hydrogenovara se puede obtener un rendimiento de biomasa de 5.0 g/L y un rendimiento de PHA de 1.27 g/L [4].

Otro sustrato de gran interés es la melaza. Esta ha sido objeto de estudio debido a su amplia disponibilidad en la industria azucarera y según investigaciones, puede ser aprovechada para obtener rendimientos de hasta 6.0 g/L de PHA al ser utilizada como fuente de carbono [5]. A su vez, se ha logrado una acumulación de PHA del 62.21% (m/m) utilizando el microorganismo *B. subtilis* y acompañando con etanol [6]. Al comparar sustratos como maíz, melaza, jarabe y pasta fermentada, se observó que el segundo sustrato con mayor acumulación de PHA fue la melaza, con una acumulación del 20%(m/m) [7].

Según investigaciones realizadas en el Centro de Procesos Industriales (CPI), se establece que al invertir la melaza, se puede aumentar la producción máxima de PHA debido al aumento de glucosa y fructosa en el medio de fermentación [8]. En contraste a esta investigación, se ha observado que al comparar el uso de glucosa, sacarosa, fructosa, lactosa y n-octano, el carbohidrato que genera la mayor cantidad de PHA era la glucosa, teniendo un rendimiento de producto de 4.2 g/L [9]. A su vez dentro de las investigaciones del CPI, se estableció que la concentración que genera una mayor producción de polihidroxialcanoatos es de 3%(m/v) y la cepa a utilizar con la melaza que genera un mayor rendimiento es la *B. cereus*, con la cual se obtuvo un rendimiento de producto respecto a sustrato de 0.858%(m/m). La melaza utilizada en cuestión presentó los siguientes valores de propiedades fisicoquímicas [10]:

- Contenido de sacarosa: 35.56%(m/v)
- Contenido de fructosa: 5.36%(m/v)
- Contenido de glucosa: 5.88%(m/v)
- Azúcares totales fermentables: 46.8%(m/v)
- Densidad @ 25°C: 1.25 g/mL
- Humedad base seca: 2.54%(m/m)

- Viscosidad cinemática: 2.37×10^4 cSt
- Grados brix: 87.15 %

B. Condiciones de fermentación

Las fermentaciones se ven influenciadas por las condiciones a las cuales se llevan a cabo. Es por esto que según una primera investigación, se utiliza comúnmente hidróxido de sodio y ácido clorhídrico para regular el pH a un valor de 7 [11]. Con respecto a la influencia del pH en la fermentación utilizando melaza como sustrato, se investigó la producción de PHA en un rango de pH de 5 a 9 y a temperaturas de 20, 25, 30, 35 y 40 °C utilizando *B. subtilis*. Los resultados indicaron que se obtenía una mayor producción de PHA a un pH de 7 y una temperatura de 35 °C [6]. A su vez, se volvió a observar este comportamiento al utilizar melaza y trabajando con *Enterobacter*, en donde nuevamente los valores óptimos resultaron ser el trabajar a un pH de 7 y una temperatura de 35 °C.[12].

De igual manera, dentro de las condiciones que afectan el crecimiento de microorganismos en la fermentación es la concentración de las sales presentes en el medio. Es por esto que para la producción de PHA se utiliza una concentración de sales en el medio (g/L) de: NH_4Cl 1.0, NaHCO_3 0.5, KH_2PO_4 2.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01, citrato de Fe (NH_4) 0.05 con elementos traza como $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03, H_3BO_3 0.3, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 [6]. De la misma forma, las relaciones C:N y C:P afectan el contenido de PHA que se genera en el medio. De acuerdo a Supono *et al.* [13] se ha determinado que la producción óptima de polihidroxibutirato se obtuvo con una relación C:N de 20.9 en donde se obtuvo un contenido de PHB de 29.25 mg/g junto con una relación C:P de 125.

C. Extracción de PHA

El proceso de purificación de PHA es un paso determinante para el sistema de fermentación. Es por esto que se han realizado investigaciones, con respecto a los solventes y etapas a emplear para mejorar la extracción de dicho producto. Al utilizar centrifugación combinado con un tratamiento químico, se han obtenido purezas de 98.5% (m/m) y un porcentaje de recuperación de PH3B del 80% [14]. A su vez, se ha reportado que combinar un tratamiento de hipoclorito de sodio y centrifugación conduce a una pureza de 96.5% y una recuperación de 80% en el proceso de optimización [15]. Pese a esto, se recomienda utilizar concentraciones de hipoclorito de sodio menores al 10%, ya que puede causar una degradación severa del PHB resultando en una reducción del 50% en el peso molecular [16].

Sin embargo, como bien mencionaba Jacquél *et al.* [17] los mejores resultados se obtienen al combinar en el tratamiento químico hipoclorito de sodio con cloroformo. Como se observa en la investigación de Salmiati *et al.* [18], un posible proceso de extracción es el uso de partes iguales de hipoclorito de sodio al 6% y cloroformo. El cual luego es agitado a 300 rpm y 37°C por 3 horas, para posteriormente centrifugar la muestra a 3000 rpm. El sobrenadante es filtrado y utilizando metanol frío, se precipita el PHA para luego dejar secando a 60°C.

D. Modelos cinéticos para la producción de PHA

Para la producción de PHA en una planta piloto de manera continua, se obtuvo un modelo matemático que permite la predictibilidad de la generación de PHA utilizando aguas residuales del procesamiento de leche y la producción de helado. El sistema integrado consistía en un reactor acidogénico anaeróbico (AAR), un reactor sludge convencional activado (ASPR) y un reactor de síntesis de PHA (PHAR). De estos, se estudiaron las cinéticas para el ASPR y el PHAR. El máximo coeficiente de rendimiento de PHA con respecto a la degradación del COD (Y_{sp}^{max}) en el PHAR fue de 0.25 kgPHA/kg de COD degradado. De igual manera se obtuvo como resultado parámetros cinéticos como K_s , μ_{max} , y_{obs} y k_d para el ASPR de 37.16 mg/L COD, 0.97 d⁻¹, 0.51mg MLSS/mg COD y 0.049 d⁻¹ respectivamente [19].

En el caso de una producción de PHA por batch, se ha investigado los parámetros cinéticos para sustratos como glucosa y fructosa. Dentro de estos se determinó que los valores experimentales, se podían describir con un modelo simplificado de Monod. Las constante de velocidad específica de crecimiento $\mu_{\text{máx}}$ y los valores de la constante de Monod K_s , fueron de 0.36 h^{-1} y 106 g/L para la glucosa. Mientras que para la fructosa se obtuvieron valores de 0.24 h^{-1} y 80 g/L . Debido a que la relación entre los valores experimentales y los datos predecidos era buena, se estableció que el modelo con ecuaciones diferenciales describe el proceso de fermentación de PHA por lotes [20].

IV. JUSTIFICACIÓN

El mercado global de azúcar se pronostica va presentar un valor de \$407.30 (Q7.81/\$1) por tonelada en 2021, lo cual representa un valor del 3.2% por debajo de los valores reportados a finales del 2020. Dentro de este pronóstico, se estima que los precios para el cierre del 2021 sea de 14.5 centavos de dólar por libra, lo cual se encuentra 6.4% debajo de los precios durante el cierre del 2020. La misma tendencia se observa con sus otros dos productos, los cuales son la cogeneración y la producción de etanol. Ante este contexto, debido a la falta de diversidad en el catálogo de productos de los ingenios, se crea una vulnerabilidad con cualquier cambio en la demanda y precios del azúcar a nivel global. Esto provoca un interés de dicha industria por encontrar nuevos productos potenciales, que diversifiquen su cartera de clientes y disminuyan riesgos financieros.

Por otro lado, el mercado global de plásticos fue valuado en \$579,700 millones en 2020 y se espera que se expanda con un índice anual de crecimiento de 3.4% hasta el 2028. Dentro de este mercado, los biopolímeros tienen un rápido crecimiento. El caso particular del PHA, representa un valor de mercado de \$62 millones para 2020 con crecimiento proyectado de 14.2% hasta 2025. Su acelerado crecimiento se debe a la demanda de la industria de empaque, biomédica y agro por materiales biodegradables.

Derivado del mercado de plásticos y azúcar, una de las alternativas prometedoras que puede estudiarse son los polihidroxialcanoatos (PHA). Estos polímeros se han estudiado en varias condiciones y procesos. Sin embargo, se carece de la información suficiente para el escalamiento de los procesos estudiados, así como de modelos predictivos que permitan el control de sistemas fermentativos. Por estas razones, en este trabajo se propuso un modelo cinético de la reacción de

producción de PHA, que permite predecir el comportamiento de las concentraciones de producto, microorganismos, sustratos y subproductos en función del tiempo.

De manera que, empleando ecuaciones de diseño, se puede aplicar dicho modelo a desarrollos específicos en la industria, que van desde el diseño y selección de equipos, hasta el control y automatización de los equipos principales y auxiliares empleados en la fabricación de estos materiales.

Este estudio continúa, además, las líneas de investigación realizadas en 2020 en el Centro de Procesos Industriales y en el departamento de Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala, partiendo de resultados exploratorios iniciales, para proponer el modelo cinético de la reacción de producción de PHA empleando melaza como fuente de carbono.

V. MARCO TEÓRICO

A. POLÍMEROS

Los polímeros son moléculas grandes, compuestas por unidades repetidas más pequeñas denominadas monómeros. Al referirse al tema de *polímeros*, se habla principalmente de aquellos que se producen de manera sintética, mejor conocidos como *polímeros orgánicos sintéticos* [21]. Para convertir un monómero a un polímero, se debe de pasar por un proceso de polimerización. Durante este proceso, los monómeros se combinan para crear cadenas más largas o macromoléculas, dependiente de la temperatura, presión y catálisis propiciadas al sistema. Las unidades constituyentes repetidas, se unen por enlaces covalentes y aquellas moléculas que presentan solo unas cuantas unidades constituyentes se les denominan oligómeros [22].

1. Tipos de polímeros

Existen dos tipos de polímeros sintéticos, los cuales son los polímeros por crecimiento en cadena y los polímeros por crecimiento por etapas [22].

a. Polímeros por crecimiento en cadena

En este tipo de polímeros, el alargamiento se realiza en los extremos de la molécula. Esto tiene lugar, debido a la rapidez en la adición de monómeros y tiene a su vez, la formación de un reactivo intermediario como por ejemplo un catión, radical o anión, en el extremo en donde se da el crecimiento de la cadena. A estos polímeros se les denomina polímeros de adición [21].

b. Polímeros por crecimiento en etapas

Los polímeros por crecimiento en etapas, se dan a partir de moléculas bifuncionales, las cuales pueden reaccionar entre sí para formar enlaces. Es decir, los monómeros pueden unirse para crear diferentes compuestos. En su mayoría, estas polimerizaciones implican condensaciones para poder dar lugar a la formación de enlaces con derivados de ácido, como por ejemplo los enlaces ésteres o amidas [21].

2. Estructura y propiedades de los polímeros

A pesar que los polímeros no se puedan cristalizar y fundir, se han observado regiones cristalinas presentes a las cuales se les denomina *cristalitos*. Entre mayor sea la región cristalina en un polímero, por lo general será más denso y presentará una mayor resistencia y rigidez. Asimismo, la estereoquímica también es un factor que afecta la cristalinidad de un polímero. En general se observa que los polímeros isotácticos y sindiotácticos estereorregulares, presentan mayor cristalinidad que los polímeros atácticos. Es por ello que se debe de seleccionar catalizadores que promueva la formación de de polímeros lineales con estereoquímica isotáctica o sindiotáctica [21].

De acuerdo a la temperatura en que se encuentren, se puede observar diferentes características físicas dentro de los polímeros. A temperaturas bajas, los polímeros son sólidos e inflexibles. Mientras aumenta la temperatura, los polímeros alcanzan un punto en donde se vuelve flexible y moldeable. Dicho punto se le denomina temperatura vítrea, la cual es característica para cada polímero. A medida que se eleve más la temperatura, los polímeros pueden alcanzar la temperatura de fusión cristalina, la cual indica la fundición de los cristalitos y la capacidad de las moléculas individuales de moverse entre sí. Es en esta temperatura en donde los polímeros pueden ser extruidos y formar fibras [21].

B. BIODEGRADABILIDAD

La biodegradabilidad es la capacidad que presenta un material de gran peso molecular, para descomponerse en partículas de menor tamaño, a partir de la interacción con elementos biológicos. Esta característica en los plásticos, se considera se cumple cuando los materiales poliméricos se pueden descomponer en compuestos como dióxido de carbono, agua, compuestos inorgánicos o biomasa [23]. La capacidad de biodegradabilidad en un polímero se considera como una solución al impacto ambiental que los plásticos ocasionan. Además, ofrecen una gran cantidad de ventajas dado que pueden aumentar la fertilidad de la tierra y pueden ser reciclados para convertirlos a metabolitos de gran utilidad, a partir del uso de microorganismos y enzimas [24].

La tasa de biodegradabilidad puede variar de horas hasta años, dependiendo en gran medida de la naturaleza de los grupos funcionales y del grado de complejidad de la estructura molecular que presente el polímero. Es por ello que para controlar dicha tasa, se debe de tomar en cuenta la construcción de una estructura molecular adecuada o evaluar el uso de catabolismos para lograr la disminución de los polímeros de cadenas largas [25].

C. COMPOSTABILIDAD

El compost es el proceso inducido que controla la descomposición y transformación biológica de materiales biodegradables en una sustancia parecida al humus, llamada compost. Muchos de estos procesos generan gases como producto de la degradación de materiales, los cuales deben manejarse adecuadamente y en muchos casos, empleados como combustibles para procesos de generación energética [26].

Mientras que un plástico compostable es aquel que sufre degradación por procesos biológicos al colocarse en un compost activo y produce en el proceso CO₂, agua, compuestos inorgánicos y biomasa, todo esto a una tasa consistente con otros

materiales compostables conocidos y sin dejar residuos visibles, distinguibles, tóxicos o contaminantes [26].

1. Producción de metano con compost

El proceso de producción de metano a partir de residuos orgánicos normalmente se lleva a cabo por una digestión anaeróbica, en la que se genera dicha molécula, con dióxido de carbono y otros componentes minoritarios. Este gas es empleado comúnmente como combustible para generación de energía [26].

La digestión anaeróbica es un proceso biológico complejo y degradativo en el cual parte de los materiales orgánicos de un sustrato (residuos animales y vegetales) son convertidos en biogás, mezcla de dióxido de carbono y metano con trazas de otros elementos, por un consorcio de bacterias que son sensibles o completamente inhibidas por el oxígeno o sus precursores. Utilizando el proceso de digestión anaeróbica es posible convertir gran cantidad de residuos, residuos vegetales, estiércoles, efluentes de la industria alimentaria y fermentativa, de la industria papelera y de algunas industrias químicas, en subproductos útiles. En la digestión anaerobia más del 90% de la energía disponible por oxidación directa se transforma en metano, consumiéndose sólo un 10% de la energía en crecimiento bacteriano frente al 50% consumido en un sistema aeróbico [26].

D. BIOPOLÍMEROS

Los polímeros sintéticos convencionales, se obtienen a partir del petróleo. Sin embargo, en la última década se ha observado la necesidad de descentralizar al petróleo como materia prima para una gama amplia de productos. Los polímeros no son la excepción, ya que dentro de estos, los biopolímeros han tomado auge. La razón de esto se debe principalmente que los biopolímeros se pueden sintetizar a partir de desechos orgánicos naturales, lo cual es más llamativo viéndolo desde el punto de vista de la sostenibilidad [27].

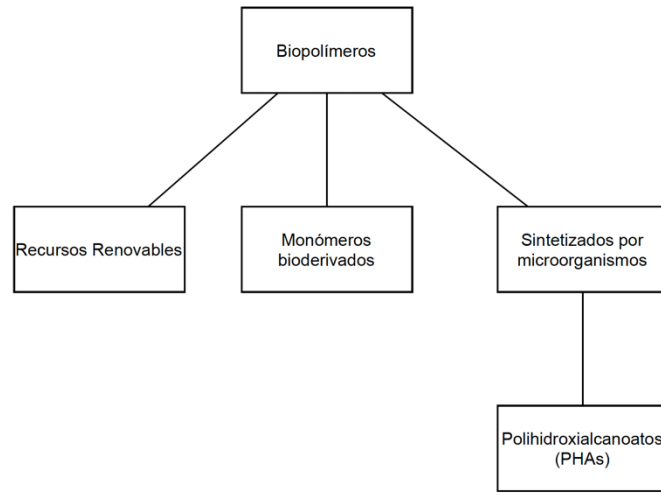
Los biopolímeros a su vez, según indica Reddy *et al.* [28], presentan “la ventaja de poder ser procesados con las mismas tecnologías que se utilizan con los polímeros convencionales; tales como la extrusión, inyección o soplado”. Asimismo, presentan las mismas aplicaciones, ya que se pueden utilizar en la industria textil, empaques, equipo médico, entre otros [29].

E. CLASIFICACIÓN DE BIOPOLÍMEROS

Los polímeros se pueden clasificar a partir de su origen, es por ello que aquellos provenientes del petróleo son nombrados sintéticos y los que se obtienen de recursos renovables son conocidos como biopolímeros. A pesar de ello, no necesariamente se tienen que basar en materias primas renovables para poder ser biopolímeros; ya que existen polímeros sintéticos que son biodegradables y por lo tanto se les reconoce como biopolímeros. De la misma forma, no todos los biopolímeros que utilizan de materia prima recursos renovables son biodegradables [30].

De acuerdo a Valero-Valdivieso *et al.* [31], los biopolímeros se pueden clasificar a partir de su fuente de materia prima. Es por ello que se pueden simplificar en tres categorías; los que se basan en recursos renovables, los polímeros que se basan en monómeros bioderivados y los que son sintetizados por microorganismos. Dentro de la última categoría se encuentran los polihidroxicanoatos, mejor conocido como PHA.

Figura 1. Clasificación de los Biopolímeros de acuerdo con su fuente de materia prima



Fuente: (Rodríguez-Sepúlveda & Orrego-Alzate, 2016)

F. FERMENTACIÓN

Una fermentación consiste de un sistema en el que sustratos se convierten en productos por la interacción con microorganismos. Dicha interacción produce cambios en el sistema a través de las rutas metabólicas de los organismos vivos, que cambian poblacionalmente por su ciclo de vida, a la vez que generan productos y subproductos [32].

De manera que, cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para fabricar nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota, este sería el sustrato limitante. Consecuentemente el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por las mismas células, como puede ser una alta concentración de alcohol [32].

Si se supone que en este caso se detiene el crecimiento a causa del agotamiento del sustrato limitante, se puede considerar dos aspectos fundamentales que definen al crecimiento microbiano. Estos aspectos serían, por un lado el

estequiométrico, ya que la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y por la otra parte el de tipo cinético, el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso [32].

1. Crecimiento celular

Inicialmente el mosto es un medio adecuado para el crecimiento y poco a poco se va volviendo inhóspito debido a la disminución de azúcares y nutrientes y al incremento de la concentración de alcohol u otros compuestos. Cuando el medio es favorable, los microorganismos se multiplican por vía vegetativa asexual durante la mitosis, mientras que al final de la fermentación, comienzan usualmente a reproducirse sexualmente por meiosis, señal de que el medio de vida es muy desfavorable como consecuencia de la falta de nutrientes [32].

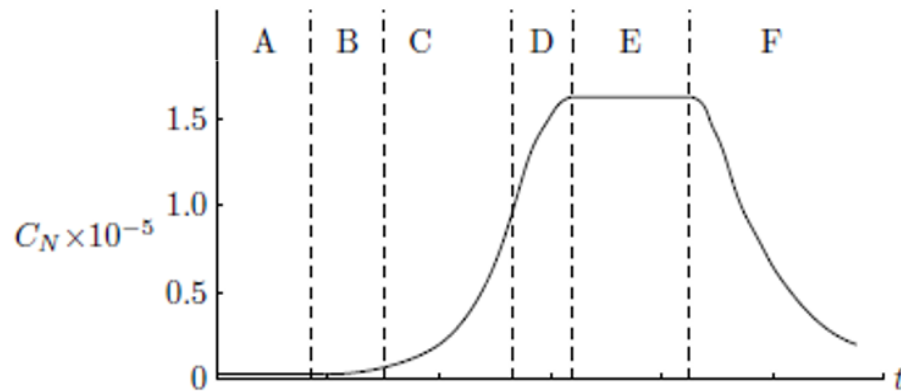
En el metabolismo celular, no todo el sustrato es consumido para la formación de nueva biomasa, sino que parte se emplea para el mantenimiento celular, otra para la producción de producto y otra parte se dirige al desarrollo celular. Por esto, surge el concepto de rendimiento global estequiométrico (teórico) y el aparente. El rendimiento estequiométrico se define como la cantidad de biomasa o producto formado por la cantidad de sustrato consumido con esa finalidad. El rendimiento estequiométrico sería la cantidad de biomasa o producto presente entre la cantidad total de sustrato consumido [32].

El rendimiento teórico es difícil de hallar ya que el proceso es complejo y no se puede averiguar qué cantidad de sustrato va dirigido a la formación de nuevas células y a sus funciones vitales [32].

El crecimiento celular consta de cuatro fases (ver Figura 2), la primera se refiere a la fase de latencia, donde las células permanecen inactivas. La segunda fase es la de crecimiento exponencial, el medio rico en nutrientes propicia tal desarrollo hasta llegar hasta la tercera fase. Esta es la fase estacionaria, en ella el

número de células que crecen nuevas es igual al número de células que perecen. La última fase corresponde con un medio hostil donde se carece de alimento para el desarrollo de la biomasa y se llega a la muerte de tales organismos [32].

Figura 2. Fases de crecimiento celular en función del tiempo



Fuente: (Lee, 2009).

La descripción detallada para cultivos por lotes, describe la densidad celular de los microorganismos a lo largo del tiempo en un cultivo. Está conformado por las siguientes fases:

- A. *Adaptación*: es la fase inicial en la cual las células se adaptan al medio y las condiciones del ambiente. A pesar de que no existe un cambio en el número de células, éstas crecen y aumentan su tamaño. La duración de esta fase es variable y depende de factores como la edad de las células, la concentración del inóculo, la composición del cultivo y las condiciones a las que está expuesto [32].
- B. *Aceleración*: se incrementa en número de células y la velocidad de división celular alcanza un punto máximo que gráficamente se ve como un mínimo en una curva típica de crecimiento celular como la que se muestra en la Figura 2 [32].

- C. *Crecimiento exponencial*: en esta fase, el número de células se incrementa de manera exponencial. La velocidad de crecimiento se mantiene en aumento, mientras que la tasa de división celular permanece constante [32].
- D. *Desaceleración*: se caracteriza por un descenso en la velocidad de crecimiento celular, así como en la tasa de división [32].
- E. *Estacionaria*: no existe cambio neto del número de células en la población. La concentración celular permanece en el valor máximo alcanzado durante la fase de crecimiento exponencial. El agotamiento de nutrientes o la presencia de productos tóxicos formados durante el metabolismo de las células limitan su crecimiento [32].
- F. *Muerte*: las células comienzan a morir. El número de células viables en el medio decrece tras haber agotado los nutrientes disponibles en el medio y la energía almacenada [32].

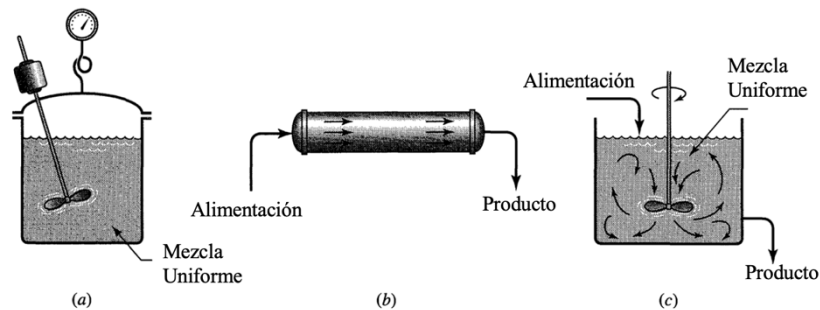
G. REACTORES

Existen tres tipos de reactores ideales:

- Reactor por lotes (Batch): En este equipo, los reactivos se cargan en un contenedor, se mezclan entre sí y permanecen por un tiempo hasta que se haya llevado a cabo la reacción, finalizando con la descarga del producto [33].
- Reactor en flujo pistón (PFR, plug-flow reactor): Puede operar tanto en continuo como por lotes y se le conoce de esta manera por el tipo de flujo que maneja, debido a que no hay elementos de mezclado a lo largo del paso del flujo [33].

- Reactor continuo de tanque agitado (CSTR, continuous stirred tank reactor): Este reactor contiene un agitador o un elemento que permite la mezcla de los reactivos, de tal forma que existe una buena homogenización y un estado estacionario. Posee un flujo de entrada y salida, que permiten conservar las condiciones estacionarias en el equipo [33].

Figura 3. Reactores ideales a) reactor por lotes Batch, b) reactor de flujo pistón PFR, c) reactor continuo de tanque agitado CSTR.



Fuente: (Levenspiel, 1999).

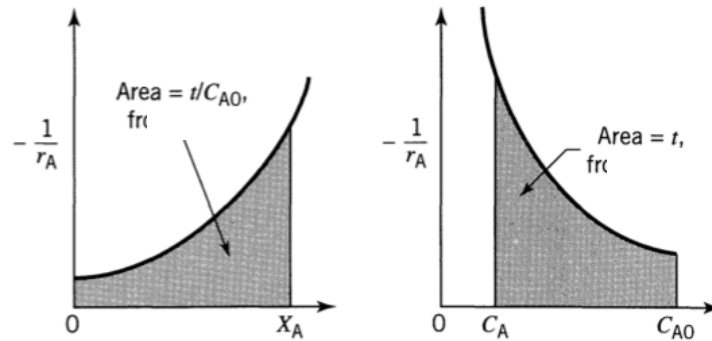
En el caso del reactor por lotes el tiempo de reacción para llegar a una conversión específica de sustrato (X_A) partiendo de una concentración de sustrato (C_{A0}) cuando la densidad permanece constante se describe de la siguiente manera [33]:

Ecuación 1. Tiempo de reacción en un reactor por lotes con densidad constante.

Donde C_{A0} es la concentración inicial de sustrato, X_A la conversión del sustrato y $-r_A$ la velocidad de consumo de sustrato. Fuente: Levenspiel, 1999

$$t = C_{A0} \int_0^{X_A} \frac{dX_A}{-r_A} = - \int_{C_{A0}}^{C_A} \frac{dC_A}{-r_A}$$

Figura 4. Representación gráfica de la operación de un reactor por lotes con densidad constante.



Fuente: (Levenspiel, 1999).

El tiempo requerido para que se lleve a cabo la reacción puede ser determinado con el área debajo de la curva de $-1/r_A$ [33].

En el caso de los reactores PFR y CSTR se utilizan dos términos diferentes: espacio-tiempo τ y el espacio-velocidad s . El espacio-tiempo se refiere al tiempo requerido para procesar un volumen de alimentación a condiciones específicas, mientras que el espacio-velocidad es el número de volúmenes de alimentación a condiciones específicas que pueden ser tratados en una unidad de tiempo. El reactor PFR comparte la misma ecuación de diseño que un reactor por lotes, únicamente se hace la distinción del uso del espacio-tiempo en vez del tiempo de reacción [33].

Ecuación 2. Relación entre el espacio-tiempo y el espacio-velocidad. Donde C_{A0} es la concentración inicial de sustrato, V el volumen del reactor y F_{A0} el flujo de alimentación.

Fuente: Levenspiel, 1999

$$\tau = \frac{1}{s} = \frac{C_{A0}V}{F_{A0}}$$

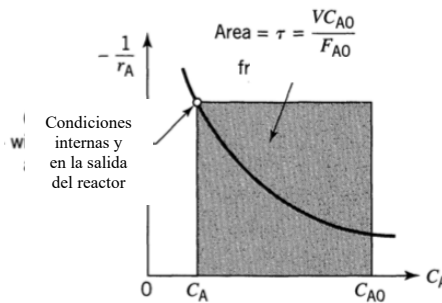
Los CSTR tienen una concentración homogénea en todo el sistema, por lo que alcanzan un estado estacionario. Por lo tanto, el espacio-tiempo se describe de la siguiente manera:

Ecuación 3. Espacio-tiempo para un CSTR. Donde C_{A0} es la concentración inicial de sustrato, X_A la conversión de sustrato, C_A la concentración instantánea de sustrato y $-r_A$ la velocidad de consumo de sustrato.

Fuente: Levenspiel, 1999.

$$\tau = \frac{C_{A0}X_A}{-r_A} = \frac{C_{A0} - C_A}{-r_A} \text{ sabiendo que } X_A = 1 - \frac{C_A}{C_{A0}}$$

Figura 5. Representación gráfica de la operación de un CSTR con densidad constante.



Fuente: (Levenspiel, 1999).

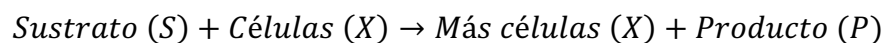
H. CINÉTICA

1. Cinética de crecimiento celular

A pesar de que el crecimiento de las células es un fenómeno muy complejo, a menudo se puede obtener una descripción global buena del mismo a través de ecuaciones relativamente sencillas. Entre ellas la más usada es la ecuación de Monod. Esta ecuación describe el crecimiento celular en función de la disponibilidad de un sustrato limitante y se puede expresar de la siguiente manera [32]:

Ecuación 4. Estequiometría de la reacción de consumo de sustrato para formación celular y de productos

Fuente: Lee, 2009



Ecuación 5. Expresión de la velocidad de crecimiento celular (r_x), donde S es la concentración de sustrato, X es la concentración de células, t es el tiempo, K_s es la constante de afinidad al sustrato y μ_m es la velocidad máxima de crecimiento específica.

Fuente: Lee, 2009

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S \cdot X}{K_s + S}$$

Es bastante común expresar la ecuación en función de la velocidad específica de crecimiento:

Ecuación 6. Expresión de la velocidad específica de crecimiento celular (μ), donde S es la concentración de sustrato, K_s es la constante de afinidad al sustrato y μ_m es la velocidad máxima de crecimiento específica.

Fuente: Lee, 2009

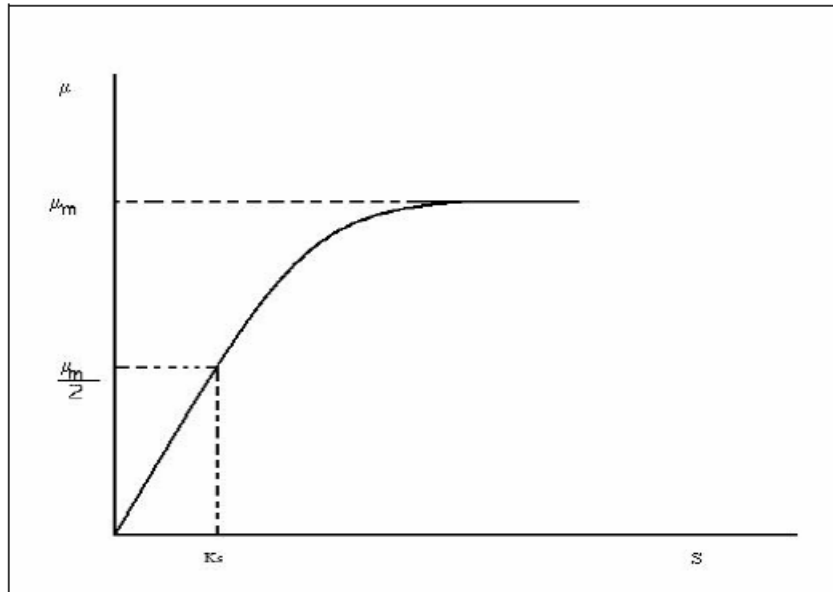
$$\mu = \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S}$$

En la cual μ_m es el máximo valor que puede alcanzar la velocidad de crecimiento específica cuando $S \gg K_s$ y las concentraciones del resto de nutrientes no han cambiado de forma considerable [32]. K_s es el valor de la concentración del nutriente limitante a la que la velocidad específica de crecimiento es la mitad de la máxima. Para valores de S inferiores a K_s , la velocidad de crecimiento depende de una forma lineal de S, mientras que para valores superiores, el valor de μ se hace independiente de S [32].

Uno de los inconvenientes que plantea el uso de la ecuación de Monod es la correcta determinación del valor de K_s , ya que este es normalmente muy pequeño y no es fácil de averiguar [32]. La ecuación de Monod es muy simple y no siempre permite obtener una buena representación de los datos de crecimiento de un microorganismo. Por ello se han desarrollado otros modelos más complejos basados en este [32].

El modelo de Monod describe solo a los periodos de crecimiento exponencial y a la fase estacionaria [32].

Figura 6. Dependencia de la velocidad específica de crecimiento respecto a la concentración de sustrato limitante según la ecuación de Monod.



Fuente: (Lee, 2009).

En términos más complejos se puede usar la ecuación logística, que es un modelo sencillo donde se considera que la velocidad de crecimiento de las células sólo depende de la concentración de las células pero incluye además un término de inhibición proporcional al cuadrado de la concentración de biomasa [32].

Ecuación 7. Expresión de la velocidad de crecimiento celular, donde X es la concentración de microorganismos, k y β son constantes de proporcionalidad e inhibición respectivamente.

Fuente: Lee, 2009

$$\frac{dX}{dt} = kX - \beta X^2$$

2. Rendimientos

Los rendimientos se definen como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido, usualmente referidos a la fuente de carbono y energía. El rendimiento celular se define a través del concepto de nutriente limitante. Un nutriente limitante es aquel sustrato que cuyo consumo controla la velocidad de producción de biomasa. Es decir que la velocidad de crecimiento celular es función de tal nutriente. En muchos casos existen más de un nutriente u otros factores que intervienen en dicha velocidad, pero para simplificar se considera siempre que sólo uno es el esencial y el más importante [32].

A través de este concepto de sustrato limitante se puede definir el rendimiento del proceso con la siguiente expresión:

Ecuación 8. Rendimiento de concentración de microorganismos con respecto al consumo de sustrato ($Y_{x/s}$), donde S representa la concentración de sustrato y X es la concentración de microorganismos

Fuente: Lee, 2009

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{\text{Biomasa producida}}{\text{Consumo sustrato}} = \frac{g X \text{ seca}}{g S \text{ consumido}}$$

El sustrato normalmente es la fuente de carbono. El rendimiento está en función de tal fuente de Carbono usada y las condiciones del proceso, por lo que puede variar durante el proceso. Además, el consumo de sustrato no está dedicado solo a la producción de biomasa [32].

Este tiene tres cometidos: para asimilación de los microorganismos como material celular, provisión de energía para la síntesis celular y energía para el mantenimiento del cultivo [32].

Entonces la siguiente ecuación representa el consumo total del sustrato:

Ecuación 9. Cambio de concentración de sustrato, asignado a cada uno de los componentes en los que es empleado

Fuente: Lee, 2009

$$\Delta S = (\Delta S)_{MC} + (\Delta S)_C + (\Delta S)_M$$

*Sustrato total = Sustrato empleado asimilación materia celular
+ Provisión Energía síntesis celular + Energía mantenimiento cultivo*

De manera que se obtiene:

Ecuación 10. Inverso del Rendimiento de concentración de microorganismos con respecto al consumo de sustrato ($1/Y_{X/S}$), donde S representa la concentración de sustrato y X es la concentración de microorganismos

Fuente: Lee, 2009

$$\frac{\Delta S}{\Delta X} = \frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{(\Delta S)_{MC}}{(\Delta X)} + \frac{(\Delta S)_C}{(\Delta X)} + \frac{(\Delta S)_M}{(\Delta X)}$$

El rendimiento teórico se define como $\Delta X / (\Delta S)_{MC}$ que es el sustrato empleado en la asimilación de los microorganismos como material celular. También se llama el rendimiento del crecimiento. Este rendimiento permanece constante si la composición celular se mantiene constante [32].

Sin embargo, el rendimiento global dependerá de la fracción de sustrato consumido en cada una de las actividades celulares [32]. El rendimiento definido mediante la ecuación 1 se refiere al rendimiento celular, existen otros rendimientos referidos a otros parámetros del proceso o en función de otras variables. Estos pueden ser como los que siguen a continuación [32]:

Ecuación 11. Rendimiento de formación de producto con respecto al consumo de sustrato ($Y_{P/S}$), donde S representa la concentración de sustrato y P es la concentración de producto

Fuente: Lee, 2009

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{\text{Producto generado}}{\text{Consumo Sustrato}} = \frac{g/\text{mol } P}{g/\text{mol } S \text{ consumido}}$$

Ecuación 12. Rendimiento de formación de subproducto con respecto al consumo de sustrato ($Y_{C/S}$), donde S representa la concentración de sustrato y C es la concentración de subproducto

Fuente: Lee, 2009

$$Y_{C/S} = \frac{\Delta C}{\Delta S} = \frac{\text{Subproducto generado}}{\text{Consumo Sustrato}} = \frac{\text{Mol } C \text{ Producido}}{\text{Mol } S \text{ Consumido}}$$

Ecuación 13. Tasa de crecimiento molar, donde S representa la concentración de sustrato y X es la concentración de microorganismos

Fuente: Lee, 2009

$$\text{Tasa Crecimiento Molar} = \frac{g \text{ X seca}}{\text{mol } S \text{ consumido}}$$

Con todo esto se puede escribir la siguiente ecuación:

Ecuación 14. Velocidad de consumo de sustrato (r_s), donde S representa la concentración de sustrato y X es la concentración de microorganismos y Y son los rendimientos correspondientes

Fuente: Lee, 2009

$$r_s = -\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\right)r_x = -\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\right)r_p = -\left(\frac{1}{Y_{C/S}}\right)r_c$$

3. Cinética de consumo de sustrato

El sustrato consumido por el microorganismo tiene como finalidad el crecimiento celular, mantenimiento de las actividades vitales y la generación de producto, para el caso donde la formación de producto no esté asociada de forma directa al metabolismo energético [32].

Para modelar la variación de la concentración del sustrato con el tiempo se proponen diversas ecuaciones. La primera es la más utilizada, pero no es siempre aplicable. Por ello aparecen las demás ecuaciones [32]:

Ecuación 15. Velocidad de consumo de sustrato sin formación de producto y sin mantenimiento celular, donde S representa la concentración de sustrato y X es la concentración de microorganismos y Y es el rendimiento correspondiente

Fuente: Lee, 2009

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \left(\frac{dX}{dt} \right)$$

Ecuación 16. Velocidad de consumo de sustrato sin formación de producto, donde S representa la concentración de sustrato, X es la concentración de microorganismos, Y es el rendimiento correspondiente y m_x es el rendimiento de mantenimiento celular

Fuente: Lee, 2009

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_X} \left(\frac{dX}{dt} \right) - m_x X$$

Ecuación 17. Velocidad de consumo de sustrato, donde S representa la concentración de sustrato, X es la concentración de microorganismos, Y es el rendimiento correspondiente, P es la concentración de producto y m_s es el rendimiento de mantenimiento celular

Fuente: Lee, 2009

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \left(\frac{dX}{dt} \right) - \frac{1}{Y_{P/S}} \left(\frac{dP}{dt} \right) - m_s X$$

4. Cinética de formación de producto

De manera análoga al modelo cinético de consumo de sustrato se plantean diferentes ecuaciones para modelar la formación de producto [32]:

Ecuación 18. Velocidad de formación de producto, donde S representa la concentración de sustrato, P es la concentración de producto y Y es el rendimiento correspondiente

Fuente: Lee, 2009

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/S} \left(\frac{dS}{dt} \right)$$

Ecuación 19. Velocidad de formación de producto, donde S representa la concentración de sustrato, X es la concentración de microorganismo y Y es el rendimiento correspondiente

Fuente: Lee, 2009

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/X} \left(\frac{dX}{dt} \right)$$

Y mediante el uso de las dos ecuaciones anteriores se obtiene el modelo de Luediking-Piret, parcialmente asociado al crecimiento [32].

Ecuación 20. Velocidad de formación de producto, donde S representa la concentración de sustrato, X es la concentración de microorganismos, y α y β son las constantes de crecimiento asociado y no asociado correspondientemente

Fuente: Lee, 2009

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \left(\frac{dX}{dt} \right) + \beta X$$

5. Fenómenos físicos en modelos cinéticos

La difusión de un soluto puede considerarse análoga al flujo de calor, y la ley de Fick establece que el ritmo de difusión por unidad de superficie, en dirección perpendicular a ésta, es proporcional al gradiente de la concentración de soluto en esa dirección. La concentración es la masa de soluto por unidad de volumen, y el gradiente de concentración es la variación de concentración por unidad de distancia [34].

Si se coloca con cuidado una gota de anilina en un vaso de agua, veremos que el color se difunde por el agua. El proceso puede durar varias horas (suponiendo que no sacudimos el vaso), pero al final el color será uniforme. Esta mezcla se produce a causa del movimiento aleatorio de las moléculas y se denomina como hemos visto: difusión. También en los gases se produce la difusión y de manera mucho más rápida. Cuando se destapa un frasco de perfume, su aroma puede percibirse en todos los puntos de la habitación poco después, aunque el aire este en reposo. Y si quemamos algo en la estufa, el olor, así como el humo visible, se difunde por la casa. En cada caso, la sustancia que se difunde se mueve de una región en la cual tenga una gran concentración a otra en la cual ésta sea baja [34].

Si se vierte una disolución concentrada de azúcar en un recipiente que contiene agua, la mezcla se hace gradualmente homogénea mediante la difusión de las moléculas del soluto en la región del agua pura y la difusión de las moléculas de agua en sentido opuesto. Si en lugar de colocar la disolución de azúcar directamente

en el agua, la separamos físicamente de ésta por una capa de papel pergamino, se impide la difusión hacia afuera del soluto. Se dice que el papel es impermeable al soluto, en este caso el azúcar. Las moléculas de agua, sin embargo, pueden difundirse libremente en sentido opuesto, y debido a esto el nivel de la disolución se eleva en el tubo estrecho, indicando un incremento de presión. Se dice que el papel pergamino es una membrana semipermeable, y el proceso de difusión selectiva a través de tal membrana se denomina ósmosis. La presión osmótica es la presión que tendría que ejercerse sobre la disolución para evitar la ósmosis [34].

Parece extraño a primera vista que el agua pase de una región de baja presión a otra de presión mayor. Pero ha de tenerse en cuenta que, antes de que el proceso se inicie, la presión del agua en la disolución es menor que la presión del agua fuera, ya que la presión total de la disolución es la misma que la del agua, y el soluto hace una contribución a la presión total. La presión osmótica iguala las presiones del agua dentro y fuera y, en consecuencia, la presión osmótica final es la presión debida solamente a la presión de las moléculas de soluto [32].

El estudio sistemático de la ósmosis comenzó hacia mediados del siglo XIX con observaciones detenidas en las células vegetales. Cuando una célula vegetal se coloca, por ejemplo, en una disolución concentrada de azúcar, la parte viva de la célula (protoplasto) se contrae separándose de la membrana, si bien cuando las células así tratadas se separan y se colocan en agua pura, los protoplastos se agrandan de nuevo. Este fenómeno se conoce como plasmólisis, y se observa fácilmente al microscopio [32].

Se encuentra experimentalmente que, en disoluciones diluidas, la presión osmótica es proporcional a la concentración de soluto, o sea inversamente proporcional al volumen de la disolución. También es proporcional a la temperatura absoluta. La rapidez de difusión por unidad de área de sección transversal en una dirección determinada es proporcional al cambio de la concentración del soluto en esa dirección. La ecuación para esta ley es la ecuación 21 [32].

Ecuación 21. Flujo másico de material debido a la difusión, donde A es el área de la sección transversal, C es la concentración del soluto (que se supone constante sobre cualquier sección transversal del tubo), D es el coeficiente de difusión, y $\frac{\Delta C}{\Delta x}$ se llama gradiente de concentración Fuente: Lee, 2009

$$\frac{\Delta m}{\Delta t} = -DA \frac{\Delta C}{\Delta x}$$

Valores típicos de D para la difusión en agua de moléculas importantes en biología van desde $1 \cdot 10^{-11}$ a $100 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, para un rango de pesos moleculares de cerca de 10^4 . La Ley se ha verificado experimentalmente de muchas maneras y es muy importante para la determinación del peso molecular de moléculas biológicas por medio de ultracentrifugación [32].

Puesto que todos los organismos vivos se componen de una o más células rodeadas por membranas, la difusión de sustancias a través de membranas biológicas es cuestión de suma importancia. Por diversas razones no es posible caracterizar las membranas biológicas por un coeficiente de difusión D, pero es posible combinar el espesor desconocido Δx de la membrana con D en un coeficiente de permeabilidad P, definido en términos de rapidez de transferencia de masa, utilizando la ecuación 22 [32].

Ecuación 22. Coeficiente de permeabilidad P, donde A es el área, C_i es la concentración de la sustancia que difunde en el interior de la célula y C_0 es la concentración en el exterior

Fuente: Lee, 2009

$$P = \frac{\Delta m / \Delta t}{A(C_i - C_0)}$$

Donde A es el área, C_i es la concentración de la sustancia que difunde en el interior de la célula y C_0 es la concentración en el exterior. Para muchos tipos de

células, se ha determinado el coeficiente de permeabilidad que nos da información muy útil en los estudios de la membrana celular. La ecuación anterior es sólo para gradientes de concentración, pues si hay iones presentes y sus correspondientes gradientes electroquímicos, es necesario un tratamiento distinto [32].

Sustancias como el pergamino y algunos materiales vegetales, tienen la propiedad de permitir que ciertas moléculas difundan a través de ella, pero otras no. En la figura se muestra un tubo con un trozo de pergamino sujeto a su extremo inferior y con una disolución de azúcar en su interior, está sumergido en agua [32].

Las moléculas de agua difunden a través del pergamino hacia el interior del tubo de acuerdo con la ley de Fick, ya que hay una mayor concentración de agua fuera del tubo que dentro de él, pero las moléculas de azúcar, más grandes, no se pueden difundir hacia afuera. Este proceso se llama ósmosis. El líquido asciende por el tubo, hasta el momento en el que la presión causada por la altura de la columna es suficiente para detener una difusión aún mayor, o hasta el instante en que la membrana se rompa. Esta presión que se establece por causa de la difusión en un solo sentido se llama presión osmótica. La presión osmótica es un factor importante en el balance del agua entre los tejidos del cuerpo. Las membranas de todas las células vivas permiten el libre paso del agua; algunas, sin embargo, son selectivas a otras moléculas pequeñas, y la presión osmótica puede ser importante. Los glóbulos rojos (eritrocitos) estallan inmediatamente después de sumergirlos en agua destilada [32].

I. MODELOS CINÉTICOS

Un modelo cinético es una expresión matemática que relaciona las variables que influyen en el crecimiento microbiano. Para describir apropiadamente la cinética es necesario que el modelo considere los parámetros de cultivo, como: la luz disponible, el sustrato limitante, las variaciones de pH y temperatura, etc. [35].

La velocidad específica de crecimiento puede ser descrita utilizando diferentes modelos que ya han sido validados y son comúnmente utilizados. Algunos de estos se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Modelos cinéticos utilizados para describir la velocidad específica de crecimiento microbiano

Nombre	Modelo	Descripción
Monod	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S}$	Modelo más utilizado por su simplicidad y por considerar el efecto del sustrato limitante en el crecimiento microbiano.
Contois	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S X + S}$	Este modelo contempla el efecto simultáneo del sustrato limitante y la concentración de células en el crecimiento. Suele utilizarse para describir cultivos de microorganismos fotosintéticos, dado que la concentración celular disminuye la penetración de la luz en el sistema.
Haldane	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}$	Es un modelo complementario al de Monod que introduce el efecto de la inhibición del sustrato. K_I representa la constante de inhibición y es igual a la concentración de sustrato que inhibe el crecimiento.
Tiessier	$\mu = \mu_{max} * (1 - e^{K*S})$	Es un modelo exponencial que describe la velocidad de crecimiento específica como una función continua de la concentración de sustrato, como en la de Monod, pero la transición de a la concentración de saturación es más aguda.

Fuente:(Tebanni, *et al.*, 2014)

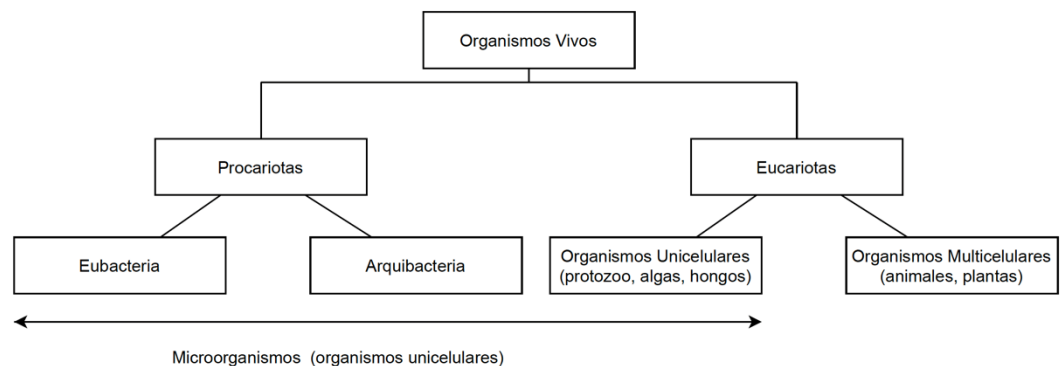
El uso de células vivas para la producción de productos químicos crece anualmente con ritmos asombrosos. Tanto microorganismos (bacterias, hongos, algas) como células humanas, vegetales o animales se utilizan para la producción varios productos químicos, como por ejemplo insulina, antibióticos, biosurfactantes. Son responsables también de la producción de alcohol vía fermentación, producción de quesos, vinos, champagne, etc. También los procesos biológicos son muy usados en el tratamiento de residuos y efluentes [35].

J. CLASIFICACIÓN DE LOS ORGANISMOS VIVOS

Los organismos vivos pueden clasificarse en base a diferencias de la estructura celular en dos grandes grupos: eucariotas y procariotas [36]. Las células eucariotas son considerablemente más grandes que las procariotas, pero además de esta tienen otras diferencias en la estructura intracelular. Las células eucariotas tienen un núcleo bien definido que está rodeado por una membrana para proteger las moléculas de DNA que constituyen el material genético. Por otro lado, las células procariotas tienen una región nuclear que no está rodeada por una membrana y que contiene una única molécula de DNA [36].

Las eucariotas a su vez se dividen en organismos multicelulares (donde las células tienen funciones específicas) y los organismos unicelulares (donde todas las células llevan a cabo la misma función). Las eubacterias y las archaeobacteria tienen una química celular diferente. Las primeras incluyen a la mayoría de las bacterias que son usadas en los tratamientos biológicos, la mayoría de los organismos que viven en el aire y agua y la mayoría de los organismos patógenos de humanos y otros mamíferos. Las archaeobacteria incluyen algunas especies anaeróbicas, como también algunas otras que viven en condiciones extremas (alta temperatura, bajo PH, etc.). Las eubacterias y archaeobacteria se refieren simplemente como bacterias [36].

Figura 7. Clasificación general de los microorganismos en función de la tipología de células de las que están constituidos.



Fuente: (Shuler & Kargi, 2002).

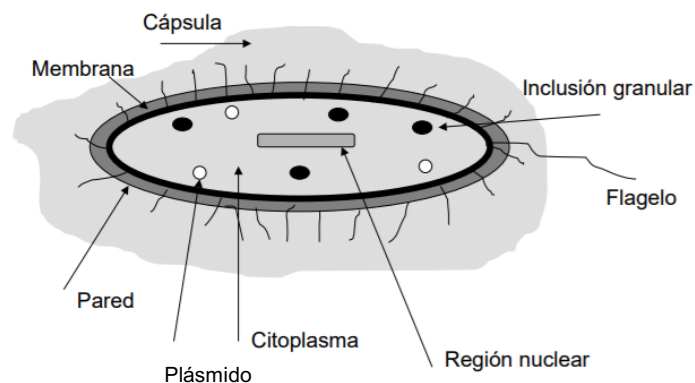
1. Principales tipos de microorganismos

Microorganismo es el término que comúnmente se utiliza para describir una célula única libre. Esta definición hace que dentro de los microorganismos se encuentren tanto las células procariotas como los organismos unicelulares de las eucariotas [36].

a. Bacterias

Las bacterias tienen tres formas generales: esférica, bastón y espiral. Un dibujo simplificado de una célula bacteriana se presenta en la Figura 8.2. Las bacterias tienen una capa en alguna medida "desorganizada" que está compuesta por polisacáridos y es conocida como cápsula. Tienen también una pared rígida y una membrana que encapsula el citoplasma donde ocurren las reacciones. El núcleo contiene los componentes genéticos de la célula. La mayoría de las bacterias pueden moverse y lo hacen con el flagelo. El tamaño de las bacterias depende de la etapa de crecimiento en la que se encuentren. Una célula que no ha tenido nutrientes suficientes puede ser tan chica como $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro. Sin embargo, las bacterias de laboratorio tienen un diámetro que oscila entre 0.5 y $1.0 \mu\text{m}$, mientras que las del tipo bastón son de $0.5 \times 3 \mu\text{m}$ [36].

Figura 8. Ilustración de una célula típica bacteriana y sus organelos.



Fuente: (Shuler & Kargi, 2002)

Las bacterias se clasifican en las aeróbicas (que necesitan oxígeno para vivir) y las anaerobias (que crecen sólo en ausencia de oxígeno). Algunas bacterias son capaces de formar endoesporas (esporas dentro de la célula) [36].

Las bacterias pasan a este estado cuando las condiciones de crecimiento le son muy adversas, es una técnica de supervivencia. Cuando las condiciones de crecimiento mejoran, vuelven al estado vegetativo. Las esporas son muy resistentes al calor y no son muy fáciles de destruir con radiación o agentes químicos [36].

b. Hongos

Los hongos, que no se pueden mover, pueden utilizar material orgánico e inorgánico para crecer. Entre los hongos más conocidos cabe mencionar: las levaduras, moho y hongos comestibles. Respecto a las bacterias los hongos son menos numerosos, crecen a velocidades relativamente más lentas, y los procesos metabólicos que pueden desarrollar son más restringidos. Suelen ser más tolerantes a los medios ácidos pero más sensitivos al contenido de humedad [36]

K. BACILLUS

Los *Bacillus* son una especie de procariotas que se caracterizan por tener forma de bastón y formar baterías en forma de esporas. En su mayoría, son Gram positivo con la cualidad de ser aeróbicas o facultativamente anaeróbicas. Los *Bacillus* se pueden clasificar de varias maneras, de acuerdo a su bioquímica y crecimiento con diferentes sustratos, entre otros. Sin embargo, de manera simplificada se pueden clasificar en tres grandes categorías: patogénica, ambiental y propósitos industriales [37].

Cuadro 2. Condiciones de crecimiento de especies de *Bacillus*

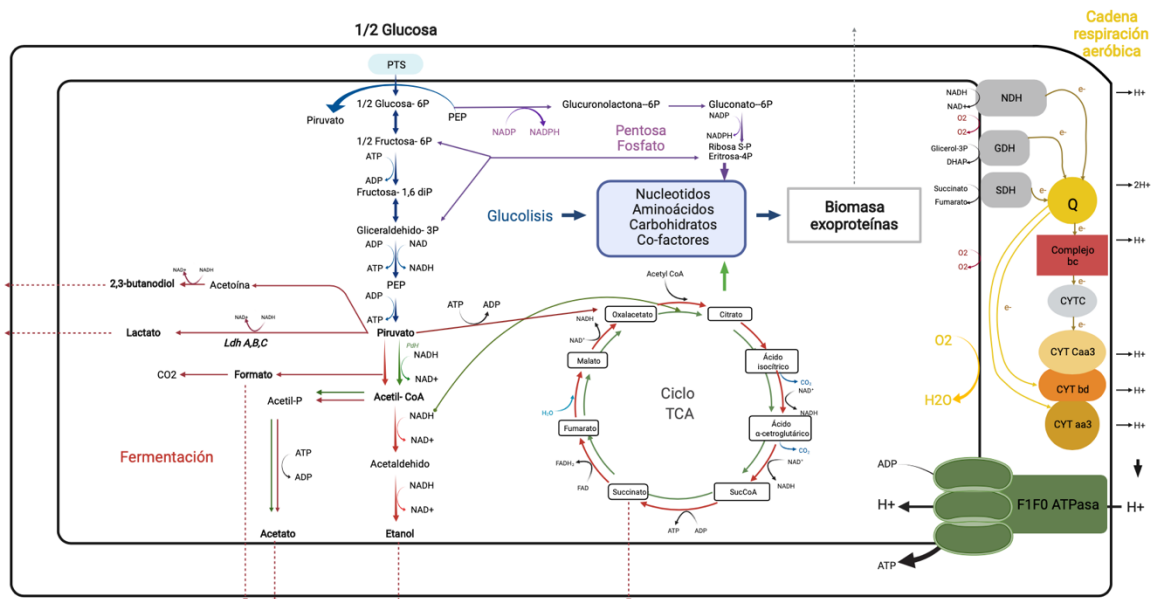
Especie	Rango de pH	Rango de temperatura
<i>Bacillus cereus</i>	4.3-9.3	4- 50 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	5.0-8.3	10-50 °C
<i>Bacillus licheniformis</i>	5- 9.5	>15-55 °C
<i>Bacillus pumulis</i>	5- ?	10-45 °C

Fuente: (Granum, Arnesen & From, 2014).

1. *Bacillus cereus*

Las *Bacillus cereus*, son unas bacterias formadoras de endosporas Gram positivo, las cuales presentan la capacidad de crecer tanto aeróbica como anaeróbicamente (Granum, Arnesen & From, 2014). Presentan una gran importancia económica, dado que tienen la capacidad de producir varias coenzimas que dan lugar a diferentes productos de interés para la industria. Dentro de estos productos se puede mencionar la capacidad de formar los monómeros 3HB y 3HV, los cuales constituyen a la estructura de biopolímeros como los polihidroxitiratos y polihidroxicitratos respectivamente [38].

Figura 9. Propuesta de metabolismo central de *B. cereus*



Fuente: (Duport & Phhillippe, 2016).

L. POLIHIDROXIALCANOATO (PHA)

Los polihidroxicanoatos son biopolímeros que se obtienen a partir del almacenamiento de carbono de los microorganismos, bajo condiciones en donde los nutrientes son limitados en la presencia de una fuente de carbono en exceso. El primer polihidroxicanoato microbial que se descubrió fue el poli(3-hidroxiburato) en 1926 (Kessler *et al*, 2001). Desde su descubrimiento se han reportado más de 90 tipos de *archaes* y *eubacterias*, tanto gram positivas como negativas, que son capaces de producir PHA en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Hoy en día las PHA se clasifican en tres categorías: de cadena corta (de 3 a 5 moléculas), cadena mediana (de 6 a 14 moléculas) y de cadena larga (más de 14 moléculas) [39].

1. Propiedades del los polihidroxialcanoatos

Los PHA presentan propiedades como alta biodegradabilidad en diferentes ambientes, lo cual los ha convertido en uno de las principales expositores en los plásticos biodegradables. Tal es el caso de los polímeros (R)-3-hidroxialcanoato que se encuentran ópticamente activos, los cuales son termoplásticos fácilmente biodegradables con una temperatura de fusión de alrededor 180 °C y presentan propiedades similares a la de algunos poliésteres convencionales. En el Cuadro 3 se puede observar la comparación de estas propiedades [40].

Cuadro 3. Propiedades de PHAs comparados con poliésteres, polipropileno (PP), tereftalato de polietileno(PETP) y Nylon 6,6 (N6,6)

Propiedad	PHB	PHV	P(HB.HV) (4-29%)	PHO	PP	PETP	N6,6
Punto de fusión Cristalino (°C)	175	107	157-102	61	176	267	265
Cristalinidad	89	80	69-39	30	70	30-50	40-60
Peso molecular $M_w(X10^6)$	1-8	2	6	5	2-7	--	--
Temperatura de transición vítrea $T_g(°C)$	5-15	-16	2 a -8	-35	-10	69	50
Densidad (g cm ⁻³)	1.250	1.2	1.2	1.0	0.905	1.385	1.14
Absorción de agua (wt %)	0.2	--	--	--	0.0	0.4	4.5
Módulo de flexión (CPa)	4.0	--	36.22	6-10	38	70	83
Fuerza de tensión (MPa)	40	--	36.22	6-10	38	70	83
Extensión para romper (%)	6	--	6-10	300-450	400	100	60
Resistencia UV	Buena	Buena	Buena	Buena	Deficiente	--	--
Resistencia de solvente	Deficiente	Deficiente	--	--	Buena	--	--
Biodegradabilidad	+	+	+	+	-	-	-

Fuente: (Sasikala & Romana, 1996)

2. Microorganismos productores de polihidroxialcanoatos

Tanto los microorganismos procariotas y eucariotas presentan la capacidad de producir polihidroxialcanoatos. Dependiendo de los microorganismos, se pueden obtener diferentes tipos de PHAs. En el caso de la *Pseudomonas putida* se pueden sintetizar PHAs de 6 a 14 átomos de carbono (Kim *et al*, 2000). De la misma forma el *Bacillus subtilis* también es conocido por ser un organismo aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) capaz de producir PHA desde un rango de homopolímeros hasta copolímeros a partir de azúcares simples o complejas provenientes de desechos industriales [41].

3. Melaza como fuente de carbono para la producción de polihidroxialcanoatos

La melaza, también conocida como mieles finales o melaza “blackstrap” se establece en la industria como los residuos que se dan por parte del proceso de cristalización final del azúcar, de los cuales no es posible la obtención de azúcar utilizando métodos físicos. Dichos procesos consisten en las operaciones unitarias de evaporación y cristalización, las cuales se repiten usualmente hasta tres veces; llegando a un punto, en donde la concentración de azúcares invertidas y la alta viscosidad de la melaza, ya no permiten una cristalización adicional de la sacarosa [42].

La melaza que se obtiene del azúcar de caña, presenta moléculas como sucrosa, glucosa, fructosa y también presentan calcio, potasio y vitaminas. Esta composición la convierte en una buena fuente de nutrientes para el crecimiento de células [43]. Según estudios se estima que al utilizar melaza como sustrato y disminuir el *pH* durante la fermentación favorece la producción de ácido butírico y valérico. Mientras que con *pH* altos, se favorece a la formación de ácido acético y ácido propiónico [44].

La acumulación de melaza que se da en el procesamiento del azúcar, tiene repercusiones negativas en el ambiente, derivado de su alta viscosidad [45]. Además, se requieren 100 kg de melaza para producto 1L de combustible, el cual al final de su vida útil resulta un problema [45]. Por estas razones, se considera que el uso de melaza como fuente de carbono para la producción de PHA es una buena alternativa para su desecho; y considerando la bioconversión que toma lugar, se crea la generación de un producto económicamente valioso [45].

VI. METODOLOGÍA

A. OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MELAZA

1. Obtener la melaza de un ingenio azucarero de Guatemala.
2. Mantener la melaza en refrigeración a 6°C por menos de 6 meses, con el fin de evitar la descomposición de la materia prima.

B. ELABORACIÓN DEL MEDIO FERMENTATIVO

1. Solución de sales
 - a. Pesar las sales utilizando una balanza analítica OHAUS PA114, de acuerdo a la formulación deseada, para la fase experimental de este trabajo es la cantidad que se muestra en el Cuadro 4.
 - b. Disolver las sales en alrededor de 500 mL a 1000 mL de agua destilada, utilizando una estufa a una temperatura de 90°C.
 - c. Revolver constantemente la solución de sales utilizando un agitador magnético durante 1 hora.
 - d. Remover solución de sales de estufa y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Cuadro 4. Cantidad de sales pesadas para cada corrida de fermentación

Especie	Masa utilizada en corrida 1 (± 0.0001 g)	Masa utilizada en corrida 2 (± 0.0001 g)	Masa utilizada en corrida 3 (± 0.0001 g)	Masa utilizada en corrida 4 (± 0.0001 g)
Cloruro de amonio	0.3276	2.5001	5.0109	14.5046
Bicarbonato de Sodio	0.1639	1.2499	2.4998	5.001
Fosfato monopotásico	0.6599	5.0034	10.0035	19.9997
Fosfato de disódio	0.6776	3.9902	7.9762	15.9559
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.1641	1.2500	2.5015	5.0002
Cloruro de calcio dihidratado	0.0041	0.0249	0.0512	0.1024
Citrato de amonio férrico.	0.01802	0.1256	0.2497	0.5053
Sulfato de zinc heptahidratado	0.0036	0.2032	0.4062	0.1084
Cloruro de Manganeso tetrahidratado	0.0011	0.0753	0.5016	0.0553
Ácido bórico	0.132	0.7507	1.4994	0.4026
Molibdato de sodio dihidratado	0.0016	0.0553	0.1102	0.21927

2. Medio fermentativo

- a. Pesar 300 g de Melaza utilizando una báscula OHAUS serie 3000, en un Beaker Kimax de 2000 mL.
- b. Diluir la melaza utilizando alrededor de 1000 mL de agua destilada.
- c. Agitar utilizando una varilla de vidrio.
- d. Calibrar potenciómetro.
- e. Calentar solución a una temperatura de 50 °C hasta homogenizar.
- f. Invertir azúcares agregando paulatinamente 27 mL de ácido sulfúrico al 99% , hasta llegar a pH 1 medido con el potenciómetro Multi-Parameter Testr Serie 35.
- g. Mantener solución de azúcares invertidas a un pH de 1 y una temperatura constante de 80°C durante una hora.
- h. Retirar la solución de la estufa Thermo Scientific modelo Cimarec+ y esperar hasta que se alcance la temperatura ambiente.
- i. Agregar 19.9985 g de escamas de hidróxido de sodio, hasta llegar a un rango de pH de 6.5 a 7.
- j. Enfriar solución de azúcares invertidas hasta llegar a temperatura ambiente (en un rango de 20-27 °C).

3. Solución de buffer

a. Buffer de ácido acético

- 1) Pesar 25.1373 g de acetato de sodio utilizando una balanza analítica OHAUS PA114, en un Beaker de 250 mL.
- 2) Medir 50 mL de ácido acético glacial en una probeta de 50 mL marca ValueWare.
- 3) Agregar volumen medido de 50 mL en beaker y revolver con agitador magnético hasta disolver acetato de sodio.
- 4) Aforar a 500 mL en un balón aforado Kimax.

b. Buffer de fosfatos

- 1) Agregar 6.8043 g de fosfato monopotásico en un Beaker de 250 mL.
- 2) Agregar 50 mL de agua destilada en Beaker y colocar solución en estufa.
- 3) Calentar a 90 °C utilizando agitador magnético, hasta disolver contenido.
- 4) Agregar 7.098 g de fosfato de disodio en un nuevo Beaker de 250 mL.
- 5) Añadir 50 mL en agua destilada y calentar hasta homogenizar solución.
- 6) Mezclar ambas soluciones.
- 7) Agregar solución buffer en un Balón aforado Kimax.
- 8) Agregar agua destilada hasta que el menisco alcance la marca del balón.

4. Preparación de inóculo

- a. Colocar 1.2 g de caldo nutritivo en un Erlenmeyer con tapadera marca Kimax de 250 mL.
- b. Agregar 150 mL de agua destilada en el Erlenmeyer.
- c. Ingresar Erlenmeyer en la autoclave.
- d. Encender el autoclave y programar a 120°C.
- e. Una vez alcanzada esta temperatura, mantener contenido en la autoclave durante 15 minutos.
- f. Sacar cristalería cumplidos los 15 minutos utilizando guantes térmicos y esperar a que baje la temperatura.
- g. Con un asa de estriar, tomar una colonia de cepas *Bacillus cereus* ATCC® 14579TM e ingresarla al Erlenmeyer con caldo nutritivo esterilizado.
- h. Colocar tapadera de Erlenmeyer y sellar utilizando papel film.
- i. Encender Shaker New Brunswick modelo 3-25 y programar la temperatura a 35 °C y la máxima a 37 °C.
- j. Colocar Erlenmeyer dentro del Shaker y encender setting de temperatura.
- k. Programar el Shaker a 150 rpm y encender setting de agitación.
- l. Incubar caldo por 72 horas.

C. FERMENTACIÓN

1. Limpieza de reactor

- a. Agregar 12 L de agua suavizada en el reactor New Brunswick 3364M.
- b. Encender sistema de reactor y programar 150 rpm en el agitador.
- c. Seleccionando la pestaña del programa de esterilización, programar el sistema de acuerdo a la siguiente configuración:
 - i. *Drain Time (min) : 1*
 - ii. *Heat B Temp (°C): 60*
 - iii. *Steril Temp (°C): 90*
 - iv. *Steril Time (min): 120*
 - v. *Cool B Temp (°C): 50*
 - vi. *Growth Temp (°C): 35*
- d. Iniciar el programa de esterilización de acuerdo al tiempo que se configura en el sistema.
- e. Una vez terminado el programa, se debe de apagar la agitación.
- f. Colocar manguera en la válvula inferior del reactor.
- g. Abrir válvula y vaciar el contenido de agua dentro del reactor.
- h. Cerrar válvula.

2. Fermentación en reactor

- a. Agregar solución de sales, azúcares invertidas y solución de Buffer (en dado caso se utilice bajo esas condiciones) en un recipiente.
- b. Diluir lo mencionado previamente a 10 L y mezclar.
- c. Agregar medio fermentativo en el reactor de New Brunswick 3364M.
- d. Programar agitación a 150 rpm y encender.
- e. Programar temperatura del sistema a 35 °C y encender.
- f. Dejar fermentar por 96 horas, tomando una muestra cada hora durante las primeras 24 horas; una cada dos horas a las 48 horas y una cada tres a las 72 horas.

- g. Al final de cada corrida, se tomó una muestra significativa de 8L, para determinar el triplicado a las condiciones que se llevaron a cabo la fermentación.

D. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

1. Cuantificación de azúcares en el fermentado

- a. Centrifugar muestras de fermentación en Centrífuga Eppendorf 5804 R a 5000 rpm durante 15 minutos.
- b. Tomar 2 mL del sobrenadante con una pipeta Eppendorf plus 1 - channel y colocarlo en un tubo de ensayo.
- c. Agregar 4 mL de agua destilada al tubo de ensayo.
- d. Filtrar y colocar la muestra en viales.
- e. Ingresar al sistema la concentración de la muestra.
- f. Inicial el sistema de cromatografía utilizando una columna Agilent Hi-Plex H Ca 300x7.8mm, 5um, fase móvil agua a temperatura de 75°C, un detector de índice de refracción a 55°C y un automuestreador a 25°C.
- g. Al final de la fermentación en cada corrida, se tomó una muestra significativa de 8L, en la cual se realizó el mismo procedimiento descrito en esta sección y se obtuvo el triplicado para la cuantificación de azúcares.

2. Determinación del crecimiento celular

- a. Pesar la cantidad de Beakers de 50 mL a utilizar en balanza analítica OHAUS PA114.
- b. Centrifugar muestras de fermentación en Centrífuga Eppendorf 5804 R a 5000 rpm durante 15 minutos.
- c. Descartar sobrenadante y resuspender los sólidos en 20 mL de agua destilada.

- d. Colocar suspensión de sólidos en Beaker y secar los sólidos durante 48 horas en la incubadora VWR Symphony de convección a una temperatura de 60 °C.
- e. Pesar el sólido seco en la balanza analítica.
- f. Al final de la fermentación en cada corrida, se tomó una muestra significativa de 8L, en la cual se realizó el mismo procedimiento descrito en esta sección y se obtuvo el triplicado para el crecimiento celular.

3. Medición de pH

- a. Una vez centrifugada la muestra, colocar 10 mL en un Beaker de 50 mL.
- b. Calibrar potenciómetro Starter ST300 marca OHAUS.
- c. Sumergir el potenciómetro en muestra.
- d. Medir pH.
- e. Al final de la fermentación en cada corrida, se tomó una muestra significativa de 8L, en la cual se realizó el mismo procedimiento descrito en esta sección y se obtuvo el triplicado para el pH.

4. Cuantificación de polihidroxicarboxilatos

- a. Agregar 15 mL de hipoclorito de sodio comercial al 5% (m/v) al sólido seco obtenido de la determinación de crecimiento celular.
- b. Agregar 15 mL de cloroformo a la suspensión de microorganismos con hipoclorito de sodio al 5%(m/v).
- c. Sellar Beaker con aluminio y papel film.
- d. Colocar Beaker en Shaker a una temperatura de 40 °C y 200 rpm durante 3 horas.
- e. Cumplido el tiempo, centrifugar a 5000 rpm durante 15 minutos la solución de partes iguales de cloroformo e hipoclorito de sodio.

- f. Trasvasar el contenido de la pastilla líquida que se obtiene a un Beaker de 50mL.
- g. Dejar secar pastilla a temperatura ambiente en un espacio cerrado durante 72 horas.
- h. Pesar sólido resultante en una balanza analítica.
- i. Al final de la fermentación en cada corrida, se tomó una muestra significativa de 8 L, en la cual se realizó el mismo procedimiento descrito en esta sección y se obtuvo el triplicado para la generación de PHA.

5. Determinación de polihidroxialcanoatos

- a. Colocar la muestra de alrededor de 0.5 g de polihidroxialcanoatos en el contenedor para muestras Universal ATR marca PerkinElmer.
- b. Ingresar la muestra al sistema y analizarla a una longitud de onda de 400 a 4000 cm^{-1} en el espectrómetro FT-IR Frontier PelkinElmer.
- c. Obtener el espectro de transmitancia en función de la longitud de onda.
- d. Realizar el mismo procedimiento con los estándares de PHA transparente y Milky Blanco.
- e. Comparar frecuencias de longitud de onda en el sistema.

E. SIMULACIÓN CON SOFTWARE BERKELEY MADONNA

- 1. Determinación del modelo matemático que describe el crecimiento celular, consumo de sustrato y generación de producto a diferentes condiciones, utilizando el software Berkeley Madonna ®
 - a. Procedimiento para el procesamiento de datos de los cultivos realizados a pequeña escala:

- 1) Se definió el modelo cinético de Contois como el más adecuado para describir la velocidad de crecimiento celular, relacionando el crecimiento celular y la generación de producto, con el consumo de sustrato. Este ajuste se evidenció al considerar el comportamiento de los sistemas fermentativos.
- 2) Se importaron los datos correspondientes a los conteos celulares, concentraciones de los componentes químicos involucrados y concentración de sustrato de las muestras analizadas durante el experimento realizado o de la corrida correspondiente. Estos fueron nombrados como “CN”, “CS”, “CP” o con las siglas mostradas en las figuras.
- 3) Se definieron las condiciones iniciales del modelo y el método de aproximación Runge-Kutta 4. Se estableció un tiempo inicial de 0, un tiempo final de 100 y un incremento diferencial en el simulador de 0.02.
- 4) Se escribió el código correspondiente al modelo cinético de Contois modificándolo de acuerdo con los mecanismos específicos posibles y se estudió el que produce la mejor predicción. Así mismo, se estableció la velocidad de consumo de sustrato en función de la velocidad de crecimiento celular y el rendimiento que relaciona a ambos parámetros, como se muestra a continuación:

```

Mu4 = (MuMax4*(Csi4)/(Ks4*CN4+(Csi4)))
Rd1 = Mu4*CN4
Rd2 = -Rd1/Yxs4
Rtdm= kt*(Cs4-Csi4)
Mup=Maxp *1/ (1+exp(ksp*Csi4-n))
Rd3 =Mup*(CN4-0.00638)/Ypx4 +B*CP4
Rd31 = IF TIME <= 22 THEN 0 ELSE
(Mup*(CN40.00638)/Ypx4+B*CPo4)
d/dt(Cs4) = - Rtdm
d/dt(Csi4) = Rd2+Rtdm
d/dt(CN4) = Rd1

```

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

- 5) Se ajustaron los parámetros “MuMax4”, “Ks4” y “Yxs4” utilizando la función Curve Fit que contiene el software. Los resultados de este ajuste se leen directamente de forma tabular en el software.
- 6) Con este ajuste, se procede a importar lo datos correspondientes a concentración de producto, subproductos y condiciones de reacción.
- 7) Se ajustan los parámetros (como “Ypss4” o “ksp”) de cada una de las concentraciones o condiciones utilizando la función Curve Fit que contiene el software. Los resultados de este ajuste se leen directamente de forma tabular en el software.
- 8) Si el ajuste se distorsiona por alguna acción externa al sistema, como un ajuste manual, debe generarse un modelo discontinuo con operadores lógicos, como los mostrados en el extracto de arriba. Luego de esto, realizar el ajuste como en el punto 7 y verificar la predictibilidad de las concentraciones o condiciones.
- 9) Se escribió un modelo cinético para cada uno de los sets de datos importados, variando las constantes cinéticas necesarias para propiciar el ajuste, de acuerdo con lo reportado en el marco teórico y antecedente, así como a las deducciones cinéticas. El modelo completo para el más complejo de los ajustes se muestra a continuación:

```

Mu4 = (MuMax4*(Csi4)/(Ks4*CN4+(Csi4)))
Rd1 = Mu4*CN4
Rd2 = -Rd1/Yxs4
Rtdm= kt*(Cs4-Csi4)
Mup=Maxp *1/ (1+exp(ksp*Csi4-n))
Rd3 =Mup*(CN4-0.00638)/Ypx4 +B*CP4
Rd31 = IF TIME <= 22 THEN 0 ELSE (Mup*(CN4-
0.00638)/Ypx4+B*CPo4)
Rtdm2 = kt2*(CP4-CPo4)
Rd5 = IF TIME <= 24 AND TIME >=23.98 THEN 130 ELSE IF TIME<=
48 AND TIME>=47.98 THEN 90 ELSE Rd2/YPH
Rd4 = Rd1/Ypss4
Rd6 = Rd2/YRCN

```

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

Los valores iniciales para las concentraciones de las especies, fueron los siguientes:

```
INIT Cs4 = 0.01074
INIT CN4 = 0.00638
INIT Csi4 = 0
INIT CPo4= 0
INIT CP4=0
INIT PH4 =7.02
INIT CPs4=0
INIT CNN4=1600
INIT Csi4 = 0
```

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

Las ecuaciones declaradas en el código fueron las siguientes:

```
d/dt(Cs4) = - Rtdm
d/dt(Csi4) = Rd2+Rtdm
d/dt(CN4) = Rd1
d/dt (CPo4) = Rd31
d/dt (CP4) = Rtdm2
d/dt(PH4)=Rd5
d/dt(CPs4)=Rd4
d/dt (CNN4)=Rd6
```

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

VII. RESULTADOS

Cuadro 5. Resumen de resultados obtenidos durante las experimentaciones y análisis realizados durante la fermentación de azúcares invertidas de melaza para la producción de PHA

Corrida	Rendimiento de concentración de producto con respecto a sustrato ($y_{p/s}$ m/m)	Condiciones relevantes de la experimentación	Tipo de modelo cinético utilizado
1	10.13±0.44%	C:N=855.64±3.27 pH sin regulación	Contois
2	71.45±1.63%	C:N=172.53±1.46 pH sin regulación	Contois
3	18.33±0.79%	C:N=56.50±0.95 pH regulado	Contois + ecuaciones viriales
4	52.27±1.11%	C:N=20.32±0.62 pH regulado	Contois + Tissier + Transferencia de masa

Rendimientos globales calculados en la experimentación en un reactor New Brunswick con volumen efectivo de 10 L. Las relaciones C:N se calcularon elementalmente. Los parámetros cinéticos y predictibilidades fueron obtenidos empleando el software Berkeley Madonna.

A. Cálculo de masas finales de la fermentación y determinación de concentraciones finales

Cuadro 6. Relación de concentraciones y condiciones empleadas en las corridas experimentales

Corrida	C:N (m/m)	C:P (m/m)	pH	T (±1 °C)	P (±0.1kPa)
1	855.64±3.27	209.51±2.77	4.48±0.72	35	84.4
2	172.53±1.46	43.13±0.81	5.70±0.78	35	84.4
3	56.50±0.95	10.49±0.39	6.52±0.42	35	84.4
4	20.32±0.62	8.48±0.11	6.54±0.44	35	84.4

Concentraciones y condiciones medidas en las corridas experimentales en un reactor New Brunswick con volumen efectivo de 10 L. Detalle de cuantificación para cada condición se muestra en la sección de metodología.

Cuadro 7. Rendimientos globales de fermentación, masa final de células y producto obtenidas para las corridas experimentales realizadas

Corrida	Masa final de células (g)	Masa final de producto (g)	Rendimiento de concentración de microorganismos con respecto a sustrato ($y_{x/s}$ m/m)	Rendimiento de concentración de producto con respecto a sustrato ($y_{p/s}$ m/m)	Rendimiento de concentración de producto con respecto a microorganismos ($y_{p/x}$ m/m)
1	4.14±0.43	2.89±0.56	14.54±0.64%	10.13±0.44%	69.66±3.06%
2	58.00±8.59	56.80±8.49	72.96±1.81%	71.45±1.63%	97.93±2.43%
3	37.58±2.54	36.24±4.53	19.01±0.83%	18.33±0.79%	96.43±3.21%
4	61.56±4.06	53.16±4.74	60.53±1.35%	52.27±1.11%	86.35%±1.93%

Masas y rendimientos globales calculados en la experimentación en un reactor New Brunswick con volumen efectivo de 10 L. Las relaciones C:N se calcularon elementalmente.

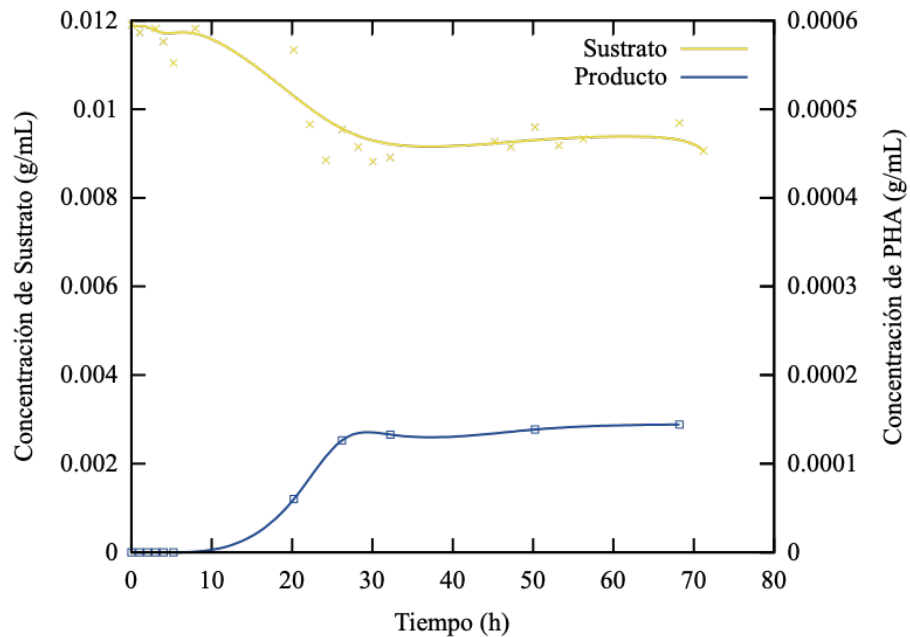
Cuadro 8. Comparativo de la producción de polihidroxicanoato en las fases de crecimiento celular detectadas para cada corrida experimental

Corrida	Producción de PHA en fase Lag (± 0.01 g)	Producción de PHA en fase Exponencial (± 0.01 g)	Producción de PHA en fase Estacionaria (± 0.01 g)	Masa de Producto total (± 0.01 g)
1	1.21	1.45	0.23	2.89
2	6.00	45.00	5.80	56.80
3	0.00	35.36	0.88	36.24
4	3.26	37.4	12.5	53.16

Masas calculadas en la experimentación en un reactor New Brunswick con volumen efectivo de 10L.

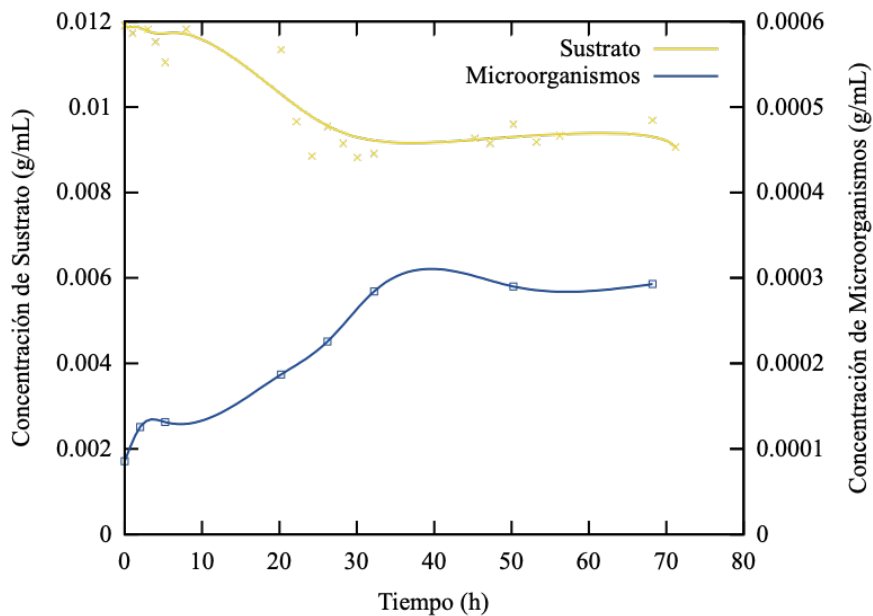
B. Comportamiento de sustrato, microorganismos, polihidroxicanoatos y subproductos con el tiempo

Figura 10. Comportamiento de la concentración de sustrato y producto en función del tiempo para la corrida 1



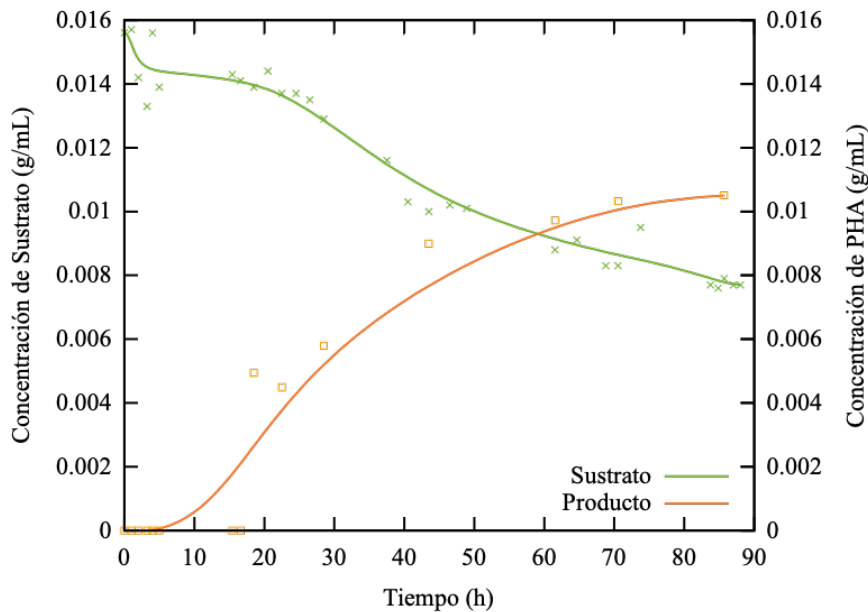
Concentraciones medidas experimental en un reactor New Brunswick a una temperatura constante de 35°C, velocidad de agitación 150 rpm y presión atmosférica.

Figura 11. Comportamiento de la concentración de sustrato y microorganismos en función del tiempo para la corrida 1



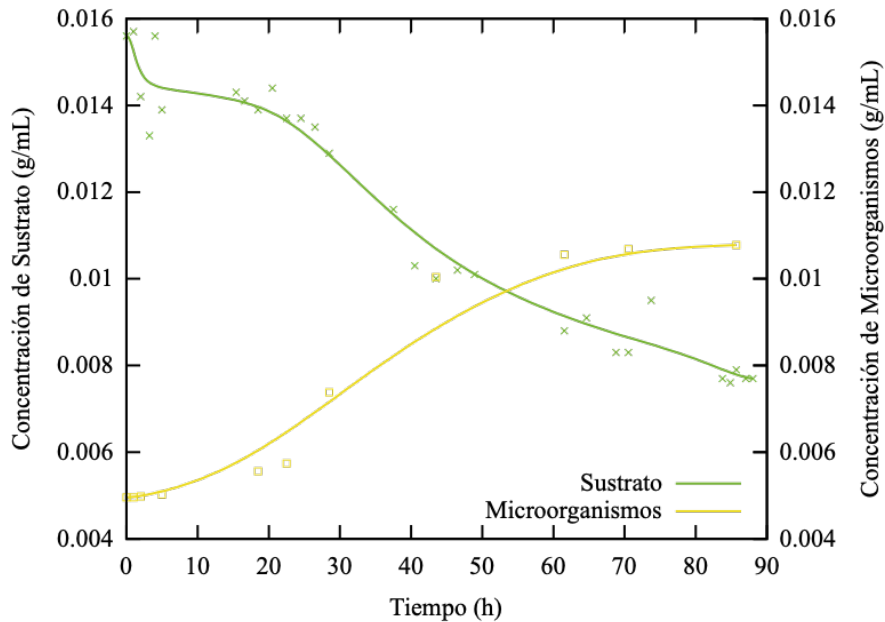
Concentraciones medidas experimental en un reactor New Brunswick a una temperatura constante de 35°C, velocidad de agitación 150 rpm y presión atmosférica.

Figura 12. Comportamiento de la concentración de sustrato y producto en función del tiempo para la corrida 2



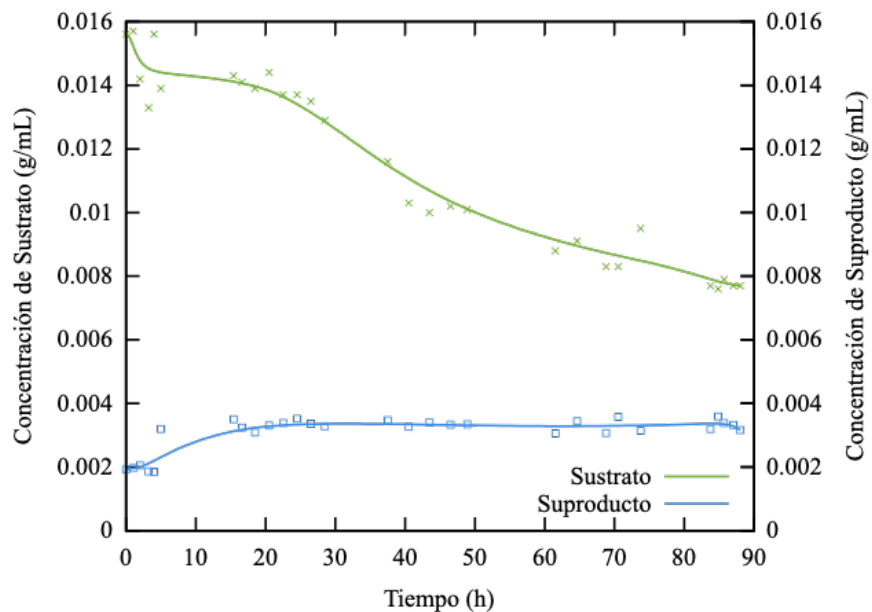
Concentraciones medidas experimental en un reactor New Brunswick a una temperatura constante de 35°C, velocidad de agitación 150 rpm y presión atmosférica.

Figura 13. Comportamiento de la concentración de sustrato y microorganismos en función del tiempo para la corrida 2



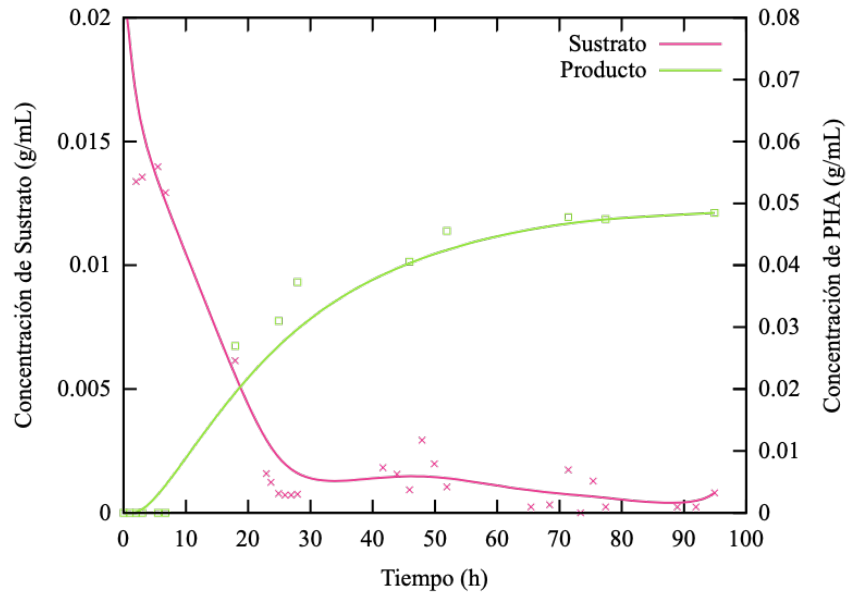
Concentraciones medidas experimental en un reactor New Brunswick a una temperatura constante de 35°C, velocidad de agitación 150 rpm y presión atmosférica.

Figura 14. Comportamiento de la concentración de sustrato y subproductos en función del tiempo para la corrida 2



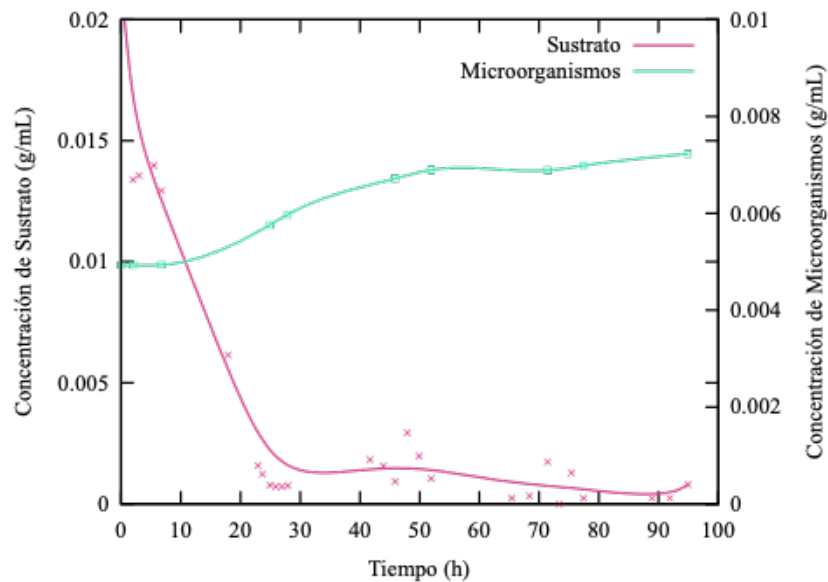
Concentraciones medidas experimental en un reactor New Brunswick a una temperatura constante de 35°C, velocidad de agitación 150 rpm y presión atmosférica.

Figura 15. Comportamiento de la concentración de sustrato y producto en función del tiempo para la corrida 3



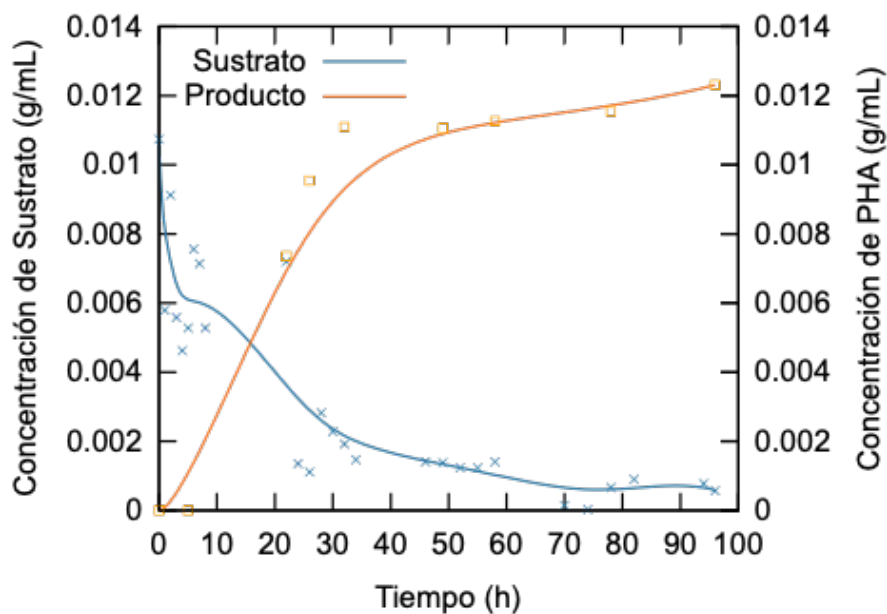
Concentraciones medidas experimental en un reactor New Brunswick a una temperatura constante de 35°C, velocidad de agitación 150 rpm y presión atmosférica.

Figura 16. Comportamiento de la concentración de sustrato y microorganismos en función del tiempo para la corrida 3



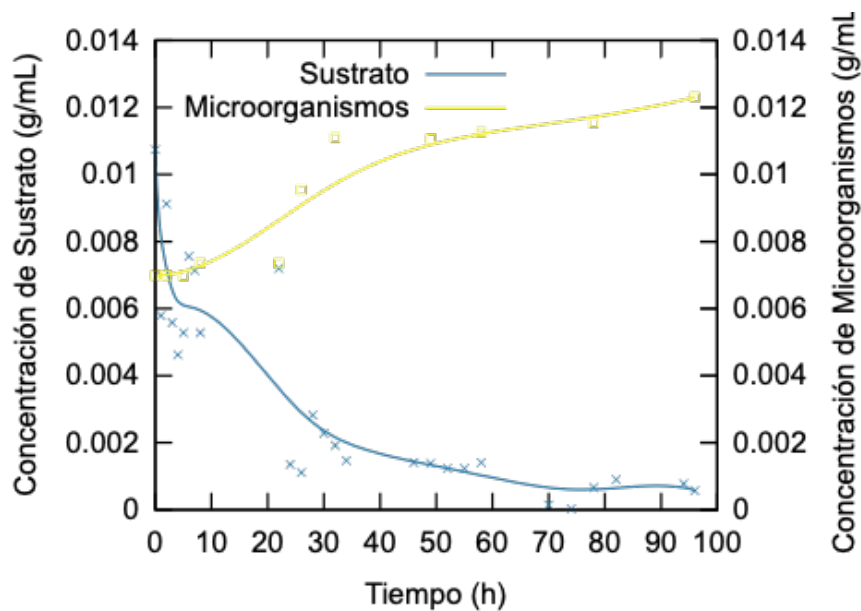
Concentraciones medidas experimental en un reactor New Brunswick a una temperatura constante de 35°C, velocidad de agitación 150 rpm y presión atmosférica.

Figura 17. Comportamiento de la concentración de sustrato y producto en función del tiempo para la corrida 4



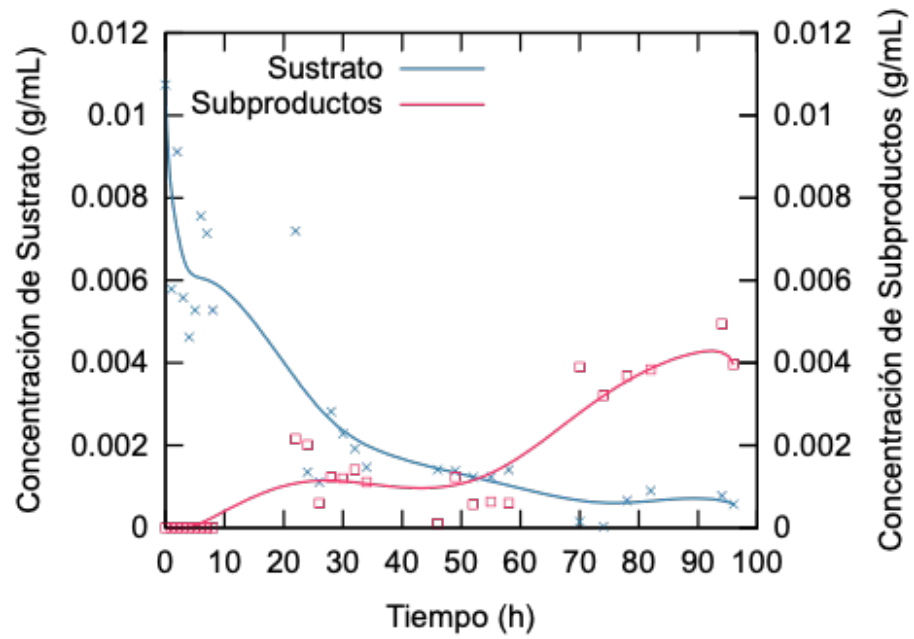
Concentraciones medidas experimental en un reactor New Brunswick a una temperatura constante de 35°C, velocidad de agitación 150 rpm y presión atmosférica.

Figura 18. Comportamiento de la concentración de sustrato y microorganismos en función del tiempo para la corrida 4



Concentraciones medidas experimental en un reactor New Brunswick a una temperatura constante de 35°C, velocidad de agitación 150 rpm y presión atmosférica.

Figura 19. Comportamiento de la concentración de sustrato y subproductos en función del tiempo para la corrida 4



Concentraciones medidas experimental en un reactor New Brunswick a una temperatura constante de 35°C, velocidad de agitación 150 rpm y presión atmosférica.

C. Análisis y comparación de señales características en espectros IR para el PHA obtenido en cada fermentación

Cuadro 9. Comparativo de señales características en espectros IR para cada corrida experimental y estándares de referencia

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Vibración asociada	Grupo funcional	Estándar transparente PHA	Estándar Milky Blanco PHA	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4
~3400	Armónico carbonilo	C=O	✓	✓	X	✓	✓	X
2962-2853	Alcano	C-H	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1750-1735	Tensión de estères	C=O	✓	✓	X	✓	✓	✓
3650-3590	Tensión de alcohol	O-H	X	X	✓	X	✓	✓
1210-1160	Estiramiento carbonilo	C-C-O	✓	✓	X	✓	✓	✓
~1240	Estiramiento acetato	C-C-O	X	✓	X	X	✓	X
1100-1030	Estiramiento carbonilo	O-C-C	✓	✓	X	✓	✓	✓

Frecuencias analizadas con la huella espectral obtenida con el espectrofotómetro FTIR PerkinElmer Frontier.

D. Modelos matemáticos para la predicción de sustrato, microorganismos y polihidroxialcanoatos con el tiempo

1. Modelos explicativos de concentración de azúcares totales, microorganismos y PHA

Ecuación 23. Cambio de concentración de sustrato con el tiempo

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{-\mu_{max} \left(\frac{C_S - k_a}{k_s C_N + (C_S - k_a)} \right) C_N}{y_{x/s}}$$

Ecuación 24. Cambio de concentración de microorganismos con el tiempo

$$\frac{dC_N}{dt} = \mu_{max} \left(\frac{C_S - k_a}{k_s C_N + (C_S - k_a)} \right) C_N$$

Ecuación 25. Cambio de concentración de producto con el tiempo

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{\mu_{max} \left(\frac{C_S - k_a}{k_s C_N + (C_S - k_a)} \right) C_N}{y_{p/x}}$$

Cuadro 10. Parámetros cinéticos del modelo de Contois para la corrida experimental 1 con el modelo de las ecuaciones 23 a 25

Corrida	Parámetro	Símbolo	Valor
1	Velocidad máxima de crecimiento específica de Contois (h^{-1})	$\mu_{máx1}$	0.02191
	Constante de afinidad al sustrato	K_{s1}	0.045
	Rendimiento de concentración de microorganismos respecto al cambio de concentración de sustrato (m/m)	$y_{x/s1}$	0.112
	Rendimiento de generación de producto respecto al crecimiento celular (m/m)	$y_{p/x1}$	0.9995
	Constante terminal de sustrato de Contois (g/mL)	$ka1$	0.0092

Los parámetros cinéticos se obtuvieron simulando los datos experimentales en el software Berkeley Madonna.

Cuadro 11. Continuación de Parámetros cinéticos del modelo de Contois para las corridas experimentales 2 y 3 con el modelo de las ecuaciones 23 a 25

Corrida	Parámetro	Símbolo	Valor
2	Velocidad máxima de crecimiento específica de Contois (h^{-1})	$\mu_{m\acute{a}x2}$	0.03852
	Constante de afinidad al sustrato	K_{s2}	0.89
	Rendimiento de concentración de microorganismos respecto al cambio de concentración de sustrato (m/m)	$Y_{x/s2}$	0.98
	Rendimiento de generación de producto respecto al crecimiento celular (m/m)	$Y_{p/x2}$	0.5489
	Constante terminal de sustrato de Contois (g/mL)	$ka2$	0.0087
3	Velocidad máxima de crecimiento específica de Contois (h^{-1})	$\mu_{m\acute{a}x3}$	0.008
	Constante de afinidad al sustrato	K_{s3}	0.289
	Rendimiento de concentración de microorganismos respecto al cambio de concentración de sustrato (m/m)	$Y_{x/s3}$	0.19
	Rendimiento de generación de producto respecto al crecimiento celular (m/m)	$Y_{p/x3}$	0.062
	Constante terminal de sustrato de Contois (g/mL)	$ka3$	0.001

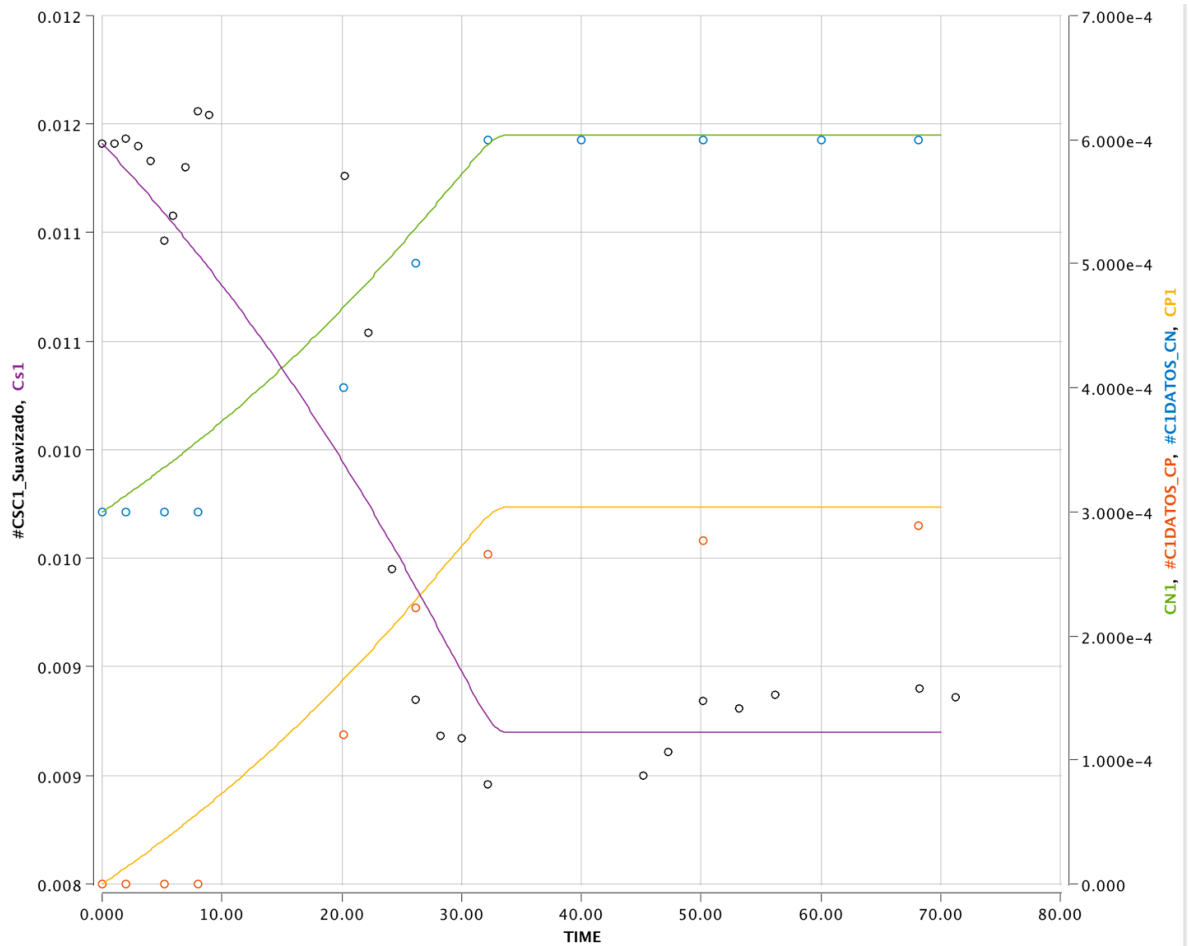
Los parámetros cinéticos se obtuvieron simulando los datos experimentales en el software Berkeley Madonna.

Cuadro 12. Continuación de Parámetros cinéticos del modelo de Contois para la corrida experimental 4 con el modelo de las ecuaciones 23 a 25

Corrida	Parámetro	Símbolo	Valor
4	Velocidad máxima de crecimiento específica de Contois (h^{-1})	$\mu_{\text{máx}4}$	0.0196
	Constante de afinidad al sustrato	K_{s4}	0.15017
	Rendimiento de concentración de microorganismos respecto al cambio de concentración de sustrato (m/m)	$y_{x/s4}$	0.58
	Rendimiento de generación de producto respecto al crecimiento celular (m/m)	$y_{p/x4}$	0.498
	Constante terminal de sustrato de Contois (g/mL)	$ka4$	0.0005

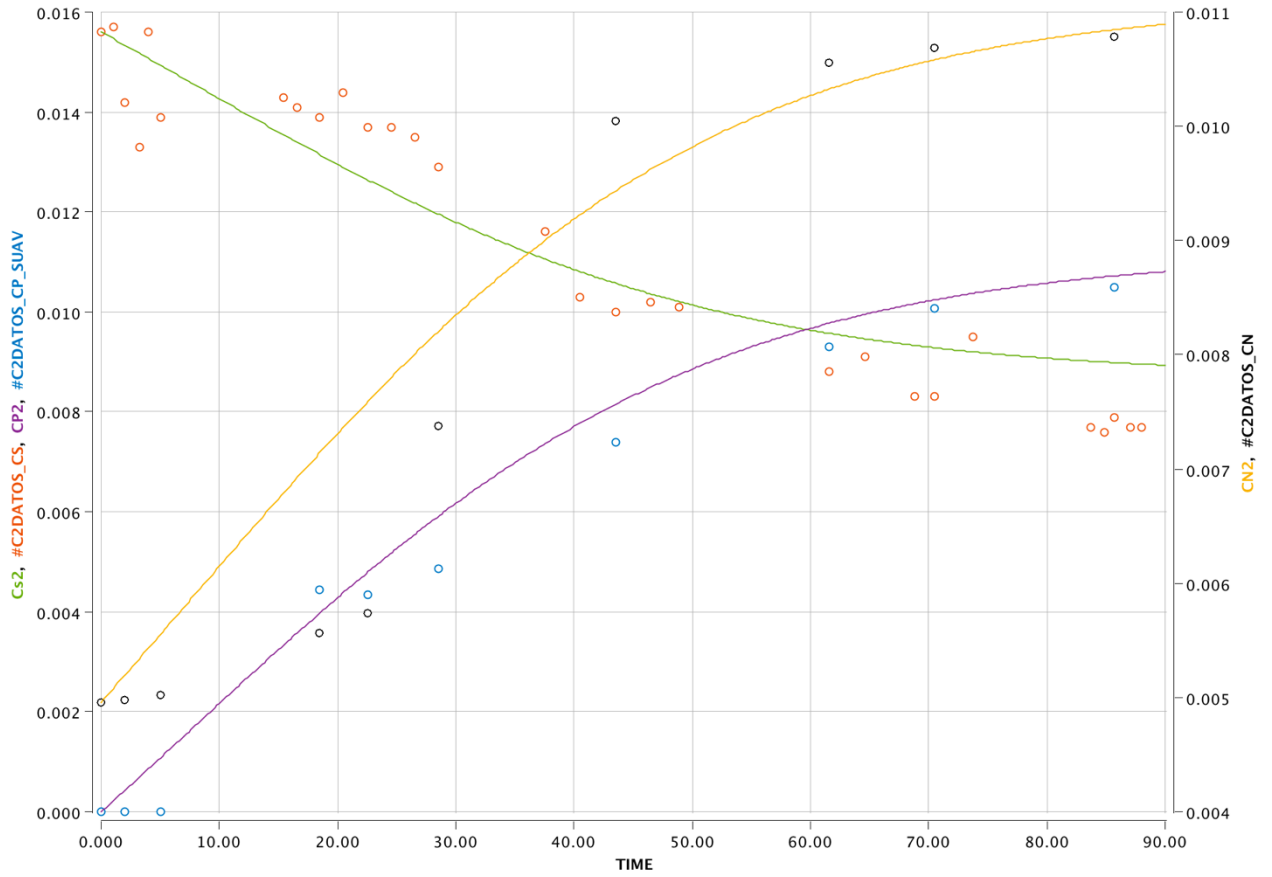
Los parámetros cinéticos se obtuvieron simulando los datos experimentales en el software Berkeley Madonna.

Figura 20. Modelo cinético y su predicción de los datos experimentales obtenidos para la corrida 1



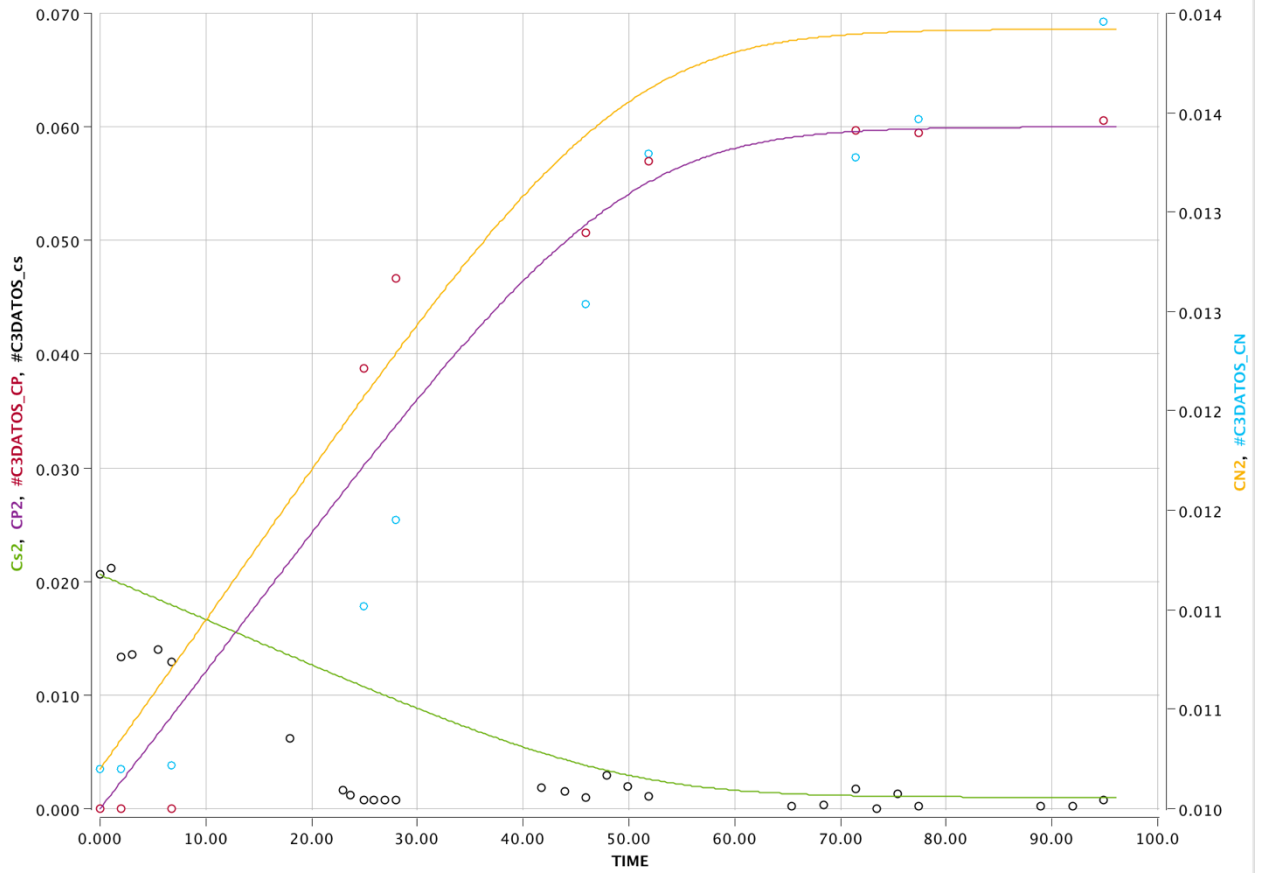
Donde #CSC1_Suavizados #C1DATOS_CN y #C1DATOS_CP son los datos para concentración de sustrato, microorganismos y producto de la corrida 1; Cs1, CN1 y CP1 son los modelos de las ecuaciones 23 a 25 para la concentración de sustrato, microorganismos y producto en función del tiempo.

Figura 21. Modelo cinético y su predicción de los datos experimentales obtenidos para la corrida 2



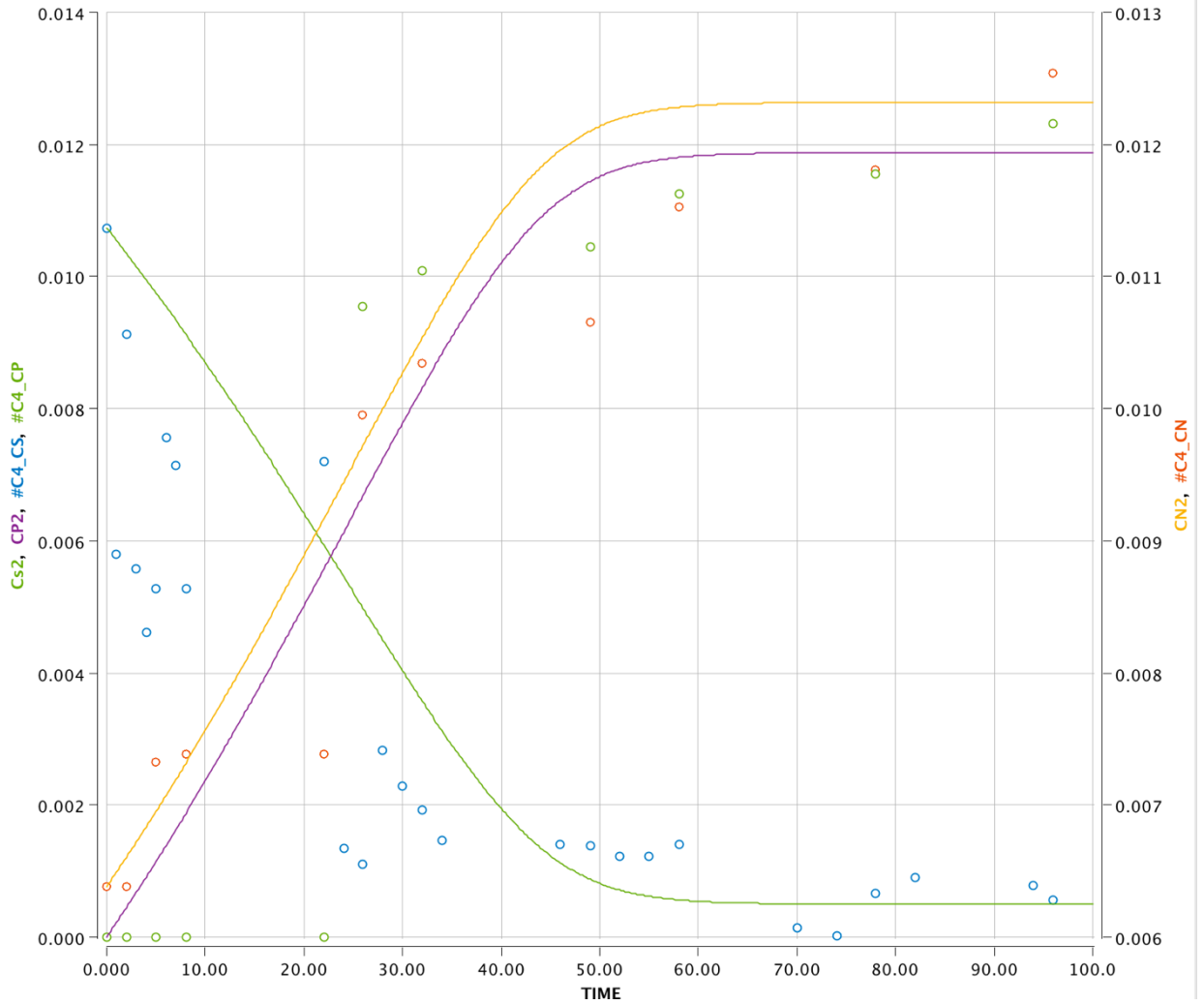
Donde #C2DATOS_CS, #C2DATOS_CN y #C2DATOS_CP_SUAV son los datos para concentración de sustrato, microorganismos y producto de la corrida 2; Cs2, CN2 y CP2 son los modelos de las ecuaciones 23 a 25 para la concentración de sustrato, microorganismos y producto en función del tiempo.

Figura 22. Modelo cinético y su predicción de los datos experimentales obtenidos para la corrida 3



Donde #C3DATOS_CS, #C3DATOS_CN y #C3DATOS_CP son los datos para concentración de sustrato, microorganismos y producto de la corrida 3; Cs2, CN2 y CP2 son los modelos de las ecuaciones 23 a 25 para la concentración de sustrato, microorganismos y producto en función del tiempo.

Figura 23. Modelo cinético y su predicción de los datos experimentales obtenidos para la corrida 4



Donde $\#C4_CS$, $\#C4_CN$ y $\#C4_CP$ son los datos para concentración de sustrato, microorganismos y producto de la corrida 3; Cs_2 , CN_2 y CP_2 son los modelos de las ecuaciones 23 a 25 para la concentración de sustrato, microorganismos y producto en función del tiempo.

2. Modelos explicativos modificados de concentración de azúcares totales, microorganismos y PHA

Ecuación 26. Cambio de concentración de sustrato con el tiempo

$$\frac{dC_{S3}}{dt} = \frac{-\mu_{max3} \left(\frac{C_{S3}}{k_{S3}C_{N3} + C_{S3}} \right) C_{N3}}{y_{x/s3}}$$

Ecuación 27. Cambio de concentración de microorganismos con el tiempo

$$\frac{dC_{N3}}{dt} = \mu_{max3} \left(\frac{C_{S3}}{k_{S3}C_{N3} + C_{S3}} \right) C_{N3}$$

Ecuación 28. Cambio de concentración de producto con el tiempo

$$\frac{dC_{p3}}{dt} = \frac{\mu_{max3} \left(\frac{C_{S3}}{k_{S3}C_{N3} + C_{S3}} \right) C_{N3}}{y_{p/x3}} + \frac{a}{(1 + e^{-(t-c)b})}$$

3. Modelos explicativos modificados de concentración de azúcares totales, microorganismos, PHA, concentración de subproductos, relación C:N y pH

Ecuación 29. Cambio de concentración de sustrato externa

$$\frac{dC_{S4}}{dt} = -k_t(C_{S4} - C_{Si4})$$

Ecuación 30. Cambio de concentración de sustrato interna

$$\frac{dC_{Si4}}{dt} = \frac{-\mu_{max4} \left(\frac{C_{Si4}}{k_{S4}C_{N4} + C_{Si4}} \right) C_{N4}}{y_{x/s4}} + k_t(C_{S4} - C_{Si4})$$

Ecuación 31. Cambio de concentración de microorganismos

$$\frac{dC_{N4}}{dt} = \mu_{max4} \left(\frac{C_{si4}}{k_{s4}C_{N4} + C_{si4}} \right) C_{N4}$$

Ecuación 32. Cambio de concentración de Producto

$$\frac{dC_{P04}}{dt} = \frac{\mu_p(C_{N4} - 0.00638)}{y_{p/x4}} + BC_{P04}$$

Ecuación 33. Cambio de pH en función de consumo de sustrato

$$\frac{dPH}{dt} = (Y_{PH/S}) \frac{dS}{dt}$$

Ecuación 34. Cambio de concentración de subproductos

$$\frac{dC_{PS4}}{dt} = \frac{\mu_{max4} \left(\frac{C_{si4}}{k_{s4}C_{N4} + C_{si4}} \right) C_{N4}}{y_{ps/x4}}$$

Ecuación 35. Cambio de relación C:N en función del tiempo

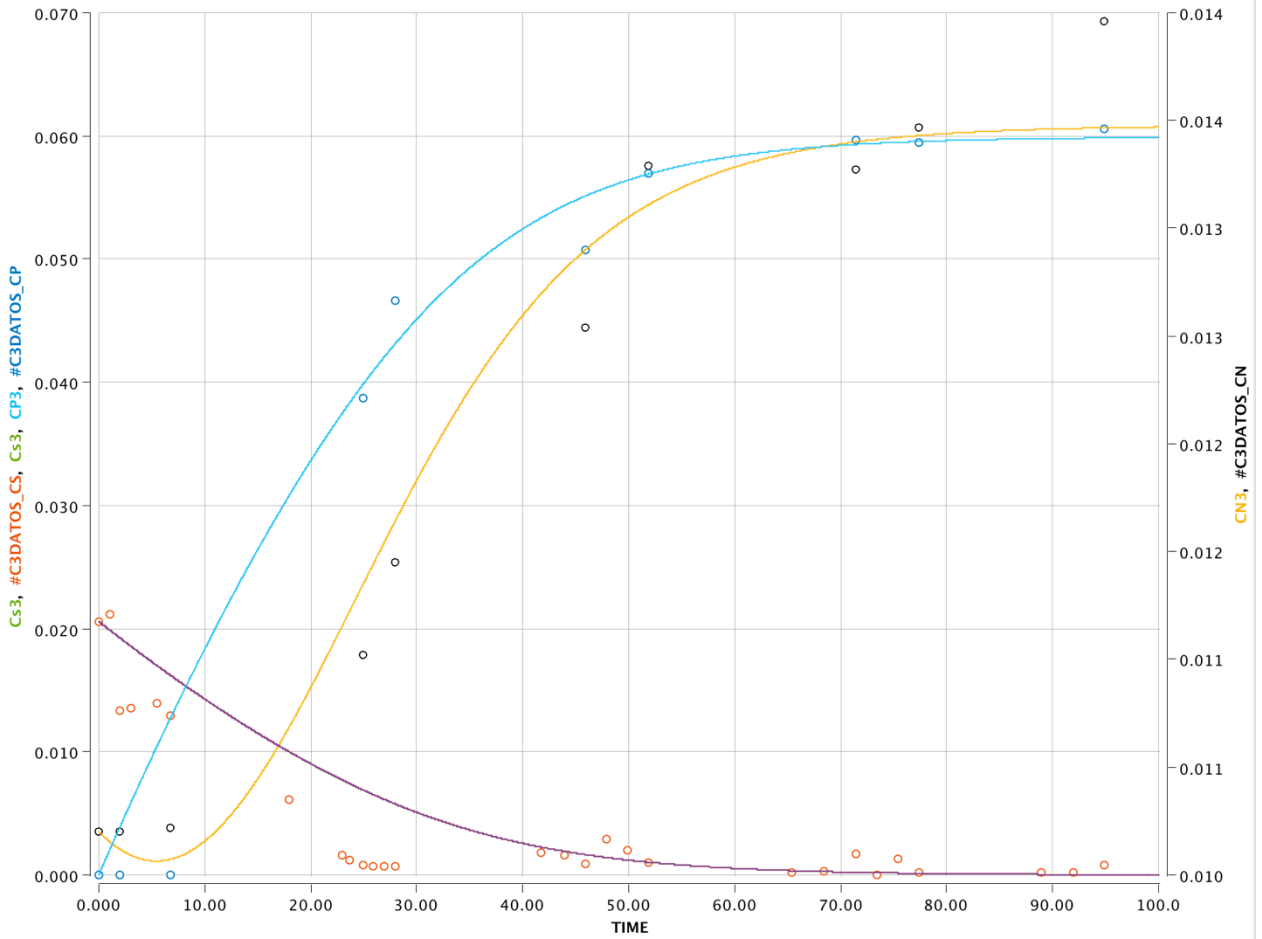
$$\frac{dC_{NN4}}{dt} = \frac{-\mu_{max4} \left(\frac{C_{si4}}{k_{s4}C_{N4} + C_{si4}} \right) C_{N4}}{y_{x/s4} y_{RCN}}$$

Cuadro 13. Parámetros cinéticos del modelo de Contois modificado para las corridas experimentales y modelo de las ecuaciones 26 a 35

Corrida	Parámetro	Símbolo	Valor
3	Velocidad máxima de crecimiento específica de monod (h^{-1})	$\mu_{m\acute{a}x3}$	0.048
	Constante de Monod	K_{s3}	1.25
	Rendimiento de concentración de microorganismos respecto al cambio de concentración de sustrato (m/m)	$y_{x/s3}$	0.4562
	Rendimiento de generación de producto respecto al crecimiento celular (m/m)	$y_{p/x3}$	0.1567
			-
			0.0006406
			8
	Coeficiente virial a (g/mL h)	a	8
	Coeficiente virial b (h^{-1})	b	-0.08679
	Coeficiente virial c (h)	c	2.92315
4	Velocidad máxima de crecimiento específica de monod (h^{-1})	$\mu_{m\acute{a}x4}$	0.03168
	Constante de Monod	K_{s4}	0.5656
	Rendimiento de concentración de microorganismos respecto al cambio de concentración de sustrato (m/m)	$y_{x/s4}$	0.5664
	Rendimiento de generación de producto respecto al crecimiento celular (m/m)	$y_{p/x4}$	
	Factor de rendimiento de sustrato en subproducto (m/m)	$y_{ps/x4}$	1.714
	Constante de transferencia de masa de sustrato al interior de la célula (h^{-1})	k_t	0.29017
	Constante de mantenimiento de producto (h^{-1})	B	-3.25
	Velocidad máxima de crecimiento específica para modelo exponencial (h^{-1})	$Maxp$	63.08398

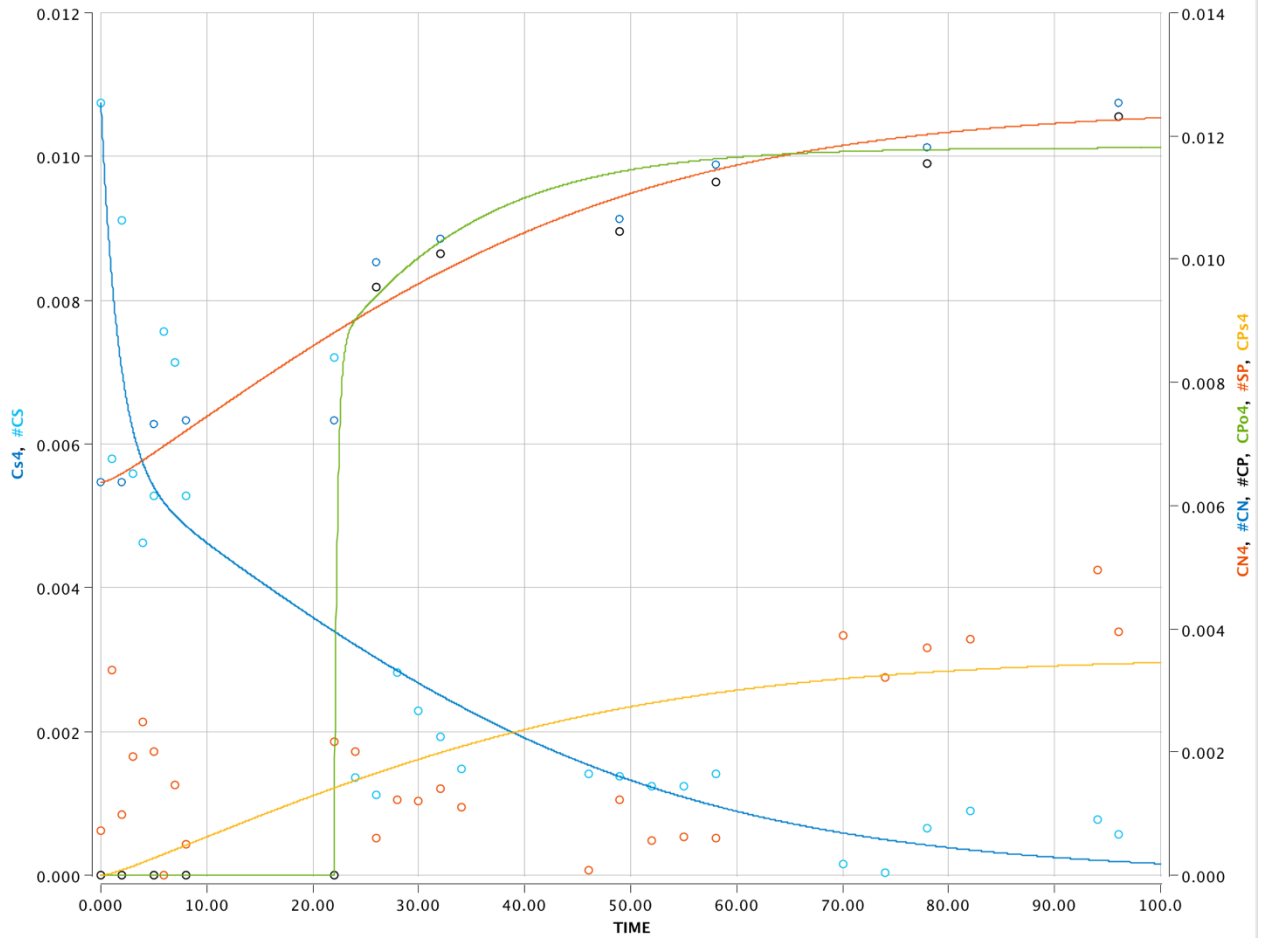
Los parámetros cinéticos se obtuvieron simulando los datos experimentales en el software Berkeley Madonna.

Figura 24. Modelo cinético modificado y su predicción de los datos experimentales obtenidos para la corrida 3



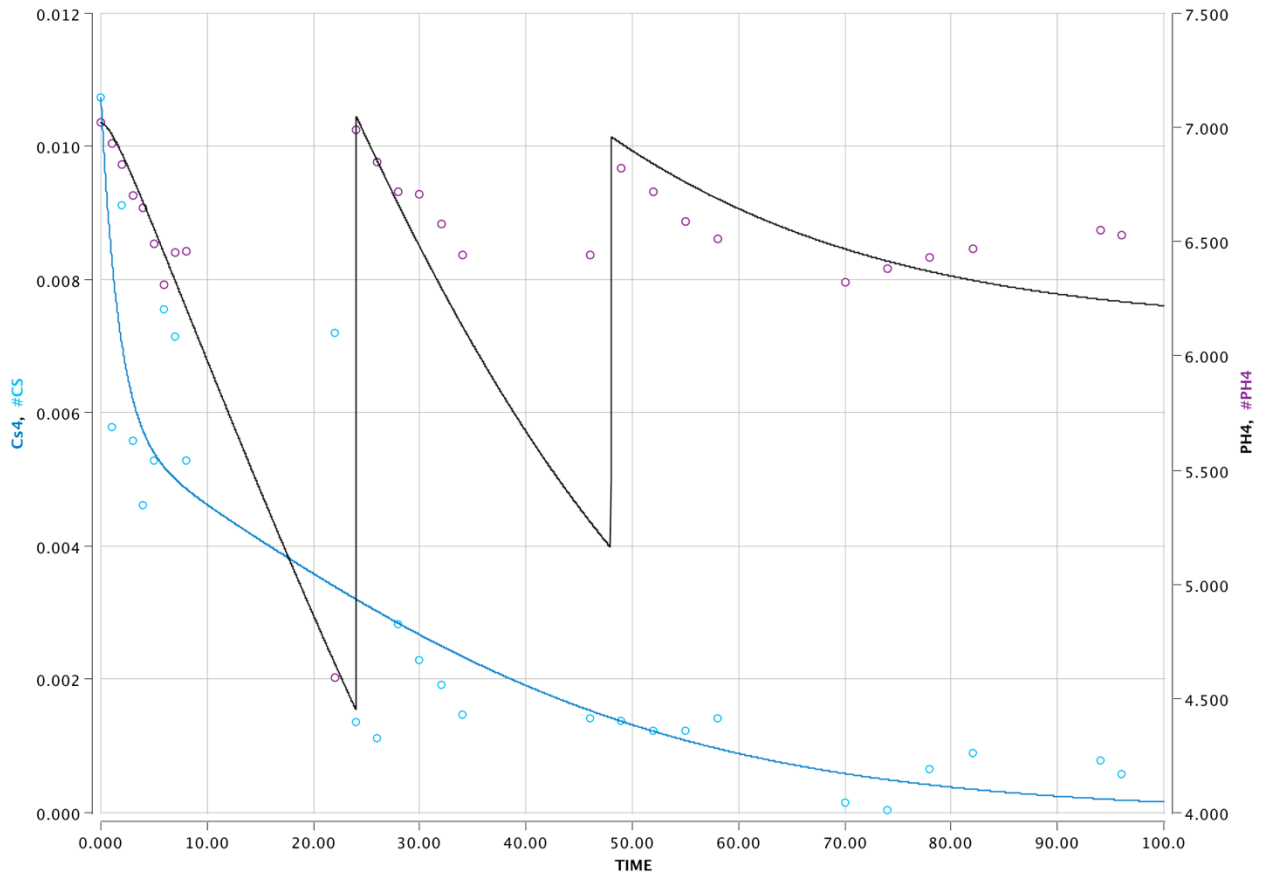
Donde #C3DATOS_CS, #C3DATOS_CN y #C3DATOS_CP son los datos para concentración de sustrato, microorganismos y producto de la corrida 3; Cs3, CN3 y CP3 son los modelos de las ecuaciones 26 a 28 para la concentración de sustrato, microorganismos y producto en función del tiempo.

Figura 25. Modelo cinético modificado y su predicción de los datos experimentales obtenidos para la corrida 4



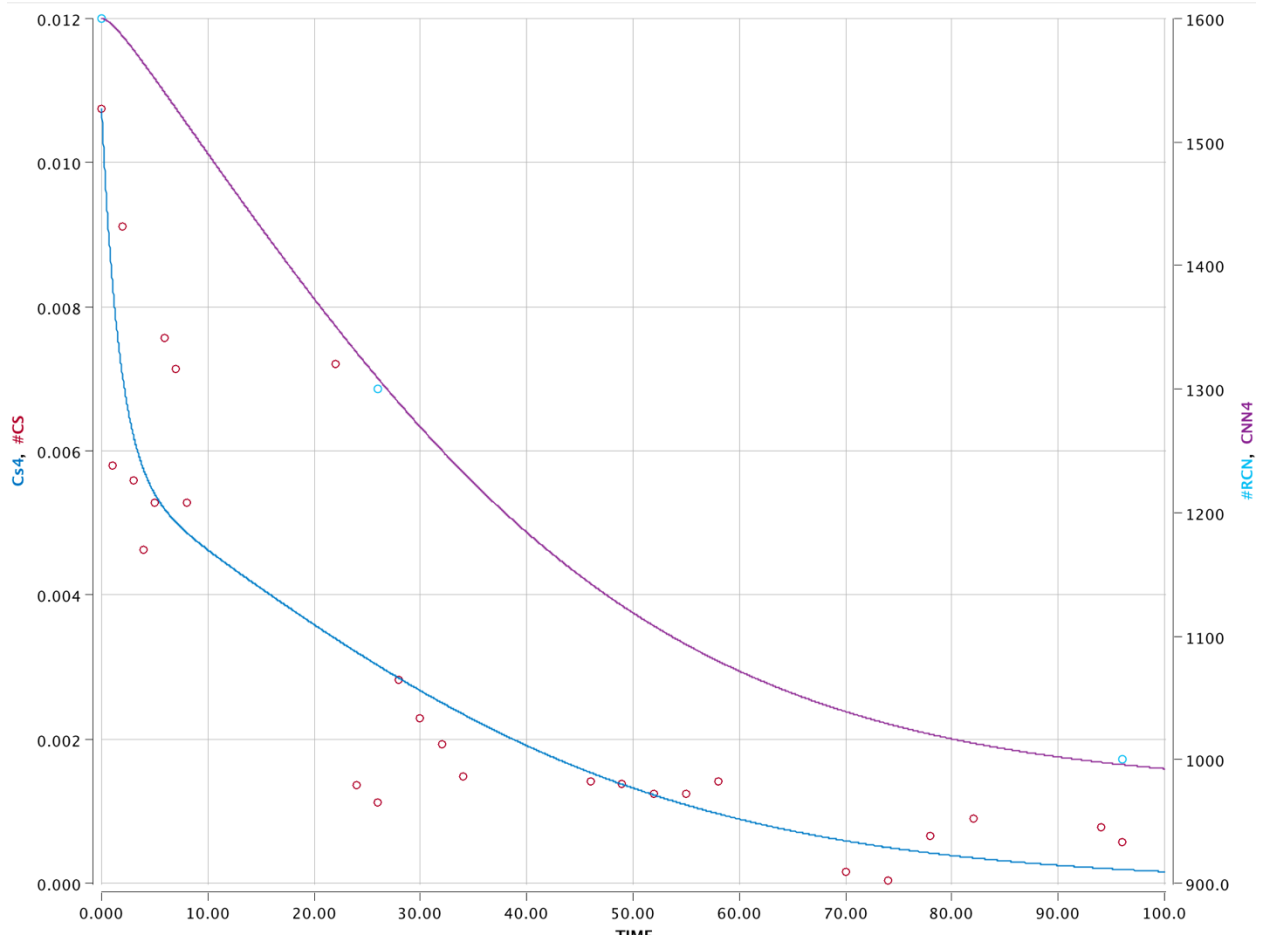
Donde #CS, #CN, #CP y #SP, son los datos para concentración de sustrato, microorganismos y subproducto de la corrida 4; Cs4, CN4, CPo4 y CPS4 son los modelos de las ecuaciones 29 a 32 y ecuación 34 para la concentración de sustrato, microorganismos, producto y subproducto en función del tiempo.

Figura 26. Continuación de modelo cinético modificado y su predicción de los datos experimentales obtenidos para el pH en la corrida 4



Donde #CS y #PH4 son los datos para concentración de sustrato y pH para la corrida 4; Cs4 y PH4 son los modelos de las ecuaciones 29 y 33 para la concentración de sustrato y pH en función del tiempo.

Figura 27. Continuación de modelo cinético modificado y su predicción de los datos experimentales obtenidos para la relación C:N en la corrida 4

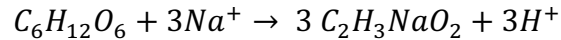


Donde #CS y #RCN son los datos para concentración de sustrato y relación C:N para la corrida 4; Cs4 y CNN4 son los modelos de las ecuaciones 29 y 35 para la concentración de sustrato y relación C:N en función del tiempo.

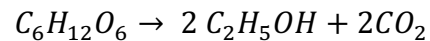
E. Balances de masa moleculares calculados a partir de la experimentación realizada

1. *Expresiones estequiométricas para la formación de subproductos*

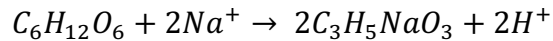
Ecuación 36. Formación de acetato de sodio a partir de glucosa



Ecuación 37. Formación de etanol a partir de glucosa

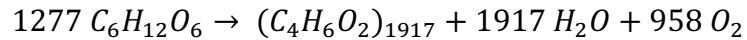


Ecuación 38. Formación de lactato de sodio a partir de glucosa



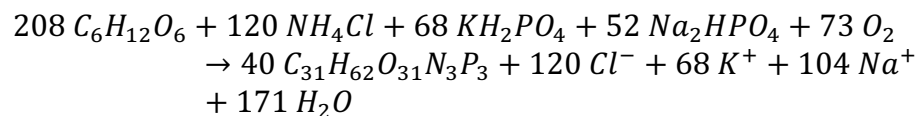
2. *Expresión estequiométrica para la formación de polihidroxialcanoato*

Ecuación 39. Formación de PHA a partir de glucosa



3. *Expresión estequiométrica para la producción de biomasa*

Ecuación 40. Producción de biomasa a partir de sales y glucosa



VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Un modelo cinético es útil para predecir el comportamiento de las variables que intervienen en una reacción. En el caso de la fermentación de PHA, las variables que afectan la generación del producto pueden ser extensas y con relaciones intrincadas que tienen como resultado el uso de modelos matemáticos complejos.

A. RENDIMIENTOS Y CONCENTRACIONES DE PHA A DIFERENTES CONDICIONES

La cuantificación de microorganismos, sustrato y polihidroxialcanoatos permitió observar que tanto el rendimiento de microorganismos, como la producción de PHA se ven influenciados por las condiciones del medio. Dentro de los parámetros que pueden afectar, según lo investigado, se encuentra el pH y la relación C:N al que se está llevando a cabo la fermentación. En el caso de la corrida 1, no hubo un control del pH, por lo que se permitió que el rango fuera libre. Esto tuvo influencia sobre el rendimiento de microorganismos con respecto al sustrato (y_x/s) el cual fue de $14.54 \pm 0.64\%$ (m/m) y el rendimiento de producto (y_p/s) que presentó un valor de $10.13 \pm 0.44\%$ (m/m). En promedio se trabajó con un pH de 4.48 ± 0.72 siendo el pH óptimo para la *Bacillus cereus* de 7.

Al mencionar el pH, este se observa presenta una influencia en el crecimiento de microorganismos y por lo mismo se encuentra relacionado con la producción de PHA, dado que este producto de interés es el resultado del almacenamiento de energía dentro de la célula al llevar a cabo su proceso metabólico. Bajo las condiciones de la corrida 1, se comprueba la influencia del mismo tanto en el crecimiento de microorganismos como en la producción de PHA, ya que para dicha fermentación se observaron los menores rendimientos. A su vez,

la relación C:N que se trabajó fue de 855.64 ± 3.27 (m/m) según lo reportado en las condiciones efectuadas por Calderón [8]. Valor del cual se puede observar, indica una deficiencia en la fuente de nitrógeno, que puede tener como consecuencia que no se acumule PHA dentro de la célula.

Por otro lado, para las corridas 2 y 3 se utilizaron buffers como medida de control del rango de pH. En el caso del buffer de la corrida 2, se utilizó ácido acético y su base conjugada, acetato de sodio. A pesar de controlar el pH con un buffer, se observó que este fue en promedio de 5.70 ± 0.78 y no cumplió con el pH óptimo de 6.5-7. Sin embargo, al considerar que se agregaba una fuente adicional de carbono al medio, esto tuvo como repercusión un consumo extra de carbono para los microorganismos. Por lo tanto se infiere que el ácido acético en lugar de mantener el pH, fue consumido por parte del microorganismo para la producción de PHA.

De igual forma, se aumentó la fuente de nitrógeno (ver cuadro 6) teniendo como resultado una relación C:N de 172.53 ± 1.46 (m/m) la cual es significativamente menor a la trabajada en la corrida 1. La suma de estos factores en las condiciones tiene como consecuencia un rendimiento de microorganismos del $72.96 \pm 1.81\%$ (m/m) y un rendimiento de producto del $71.45 \pm 1.63\%$ (m/m) con respecto al cambio de sustrato, para ambos casos (ver cuadro 7). Considerando que el buffer es de ácido acético y acetato, se puede establecer que el aumento en la fuente de carbono es la principal responsable de dichos rendimientos. Sin embargo, para el escalamiento del proceso al utilizar dichos compuestos, se necesitaría incurrir a mayores costos de materia prima. Por lo que al comparar con otras condiciones que presentaron rendimientos altos, como la corrida 4, en donde el pH se reguló únicamente con una base fuerte y los resultados fueron favorecedores, se infiere se tendrán mejores rentabilidades utilizando una base fuerte como el hidróxido de sodio para regular el pH de la fermentación, en lugar de un buffer de ácido acético o de fosfatos, con el fin de mejorar la rentabilidad del proceso en un potencial escalamiento.

En cuanto a la fermentación 3 se decidió utilizar un buffer de fosfatos, con el fin de no influenciar la concentración del sustrato y poder mantener el pH en el rango óptimo. A pesar de tomar dichas medidas, el pH en la hora 20 decayó a 4, lo cual era inaceptable debido a su influencia sobre las funciones metabólicas del microorganismo. Esta disminución de pH se puede inferir es un indicador que el fosforo agregado en el Buffer fue consumido, eliminando el efecto amortiguador del mismo. Por lo tanto se observó la necesidad de ajustar el pH utilizando hidróxido de sodio para mantener las condiciones que favorecen a la producción de PHA y trabajar con un pH que en promedio fue de 6.52 ± 0.42 . De igual manera, se aumentaron la cantidad de sales y por lo mismo la fuente de nitrógeno, por lo que en esta corrida se trabajo con una relación C:N de 56.80 ± 8.49 (m/m). Los rendimientos que se obtuvieron fueron de $19.01 \pm 0.83\%$ (m/m) para la concentración de microorganismos con respecto a sustrato y $18.33 \pm 0.79\%$ (m/m) del producto con respecto a sustrato.

A pesar de trabajar en un mejor rango de pH y respetar las concentración de sustrato óptimo de 3% de melaza establecida por investigaciones previas del CPI, los rendimiento que se observan en la corrida 3 son menores en comparación con los que se obtuvieron en la corrida 2. Esto puede deberse al efecto que tuvo la manipulación de pH, dado que en ese momento se observa el inicio de la fase exponencial. Siendo esta en donde se observa la mayor producción de PHA dentro de todas las corridas de fermentación efectuadas. En el caso de la corrida 1, se observó que en la fase exponencial la producción de PHA fue de 1.45 ± 0.01 g, la cual es mayor en comparación con los 1.20 ± 0.01 g de la fase lag y 0.23 ± 0.01 g de la fase estacionaria. El mismo comportamiento se observa para la corrida 2 en donde durante la fase exponencial la producción fue de 45 ± 0.01 g y para la corrida 3 de 36.36 ± 0.01 g.

Debe de considerarse, que el proceso de purificación realizado durante las corridas implica la utilización de partes iguales de cloroformo e hipoclorito de sodio para realizar el proceso de lisis celular y liberar el contenido de PHA producido.

Este proceso es necesario estudiarlo a detalle, para poder maximizar la cantidad recuperada para dicho polímero. A su vez, es importante la evaluación de las condiciones de reacción de temperatura y oxígeno disuelto para establecer su influencia y determinar la mejor combinación de condiciones para aumentar los rendimientos reportados.

En cuanto a la corrida 4 se decidió controlar el rango de pH utilizando hidróxido de sodio, una base fuerte, de manera que no hubiese interferencia con respecto a las sales que se le agregaban y la relación de estas con respecto al sustrato. Según la literatura, la relación C:N necesaria para un buen crecimiento de microorganismos y un buen rendimiento de producto es de 20 ± 0.62 (m/m). Considerando esto, se agregaron las sales suficientes para asegurar que la fermentación se de a una relación de C:N 20 y se mantuvo el medio a un pH promedio de 6.54 ± 0.44 . Con estas consideraciones se obtuvo un rendimiento de microorganismos del $60.53 \pm 1.35\%$ (m/m) y un rendimiento de producto del $52.27 \pm 1.11\%$ (m/m).

Comparando los mejores rendimientos obtenidos en las fermentaciones (corridas 2 y 4), con los reportados en la literatura, que reportan valores de 62.21% (m/m) [6] y 20% (m/m) [7] de acumulación de PHA, puede establecerse que los rendimientos obtenidos se encuentran en un rango igual o superior. Esto se debe a la selección de condiciones que inducen la acumulación del polímero, las cuales se encontraban reportadas previamente en la literatura y constituyen la base del diseño experimental elaborado. Sin embargo, debe mencionarse que lo reportado en este trabajo es específico para la cepa de *B. cereus*; mientras que en otros trabajos citados, se han empleado otros microorganismos y técnicas de purificación.

Respecto al diseño experimental, debe considerarse que el número de corridas y las formulaciones del medio de cultivo llevadas a cabo en cada una, se realizaron considerando las condiciones y componentes más relevantes que se reportaban en investigaciones previas. Debido a que, las posibles combinaciones de

las condiciones a evaluar dan lugar a un potencial de 2.43×10^{18} corridas probables (contemplando 20 variables), no es posible un enfoque probabilístico; sino que debe de tratarse de una forma analítica, que asegure la obtención del polímero deseado. Los métodos analíticos y de purificación empleados, fueron analizados con respecto al error que presentan, utilizando un porcentaje de variación para cada una de las corridas realizadas. Puede observarse de los cuadros 17 a 22, 27 a 36, 41 a 46 y 51 a 57 que los porcentajes de variación obtenidos son menores al 15% y se tiene mayor incertidumbre en la cuantificación de microorganismos.

Ahora bien, a pesar que en la corrida 2 se hayan obtenido rendimientos mayores en comparación con la corrida 4, no se esta tomando en cuenta la masa final a la que se llega en cada una. Dentro de todas las condiciones que se probaron, esta fue la que presentó una mayor masa final de células con un valor final de 61.56 ± 4.06 g. Con respecto a la producción de polihidroxialcanoatos, se pudo observar que en la fase exponencial se obtuvieron 37.4 ± 0.01 g de PHA, 12.5 ± 0.01 g en la fase estacionaria y 3.6 ± 0.01 g en la fase lag. Dando como resultado una masa de producto final de 53.16 ± 4.74 g de PHA.

Por lo tanto se observa que nuevamente se mantiene el comportamiento en donde en la fase exponencial se produce la mayor cantidad de producto. Lo cual presenta una relación con respecto al metabolismo del microorganismo, puesto que es en esta fase en donde se observa la mayor cantidad de almacenamiento de energía. A su vez confirma la relación del pH con el crecimiento de microorganismos, el cuál considerando que el PHA es un producto intracelular, es de suma importancia para el aumento del rendimiento del producto. Derivado de esto, se podría sugerir realizar investigaciones con microorganismos adaptados al medio, de forma que se pueda reducir la fase lag por haberse comprobado la baja productividad de PHA en dicha fase.

B. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO

La cuantificación de sustrato, microorganismos y productos permitieron observar el comportamiento presentado por cada corrida de fermentación efectuada. En el caso de la corrida 1, se pudo observar que el decaimiento del sustrato al inicio de la reacción es muy acelerada, pero a la hora 25 hay un estancamiento tanto para el sustrato como para los microorganismos. La tendencia del decaimiento del sustrato corresponde y explica la producción de PHA (Figura 10) y el crecimiento de microorganismos (Figura 11) bajo las condiciones reportadas para dicha fermentación. Considerando que en la hora 25, el pH es lo suficientemente bajo para limitar el crecimiento de microorganismos, se puede establecer que este hecho es de los principales impulsores del uso de buffer para evitar descensos bruscos de pH en las corridas posteriores.

De la misma forma, se puede observar en el comportamiento de la producción de PHA de la corrida 2 (Figura 12), un decaimiento abrupto de sustrato con la diferencia que no existe un estancamiento pasada una cierta cantidad de tiempo. Lo que se observa en su lugar, es un continuo consumo de sustrato y generación de producto que se prolonga hasta la hora 90. Esto se puede atribuir al uso de buffer, que al tratarse de un compuesto carbonado, puede ser aprovechado por los microorganismos como fuente de carbono. Este hecho ocasionó rendimientos aceptables de producto, los cuales presentan una tendencia similar al comportamiento esperado a un crecimiento microbiano (Figura 13). Si bien las condiciones de la corrida 2 generan una cantidad considerable de masa final de producto, también dan lugar a la generación de subproductos (Figura 14); principalmente al inicio de la fermentación durante la etapa lag y exponencial, para que luego se conserven de forma constante durante las etapas de sustrato bajo.

En la corrida 3, derivado del ajuste de la relación C:N, se puede observar que en este caso el consumo de sustrato se encuentra más acelerado que en los casos anteriores. Desde el inicio de la reacción, la aceleración del consumo de sustrato ocasiona concentraciones bajas del mismo antes de las 30 horas. Este

comportamiento no corresponde directamente con el incremento de concentración de PHA (Figura 15) y microorganismos (Figura 16), los cuales muestran valores en crecimiento hasta las 96 horas. Esto puede deducirse es ocasionado porque los valores que se utilizaron para las relaciones C:N y C:P, inducen a tener limitantes en la transferencia de masa de los compuestos necesarios para sintetizar el PHA y el crecimiento de microorganismos.

Es importante mencionar que para la corrida 3, alrededor de la hora 20 se realizó una adición de hidróxido de sodio para mantener los niveles de pH en los valores recomendados. Esta incursión tuvo lugar, dado que a pesar de contar con un buffer en el medio, el efecto amortiguador de dicho control fue superado por los cambios inducidos en los microorganismos; teniendo como consecuencia una posible alteración en el comportamiento del crecimiento y generación del producto.

Analizando el comportamiento de la corrida 4 en las figuras 17, 18 y 19, se puede observar que el comportamiento es más acelerado en el arranque de la reacción para el consumo de sustrato con un crecimiento microbiano casi inmediato. A pesar de esto, se muestra una tendencia ascendente para el crecimiento de microorganismos hasta las 96 horas con una leve desaceleración alrededor de la hora 40. Nuevamente las relaciones C:N y C:P se deduce indujeron el comportamiento; así como las regulaciones que se realizaron al pH, las cuales en este caso fueron ajustes con hidróxido de sodio cada 20 horas. Las adiciones efectuadas pudieron asegurar un consumo acelerado de sustrato, dado que la fermentación se realizó en el rango óptimo de pH para la ejecución del ciclo metabólico de los microorganismos. Esto provoca un mejor rendimiento, comparable con el obtenido en la corrida 2 con la diferencia de que se obtuvo un mejor crecimiento microbiano. Cabe resaltar, la generación de ácidos orgánicos como subproductos, los cuales incrementan considerablemente en la etapa final de la reacción. Es decir en la hora 50 en adelante, lo cual conlleva a considerar el tiempo de reacción efectivo necesario para llegar a concentraciones que no requieran más operaciones unitarias de purificación.

A su vez, esta generación de subproductos limita la cantidad de PHA que se produce en la fase de desaceleración y en la fase estacionaria, por lo que estudiar las potenciales modificaciones al genoma del *Bacillus cereus*, que reduzcan la generación de dichos ácidos podría potenciar la mayor productividad de generación de PHA.

C. INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS IR

Dentro de los constituyentes básicos que conforman y permiten identificar a un polihidroxialcanoato (PHA) de cualquier índole, se puede mencionar la presencia del grupo carbonilo presente estructuralmente en el éster que constituye al monómero del polímero en cuestión. Los grupos carbonilos se encuentran representados por picos característicos, que para el caso de los ésteres, se pueden observar en el rango de frecuencias de 1750 a 1735 cm^{-1} . Si se analiza el comportamiento de las corridas 2, 3 y 4 (ver Cuadro 9), se puede apreciar que todas presentan un pico característico que es atribuido al carbonilo. De igual manera en el caso de las corridas 2 y 3, se pudieron observar los armónicos correspondientes a la presencia del carbonilo alrededor de una frecuencia de 3400 cm^{-1} . Por lo tanto se infiere que estructuralmente, en efecto hay una presencia del grupo carbonilo en el producto obtenido.

Sin embargo en las corridas 3 y 4, se presenta un pico más grande en la región de 3650 a 3590 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de tensión O–H. Esto puede llevar a la deducción con respecto a que después de la purificación que se realizó, quedaron remanentes de azúcar o bien corresponden a la presencia de un ácido carboxílico en la estructura del producto. A pesar de esto, se puede establecer que los IR para las corridas 2, 3 y 4 se aproximan más al espectro IR del PHA que al de la glucosa presente en el sustrato, dado que comparando la huella espectral de dos estándares de PHA distintos con los resultados de IR que se obtuvieron, hay coincidencias con los movimientos del estiramiento del carbonilo presentes en esta región para cada estándar. Estos estiramientos se dan en las frecuencias de 1210 a

1160 cm^{-1} para el estiramiento de carbonilo C–C–O y 1100 a 1030 cm^{-1} para el estiramiento O–C–C. Por lo tanto se puede establecer que efectivamente se produjo el producto de interés.

La variante estructural que se encontró entre espectros, es la presencia de un estiramiento de acetato alrededor de 1240 cm^{-1} en el caso de la corrida 3; mientras que las corridas 2 y 4 no presentan dicho estiramiento. A pesar de esto, el producto de las corridas 2 y 4, presentan mayor similitud entre sí con la diferencia que el producto obtenido en la corrida 4 puede presentar un grupo carbonilo en su estructura. Por lo tanto se puede inferir que el PHA que se obtuvo, se vio influenciado por las condiciones del medio por lo que estructuralmente pueden presentar variaciones entre sí.

Con respecto a la corrida 1, no se encontró la presencia del grupo carbonilo y no hubo coincidencia con los estándares. Pese a esto, cabe mencionar que el proceso de purificación es agresivo ante cadenas oligoméricas. Por lo que se debería de analizar que en esas condiciones en efecto se produzca el polímero deseado. Con base en estos resultados, es importante hacer un estudio de tamaños de cadena con técnicas de cromatografía por permeación en gel para cada una de las condiciones, además de la estructura química por cristalografía y composición elemental de los compuestos obtenidos; de manera que se pueda verificar la influencia que las condiciones tienen sobre las características químicas del compuesto y así inferir sus propiedades macroscópicas y mecánicas.

D. MODELO MATEMÁTICO

Según los datos obtenidos en cada corrida, se buscó determinar si con modelos matemáticos generalmente aceptados se logra una predictibilidad aceptable de su comportamiento. Es por esto que se verificó si el modelo de Monod lograba predecir el comportamiento obtenido. En este caso, el análisis indicó que Monod generaba curvas con una concavidad que no se ajustaba a los datos. De acuerdo a la reacción de generación de PHA, se establece que la generación de dicho

producto depende en gran medida de la concentración de células presentes. Considerando este comportamiento, se determinó que el segundo modelo a analizar debiese ser el modelo de Contois. Este modelo presenta la característica de permitir acelerar consumos de sustrato e incrementos de concentración celular, utilizando la concentración de células dentro de la definición de la velocidad específica de crecimiento de microorganismos. A partir del uso del modelo de Contois, se logró mejorar la concavidad detectada que aquella obtenida para Monod. Por esta razón en las figuras 20 a 23, se puede observar que el modelo de Contois permite una predictibilidad aceptable para los datos obtenidos en las corridas 1 y 2, en donde no hubo una manipulación del pH con una base fuerte.

El modelo modificado de Contois, se encuentra integrado con las ecuaciones 23 a 25, de donde se observan las variables de concentración de sustrato y concentración de microorganismos, como las principales promotoras de los cambios de concentración de sustrato, microorganismos y de producto con el tiempo. Dentro de estas variables también se observan los parámetros K_s , $\mu_{m\acute{a}x}$, $y_{x/s}$, $y_{p/x}$ y k_a que vendrían siendo la constante de Monod, la velocidad máxima de crecimiento específica, el rendimiento de concentración de microorganismos respecto al cambio de concentración de sustrato, rendimiento de generación de producto respecto al crecimiento celular y constante termina de sustrato de Monod respectivamente.

Analizando los resultados obtenidos como un modelo explicativo de Contois se puede observar en los cuadros 10 a 12, que K_s en la corrida 2 presenta el mayor valor, mientras que en la corrida 1 se encuentra el menor valor dentro de las cuatro corridas realizadas. Al ser K_s un parámetro que establece el grado de afinidad, se puede observar que la corrida 1 presenta la mayor afinidad bajo las condiciones de reacción empleadas. Sin embargo, al complementar el grado de afinidad con los parámetros de $\mu_{m\acute{a}x}$ y $y_{x/s}$, se puede establecer que las corridas 2 y 4 son las que presentan una mayor aceleración y proporción de conversión de sustrato a microorganismos. Lo cual en este caso por las ordenes de magnitud de

las constantes, influencia con mayor contundencia los cambios de las concentraciones de las especies en la mezcla reactiva. Esto significa que para las corridas 2 y 4, el consumo de sustrato genera con mayor efectividad un crecimiento microbiano.

Al comparar los valores de rendimiento de producto con respecto a cambio de concentración de microorganismos, se puede apreciar que bajo las condiciones de la corrida 1 se propicia un mayor cambio en la concentración de producto al incrementar la concentración de microorganismos. Pese a esto, como se discutía con anterioridad, son las corridas 2 y 4 las que presentan una mayor velocidad máxima de crecimiento específico. Por lo que, aun cuando estas corridas no presenten el mayor valor para y_{p/x_s} , continúan siendo las condiciones en donde se obtienen los mayores valores de concentración final de producto.

Dentro de las limitantes del modelo de Contois propuesto, se pueden encontrar las variantes en el consumo de sustrato como consecuencia del pH. Este fenómeno se puede demostrar con el comportamiento que se obtuvo en las corridas 1 y 2 (figuras 20 y 21), en donde el pH se mantuvo sin incidencia externa ya sea por medio del uso de un buffer o dejando libre el rango de concentración de hidronios generados en el medio. Como se puede ver en dichas figuras, la concentración de sustrato se puede predecir en ambos casos con las ecuaciones 23 a 25.

Sin embargo, en el caso de la manipulación de pH como lo sucedido en las corridas 3 y 4, se puede ver en las figuras 22 y 23 que la concavidad de las curvas con este modelo no permiten predecir de buena manera el comportamiento del sustrato. A su vez, las distintas concentraciones de nutrientes empleadas en cada corrida propiciaron que el incremento de concentración de microorganismos y PHA tuviesen un comportamiento catalogable como un retardo con respecto al consumo de sustrato. Por lo tanto se observa de forma definitiva la necesidad de modificar el modelo original para garantizar la predictibilidad en estas corridas.

Para modificar el modelo de Contois, se buscó emplear inicialmente una forma de ecuación virial que lograra expresar el retardo detectado en el crecimiento de microorganismos y generación de producto. Esta modificación consta de una ecuación exponencial, que es función del tiempo y que presenta los coeficientes viriales a , b y c . Dichos coeficientes constituyen el factor de aceleración de consumo de sustrato, el tiempo de retardo y la constante de proporcionalidad del crecimiento con el tiempo respectivamente. Puede observarse en la Figura 24 que al realizar esta modificación para la corrida tres, la predictibilidad de los datos experimentales con el modelo mejora bajo esas condiciones. Sin embargo, el modelo virial no logra correlacionar la dependencia de todos los factores que influyen en la fermentación. De manera que para predecir el comportamiento de los datos en la corrida 4, se hace necesario introducir otro tipo de modificaciones.

Las modificaciones necesarias para relacionar todos los factores estudiados, se enfocaron en tres áreas específicas: (1) La transferencia de masa del sustrato, existe entre el medio fermentativo y el interior de la células. Lo cual da lugar al desfase de consumo de sustrato con respecto al incremento del conteo celular. (2) La introducción de un modelo de Tissier modificado para la predicción del incremento de producto, permite una mayor aceleración en el incremento de la concentración de producto alcanzado el punto crítico de formación del mismo. (3) La introducción de funciones discontinuas para la predicción del pH y su influencia sobre la variación en la concentración de las especies en el medio fermentativo. Con estas modificaciones, se puede observar de las figuras 25, 26 y 27, que la predicción con las ecuaciones 29 a 35 con los parámetros mostrados en el Cuadro 11 se ajustan a los datos experimentales obtenidos; permitiendo un modelo explicativo de los factores internos y externos, que influenciaron durante la fermentación.

E. BALANCE DE MASA

Con el fin de comprender el comportamiento de las diferentes especies involucradas en la reacción de fermentación para la producción de PHA, se desarrolló un balance elemental. El mismo parte del consumo de glucosa, debido a que según la teoría es el sustrato de preferencia se emplea en la producción de PHA. Este último, se comprobó al cuantificar el consumo de sacarosa, glucosa y fructosa; dado que se pudo observar que el mayor consumo se obtuvo para la glucosa. Con base en esto, conociendo las proporciones de los nutrientes suministrados y el incremento de la concentración de microorganismos, se pudo determinar la fórmula elemental representativa del *B. cereus*. Lo mismo se desarrolló en el caso del producto. En donde al conocer el monómero característico para el PHA más común, se determinó su proporción molar con respecto al consumo de sustrato.

La unión de estas ecuaciones son la base de futuros desarrollos, para permitir correlacionar las entradas y salidas de un sistema fermentativo. Y se complementan con el modelo cinético para predecir el comportamiento con el tiempo.

IX. CONCLUSIONES

1. La cuantificación de microorganismos, sustrato y polihidroxialcanoatos permitió establecer que las condiciones con una relación C:N 172.53 ± 1.46 (m/m) a pH promedio 5.70 ± 0.78 ; y C:N 20 ± 0.62 (m/m) a pH promedio 6.54 ± 0.44 con las se llevaron a cabo la fermentación de melaza con *Bacillus cereus*, presentaron los mayores rendimientos de las condiciones evaluadas. Teniendo rendimientos de microorganismos con respecto a sustrato ($y_{x/s}$) de $72.96 \pm 1.81\%$ (m/m) y $60.53 \pm 1.35\%$ (m/m) respectivamente; y rendimientos de concentración de producto con respecto a consumo de sustrato ($y_{p/s}$) de $71.45 \pm 1.63\%$ (m/m) y $52.27 \pm 1.11\%$ (m/m) respectivamente.
2. Se determinó que dentro de las fases de crecimiento de microorganismos, la fase exponencial es la responsable de la mayor generación de producto en todas las corridas de fermentación efectuadas, como se observa en el caso de la corrida 2 (ver Cuadro 8), en donde se generaron 45.00 ± 0.01 g de PHA en comparación de los 6.00 ± 0.01 g de la fase lag y 5.8 ± 0.01 g en la fase estacionaria.
3. Los espectros IR para las corridas 2, 3 y 4 muestran picos del grupo carbonilo característicos para los ésteres en las regiones de 1750 a 1735 cm^{-1} y estiramientos del mismo en las frecuencias de 1210 a 1160 cm^{-1} y 1100 a 1030 cm^{-1} , por lo que el producto obtenido en las corridas presenta grupos funcionales característicos de la estructura definidas para el PHA.
4. Se determinó que el modelo de Contois predice las concentraciones de microorganismos, PHA y azúcares fermentables de las condiciones estudiadas sin adición de hidróxido de sodio para regular el pH como se observa en las figuras 20 y 21.

5. Se determinó que es necesario modificar el modelo de Contois con coeficientes viriales o una forma derivada del modelo de Tissier y coeficientes de transferencia de masa, para predecir el comportamiento de las concentraciones microorganismos, PHA y azúcares fermentables cuando el pH es regulado con una base fuerte añadida al medio.
6. Comparando los parámetros cinéticos del modelo de Contois obtenidos a las diferentes condiciones, se establece que la relación C:N 855.64 ± 3.27 (m/m) y pH no regulado promedio de 4.48 ± 0.72 producen el menor valor de K_s (0.045 (m/m)) que se atribuye a la mayor afinidad del microorganismo por el sustrato disponible.
7. Para poder modificar el modelo de Contois y permitir la predictibilidad de concentraciones bajo las condiciones C:N de 20 ± 0.62 (m/m) y un pH promedio de 6.54 ± 0.78 , se determinó que el fenómeno de transferencia de masa del sustrato hacía el interior de la célula debe incluirse como una constante de transferencia de masa de 0.290 h⁻¹.
8. Se determinó que a una relación C:N de 20 ± 0.62 (m/m) y un pH promedio de 6.54 ± 0.78 , se puede obtener la mayor masa final de microorganismos dentro de las condiciones estudiadas, dado que se obtuvo una masa de microorganismos final de 61.56 ± 4.06 g en 10 L de fermentado, lo cual a su vez se fundamenta con los ordenes de magnitud de los parámetros cinéticos de μ_{\max} de 0.0196 (h⁻¹) y $y_{x/s}$ de 0.58 (m/m).
9. El uso de un buffer de ácido acético y su base conjugada, permitió obtener los mayores rendimientos de microorganismos con respecto al consumo de sustrato con un valor de $72.96 \pm 1.81\%$ (m/m) y rendimiento de concentración de producto con respecto a sustrato que fue de $71.45 \pm 1.63\%$ (m/m). Esto se debe al aumento de carbono en el medio y el efecto amortiguador de pH en las horas de la reacción.

X. RECOMENDACIONES

1. Estudiar las potenciales modificaciones que se pueden realizar al genoma del microorganismo *Bacillus cereus* para reducir la generación de ácidos orgánicos y potenciar una mayor productividad de generación de PHA.
2. Realizar un estudio de tamaños de cadena con técnicas de cromatografía por permeación en gel para cada una de las condiciones reportadas de fermentación y un estudio de la estructura química por cristalografía y composición elemental de los compuestos obtenidos, de manera que se pueda verificar la influencia que las condiciones tienen sobre las características químicas del compuesto y así poder inferir sus propiedades macroscópicas y mecánicas.
3. Determinar la biodegradabilidad y compostabilidad de los polímeros producidos, utilizando análisis estandarizados para categorizar y asegurar una aplicación adecuada de los mismos.
4. Emplear una base fuerte como el hidróxido de sodio para regular el pH de la fermentación, en lugar de un buffer de ácido acético o de fosfatos, con el fin de mejorar la rentabilidad del proceso en un potencial escalamiento.
5. Realizar un estudio de la adaptación de la cepa utilizada con diferentes medios de cultivo, de forma que se pueda reducir la fase lag por haberse comprobado la baja productividad de PHA en dicha fase y se puedan definir las condiciones necesarias de propagación.

6. Evaluar a detalle el proceso de purificación de PHA utilizando técnicas de lisis celular, disolución y precipitación de polímeros para maximizar el rendimiento de dicho polímero.
7. Evaluar las condiciones de reacción de temperatura y oxígeno disuelto para las condiciones con mayores rendimientos reportados, con el fin de determinar su influencia.
8. Utilizar técnicas de análisis de metabolitos presentes durante la fermentación, para cuantificarlos con el tiempo y contar con la información necesaria para mejorar el modelo cinético.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Meesters K. (1998). Production of poly-3-hydroxyalkanoates from waste streams. Design Report, Delft University of Technology.
- [2] Choi, J., & Lee, S. (1997). Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*, 17(6), 335. doi: 10.1007/s004490050394
- [3] Mohandas, S., Balan, L., Jayanath, G., Anoop, B., Philip, R., Cubelio, S., & Bright Singh, I. (2018). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus cereus* MCCB 281 utilizing glycerol as carbon source. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 119, 380-392. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.044
- [4] Koller, M., Salerno, A., & Braunegg, G. (2014). Polyhydroxyalkanoates: Basics, Production and Applications of Microbial Biopolyesters. *Bio-based Plastics: Materials and Applications*, 137-170. doi: 10.1002/9781118676646.ch7
- [5] Santimano, M.C., Prabhu, N.N., Garg, S., 2009. PHA production using low-cost agro-industrial wastes by *Bacillus* sp. strain COL1/A6. *Res. J. Microbiol.* 4, 89–96. <http://dx.doi.org/10.3923/jm.2009.89.96>.
- [6] 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>
- [7] 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>
- [8] Calderón, L. (2021). Evaluación de tres cepas para producir polihidroxialcanoatos a escala laboratorio utilizando diferentes productos de la Industria Azucarera. Tesis Lic. Ing. Guatemala, Univ. Del Valle de Guatemala, Fac. Ing. 91 p.
- [9] Santhanam, A. y Sreenivasan, S. (2010) Microbial production of polyhydroxy alkanotes (PHA) from *Alcaligenes* spp. and *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources. *African Journal of Biotechnology*, 9(21), pp. 3144-3150.

- [10] Duarte, B. (2021). Evaluación de tres cepas para producir polihidroxialcanoatos a escala laboratorio utilizando melaza. Tesis Lic. Ing. Guatemala, Univ. Del Valle de Guatemala, Fac. Ing. 144 p.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Supono, J., Prayitno, S., & Darmanto, Y. (2013). The effect of different C:N and C:P ratio of media on the content of Polyhydroxybutyrate in biofloc inoculase with Bacterium *Bacillus cereus*. *Coastal Development*, 16(2), 114-120.
- [14] Van Wegen, R.J., Ling, Y., y Middleberg, A.P.J. (1998). Industrial production of polyhydroxyalkanoates using *Escherichia Coli*: an economic analysis. *Trans IchemE*, 16(1), 417-426.
- [15] Ling, Y., Wong, H., Thomas, C., Williams, D., & Middelberg, A. (1997). Pilot-scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. *Bioseparation*, 7(1), 9-15. doi: 10.1023/a:1007900416356
- [16] Berger, E., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A. (1989).. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol Tech* 3, 227–232 <https://doi.org/10.1007/BF01876053>
- [17] Jacquel, N., Lo, C., Wei, Y., Wu, H., & Wang, S. (2008). Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 15-27. doi: 10.1016/j.bej.2007.11.029
- [18] Z. U. Salmiati, M. R. Salim, and G. Olsson. (2009). Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from mixed microbial cultures by simple digestion and saponification, in *Proceedings of the 3rd International Water Association (IWA)-ASPIRE, Conference and Exhibition*, Taipei, Taiwan pp. 8–15.
- [19] Chakravarty, P., Mhaisalkar, V., & Chakrabarti, T. (2010). Study on polyhydroxyalkanoate (PHA) production in pilot scale continuous mode wastewater

treatment system. *Bioresource Technology*, 101(8), 2896-2899. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.097

- [20] Mahmoudi, M., Sharifzadeh, M., Najafpour, G., Tabandeh, F., & Eisazadeh, H. (2010). Kinetic model for polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Hydrogenophaga pseudoflava* and verification of growth conditions. *African Journal Of Biotechnology*, 9(21), 3151-3157.
- [21] Wade, L., & Simek, J. (2017). *Organic Chemistry* (7th ed.). Harlow: Pearson Education Ltd.
- [22] Shrivastava, A. (2018). Polymerization. *Introduction To Plastics Engineering*, 17-48. doi: 10.1016/b978-0-323-39500-7.00002-2
- [23] Song, J., Murphy, R., Narayan, R., & Davies, G. (2009). Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2127-2139. doi: 10.1098/rstb.2008.0289
- [24] Tokiwa, Y., Calabia, B., Ugwu, C., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal Of Molecular Sciences*, 10(9), 3722-3742. doi: 10.3390/ijms10093722
- [25] Karlsson, S., & Albertsson, A.C. (1998). Biodegradable Polymers and Environmental Interaction. *Polymer Engineering and Science*, 38(8), 1251-1253.
- [26] Núñez L., Zambrano G. & Rossi C. 2019. Plásticos Bidegradables: terminología y normativa como referencia en el ámbito científico y legislativo. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*. Revista No.38. Guatemala. Pp 13-21
- [27] Deb, P., Kokaz, S., Abed, S., Paradkar, A., & Tekade, R. (2019). Pharmaceutical and Biomedical Applications of Polymers. *Basic Fundamentals Of Drug Delivery*, 203-267. doi: 10.1016/b978-0-12-817909-3.00006-6
- [28] Reddy, M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S., & Mohanty, A. (2013). Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress In Polymer Science*, 38(10-11), 1653-1689. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006

- [29] Manvi, P., Beckers, M., Mohr, B., Seide, G., Gries, T., & Bunge, C. (2019). Polymer fiber-based biocomposites for medical sensing applications. *Materials For Biomedical Engineering*, 57-88. doi: 10.1016/b978-0-12-816872-1.00003-0
- [30] Rodríguez-Sepúlveda, L., & Orrego-Alzate, C. (2016). Aplicaciones de mezclas de biopolímeros y polímeros sintéticos: Revisión bibliográfica - Applications of blends of biopolymers and synthetic polymers: Bibliographic review. *Revista Científica*, 2(25), 252. doi: 10.14483//udistrital.jour.rc.2016.25.a9
- [31] Valero-Valdivieso, M., Ortegón, Y., & Uscategui, Y. (2013). Biopolímeros: avances y perspectivas. *Dyna*, 80(181), 171-180. Retrieved September 08, 2020, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532013000500019&lng=en&tlng=es.
- [32] Lee, James. 2009. *Biochemical Engineering*. Estados Unidos: Washington State University. 945 pp.
- [33] Levenspiel, Octave. 1999. *Chemical Reaction Engineering*. 3ª ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons. 665 pp.
- [34] Treybal, Robert; García y Lozano. 2007. *Operaciones de Transferencia de Masa*. 2ª ed. México: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA DE MÉXICO. 822 pp.
- [35] Tebanni, S., Lopes, F., Filali, R., Dumur, D., & Pareau, D. (2014). CO2 Biofixation by Microalgae. Nueva Jersey: Wiley. p14.
- [36] Shuler, Michael & Kargi, Fikret. 2002. *Bioprocess Engineering*. Estados Unidos. Editorial Printice Hall. 553 pp.
- [37] Alcaraz, L., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L., Souza, V., Herrera-Estrella, L., & Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, 11(1). doi: 10.1186/1471-2164-11-332
- [38] Valappil, S., Rai, R., Bucke, C., & Roy, I. (2008). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *Journal Of Applied Microbiology*, 104(6), 1624-1635. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03678.x

- [39] Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(1), 5-21. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00218-6
- [40] Sasikala, C., & Ramana, C. V. (1996). Biodegradable Polyesters. *Advances in Applied Microbiology*, 97–218. doi:10.1016/s0065-2164(08)70373-3
- [41] Singh, M., Patel, S. and Kalia, V., 2009. Bacillus subtilis as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories*, 8(1), p.38.
- [42] Swan, H., & Karalazos, A. (1990). Las melazas y sus derivados. *Revista Tecnología Geplacea*, 19(1), 78-82.
- [43] Shasaltaneh, M. D., Moosavi-Nejad, Z., Gharavi, S., & Fooladi, J. (2013). Cane molasses as a source of precursors in the bioproduction of tryptophan by Bacillus subtilis. *Iranian journal of microbiology*, 5(3), 285–292.
- [44] Albuquerque, M., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B., & Reis, M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal Of Biotechnology*, 130(4), 411-421. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.011
- [45] Akaraonye, E., Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(6), 732-743. doi: 10.1002/jctb.2392
- [46] Granum, P., Stenfors Arnesen, L., & From, C. (2014). Bacteria: Bacillus cereus and Other Pathogenic Bacillus Species. *Encyclopedia Of Food Safety*, 356-363. doi: 10.1016/b978-0-12-378612-8.00087-1

XII. ANEXOS

A. DATOS ORIGINALES

1. Datos cuantificados para la corrida 1

Cuadro 14. Formulación utilizada para la inversión de azúcares de la corrida experimental 1

Compuesto	Cantidad	Unidad
Volumen ácido sulfúrico	32	±0.05 mL
Masa de hidróxido de sodio	47.6	±0.1 g
Masa de melaza	300	±0.1 g
Volumen de agua	1200	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 15. Identificación de muestra tomadas con el tiempo

Identificación de muestra	Tiempo (h)	Identificación de muestra	Tiempo (h)
A1A001	0.00	A1A013	24.22
A1A002	1.00	B1B014	26.22
B1B003	2.00	A1A015	28.22
A1A004	3.00	A1A016	30.05
A1A005	4.00	B1B017	32.23
B1B006	5.22	A1A018	45.23
A1A007	5.97	A1A019	47.23
A1A008	6.97	B1B020	50.23
B1B009	7.97	A1A021	53.23
A1A010	8.97	A1A022	56.23
B1B011	20.22	B1B023	68.23
A1A012	22.22	A1A024	71.23

En donde los primeros dos símbolos (A1) indica el número de corrida y los últimos tres (A001) se refiere al correlativo de muestra

Cuadro 16. Preparación del medio de cultivo para la fermentación de la corrida experimental 1

Compuesto	Cantidad	Unidad
Cloruro de amonio	0.3276	±0.0001g
Bicarbonato de Sodio	0.1639	±0.0001g
Fosfato monopotásico	0.6599	±0.0001g
Fosfato de disódio	0.6776	±0.0001g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.1641	±0.0001g
Cloruro de calcio dihidratado	0.0041	±0.0001g
Citrato de amonio férrico.	0.01802	±0.0001g
Sulfato de Zinc heptahidratado	0.0036	±0.0001g
Cloruro de Manganeso tetrahidratado	0.0011	±0.0001g
Ácido bórico	0.132	±0.0001g
Molibdato de sodio dihidratado	0.0016	±0.0001g
Volumen de sales	500	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 17. Datos obtenidos para la cuantificación de glucosa, sacarosa y fructosa presente en la mezcla reactiva a diferentes tiempos de la corrida experimental 1

Identificación de muestra	Glucosa (± 0.003 % (m/v))	Sacarosa (± 0.0064 % (m/v))	Fructosa (± 0.002 % (m/v))
A1A001	0.141	0.018	0.238
A1A002	0.143	0.017	0.231
B1B003	0.149	0.019	0.237
A1A004	0.144	0.017	0.233
A1A005	0.139	0.018	0.227
B1B006	0.143	0.018	0.207
A1A007	0.151	0.017	0.238
A1A008	0.15	0.019	0.237
B1B009	0.142	0.016	0.236
A1A010	0.148	0.019	0.237
B1B011	0.139	0.017	0.222
A1A012	0.125	0.016	0.181
A1A013	0.104	0.015	0.176
B1B014	0.112	0.014	0.192
A1A015	0.105	0.014	0.186
A1A016	0.103	0.013	0.178
B1B017	0.104	0.012	0.181
A1A018	0.107	0.011	0.191
A1A019	0.108	0.012	0.185
B1B020	0.117	0.011	0.192
A1A021	0.107	0.012	0.187
A1A022	0.107	0.013	0.191
B1B023	0.12	0.012	0.191
A1A024	0.1	0.012	0.19

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un Cromatógrafo líquido con columna Hi-plex y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 3.58%.

Cuadro 18. Mediciones de pH en la mezcla reactiva a diferentes tiempos de la corrida experimental 1

Identificación de muestra	pH (± 0.01)
A1A001	5.38
A1A002	5.35
B1B003	5.28
A1A004	5.24
A1A005	5.08
B1B006	5.24
A1A007	5.12
A1A008	5.03
B1B009	5.06
A1A010	4.92
B1B011	4.72
A1A012	4.66
A1A013	4.45
B1B014	4.70
A1A015	4.41
A1A016	4.24
B1B017	4.16
A1A018	3.68
A1A019	3.70
B1B020	3.56
A1A021	3.52
A1A022	3.48
B1B023	3.32
A1A024	3.35

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300. Datos con un error de variabilidad método de 6.56%.

Cuadro 19. Masas obtenidas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 1

Identificación de muestra	Masa Beaker (± 0.0001 g)	Masa Beaker con muestra (± 0.0001 g)	Masa de microorganismos (± 0.0001 g)
B1B003	60.4759	60.4847	0.0088
B1B006	51.5673	51.5765	0.0092
B1B009	30.9620	30.9737	0.0117
B1B011	54.2402	54.2533	0.0131
B1B014	49.4820	49.4978	0.0158
B1B017	60.3936	60.4135	0.0199
B1B020	49.6258	49.6461	0.0203
B1B023	53.3006	53.3211	0.0205

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114. Datos con un error de variabilidad método de 15.02%.

Cuadro 20. Masas obtenidas para la cuantificación de PHA luego de purificarlo y secarlo para la corrida experimental 1

Identificación de muestra	Masa de Beaker (± 0.0001 g)	Masa de Beaker con PHA (± 0.0001 g)	Masa de PHA (± 0.0001 g)
B1B003	12.8245	12.8256	0.0011
B1B006	11.9583	11.9595	0.0012
B1B009	13.0459	13.0474	0.0015
B1B011	11.0637	11.0679	0.0042
B1B014	12.7111	12.7189	0.0078
B1B017	11.9352	11.9445	0.0093
B1B020	12.7598	12.7695	0.0097
B1B023	12.7405	12.7506	0.0101

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114. Datos con un error de variabilidad método de 13.50%.

Cuadro 21. Concentraciones de azúcares fermentables obtenidos en la corrida experimental 1 con cromatografía líquida

ID	Glucosa (± 0.003 % (m/v))	Sacarosa (± 0.0064 % (m/v))	Fructosa (± 0.002 % (m/v))
C1C001	0	0	0.07
C1C002	0.016	0	0.073
C1C003	0.017	0	0.065

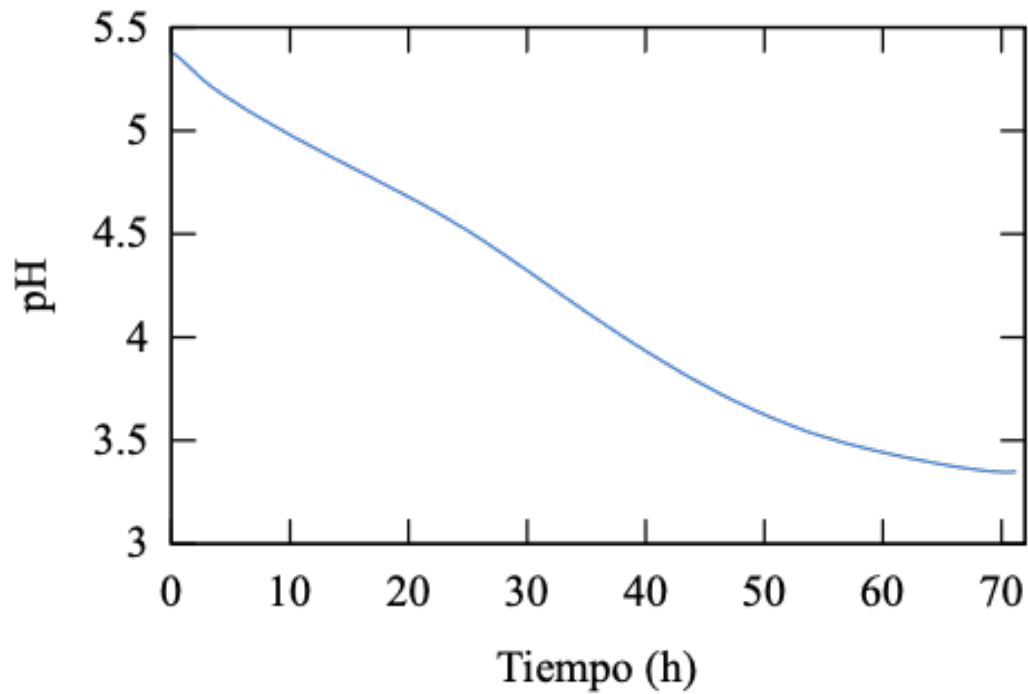
Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un Cromatógrafo líquido con columna Hi-plex y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 3.58%.

Cuadro 22. Datos calculados para la cuantificación de pH en la mezcla reactiva a diferentes tiempos de la corrida experimental 1

Identificación de muestra	pH (± 0.01)
C1C001	3.29
C1C002	3.40
C1C003	3.43

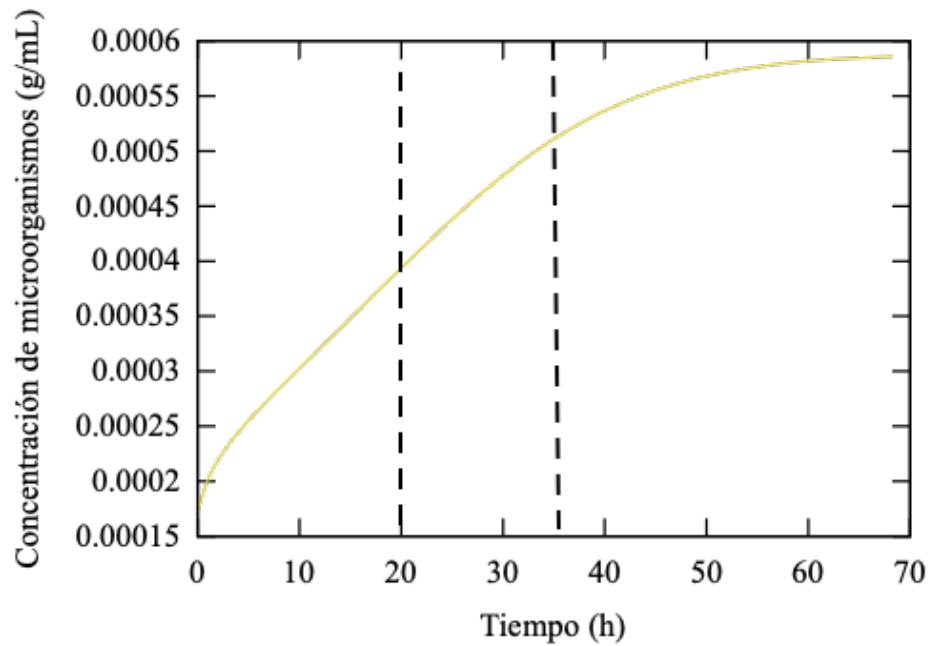
Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300. Datos con un error de variabilidad método de 6.56%.

Figura 28. Comportamiento del pH para la corrida 1 con el tiempo



Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300

Figura 29. Identificación de las fases de crecimiento celular para la corrida 1



Fases identificadas de acuerdo a la Figura 2 y a la teoría mostrada en el marco teórico.

2. Datos cuantificados para la corrida 2

Cuadro 23. Formulación utilizada para la inversión de azúcares de la corrida experimental 2

Compuesto	Cantidad	Unidad
Volumen ácido sulfúrico	19	±0.05 mL
Masa de hidróxido de sodio	29.4	±0.1 g
Masa de melaza	300	±0.1 g
Volumen de agua	1200	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 24. Composición del Buffer empleado en la preparación del medio de cultivo de la corrida experimental 2

Compuesto	Cantidad	Unidad
Volumen de ácido acético	50	±0.0001g
Masa de acetato de sodio	97.6329	±0.0001g
Volumen de agua	500	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 25. Cantidades empleadas en la preparación del medio de cultivo para la fermentación de la corrida experimental 2

Compuesto	Cantidad	Unidad
Cloruro de amonio	2.5001	±0.0001g
Bicarbonato de Sodio	1.2499	±0.0001g
Fosfato monopotásico	5.0034	±0.0001g
Fosfato de disódio	3.9902	±0.0001g
Sulfato de magnesio heptahidratado	1.2500	±0.0001g
Cloruro de calcio dihidratado	0.0249	±0.0001g
Citrato de amonio férrico.	0.1256	±0.0001g
Sulfato de zinc heptahidratado	0.2032	±0.0001g
Cloruro de manganeso tetrahidratado	0.0753	±0.0001g
Ácido bórico	0.7507	±0.0001g
Molibdato de sodio dihidratado	0.0553	±0.0001g
Volumen de sales	2500	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 26. Identificación de muestras para la corrida 2 tomadas con el tiempo

Identificación de muestra	Tiempo (h)	Identificación de muestra	Tiempo (h)	Identificación de muestra	Tiempo (h)
A2A001	0.00	B2B011	22.50	A2A021	64.64
A2A002	1.00	A2A012	24.50	A2A022	68.80
B2B003	2.00	A2A013	26.50	B2B023	70.54
A2A004	3.25	B2B014	28.50	A2A024	73.75
A2A005	4.00	A2A015	37.50	A2A025	83.75
B2B006	5.00	A2A016	40.50	A2A026	84.85
A2A007	15.42	B2B017	43.50	B2B027	85.69
A2A008	16.60	A2A018	46.50	A2A028	87.02
B2B009	18.50	A2A019	48.90	A2A029	88.02
A2A010	20.50	B2B020	61.54		

En donde los primeros dos símbolos (A2) indica el número de corrida y los últimos tres (A001) se refiere al correlativo de muestra.

Cuadro 27. Datos obtenidos para la cuantificación de glucosa, sacarosa y fructosa presente en la mezcla reactiva a diferentes tiempos de la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Glucosa ($\pm 0.002\%$ (m/v))	Sacarosa ($\pm 0.002\%$ (m/v))	Fructosa ($\pm 0.004\%$ (m/v))
A2A001	0.194	0.102	0.225
A2A002	0.192	0.101	0.229
B2B003	0.194	0.102	0.176
A2A004	0.187	0.101	0.156
A2A005	0.19	0.1	0.231
B2B006	0.186	0.104	0.174
A2A007	0.193	0.109	0.175
A2A008	0.186	0.107	0.178
B2B009	0.185	0.108	0.171
A2A010	0.178	0.109	0.192
B2B011	0.177	0.11	0.169
A2A012	0.163	0.107	0.187
A2A013	0.158	0.109	0.183
B2B014	0.153	0.107	0.17
A2A015	0.142	0.078	0.166
A2A016	0.13	0.059	0.154
B2B017	0.116	0.059	0.157
A2A018	0.128	0.058	0.154
A2A019	0.125	0.062	0.151
B2B020	0.105	0.059	0.128
A2A021	0.11	0.055	0.137
A2A022	0.1	0.05	0.126
A2A023	0.091	0.056	0.128
A2A024	0.104	0.056	0.158

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un Cromatógrafo líquido con columna Hi-plex y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 13.98%.

Cuadro 28. Continuación de datos obtenidos para la cuantificación de glucosa, sacarosa y fructosa presente en la mezcla reactiva a diferentes tiempos de la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Glucosa ($\pm 0.002\%$ (m/v))	Sacarosa ($\pm 0.002\%$ (m/v))	Fructosa ($\pm 0.004\%$ (m/v))
A2A025	0.091	0.048	0.119
A2A026	0.085	0.055	0.114
A2A027	0.084	0.062	0.118
A2A028	0.083	0.056	0.117
A2A029	0.085	0.055	0.116

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un Cromatógrafo líquido con columna Hi-plex y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 13.98%.

Cuadro 29. Medición de pH a diferentes tiempos para la corrida experimental 2

Identificación de muestra	pH (± 0.01)
A2A001	6.71
A2A002	6.71
B2B003	6.73
A2A004	6.69
A2A005	6.69
B2B006	6.70
A2A007	6.65
A2A008	6.63
B2B009	6.65
A2A010	6.34
B2B011	6.31
A2A012	5.99
A2A013	5.88
B2B014	5.76
A2A015	5.28

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300. Datos con un error de variabilidad método de 1.59%.

Cuadro 30. Continuación de medición de pH a diferentes tiempos para la corrida experimental 2

Identificación de muestra	pH (± 0.01)
A2A016	5.24
B2B017	5.18
A2A018	5.14
A2A019	5.14
B2B020	4.97
A2A021	4.93
A2A022	4.91
A2A023	4.91
A2A024	4.91
A2A025	4.86
A2A026	4.86
A2A027	4.87
A2A028	4.87
A2A029	4.86

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300. Datos con un error de variabilidad método de 1.59%.

Cuadro 31. Masas obtenidas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Masa Beaker (± 0.0001 g)	Masa Beaker con muestra (± 0.0001 g)	Masa de Microorganismos (± 0.0001 g)
B2B003	18.8788	19.1278	0.2490
B2B006	32.3564	32.6074	0.2510
B2B009	30.8132	31.0912	0.2780
B2B011	32.2059	32.4929	0.2870
B2B014	29.2667	29.6357	0.3690
B2B017	30.5686	31.0706	0.5020
B2B020	30.2476	30.7755	0.5279
B2B023	29.2996	29.8338	0.5342
B2B027	31.4239	31.9629	0.5390

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114. Datos con un error de variabilidad método de 14.80%.

Cuadro 32. Masas obtenidas para la cuantificación de PHA luego de purificarlo y secarlo y para la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Masa de Beaker (± 0.0001 g)	Masa de Beaker con PHA (± 0.0001 g)	Masa de PHA (± 0.0001 g)
B2B003	18.8788	19.0908	0.2120
B2B006	32.3564	32.5634	0.2070
B2B009	30.8132	31.0602	0.2470
B2B011	32.2059	32.4309	0.2250
B2B014	29.2667	29.5567	0.2900
B2B017	30.5686	31.0186	0.4500
B2B020	30.2476	30.7336	0.4860
B2B023	29.2996	29.8158	0.5162
B2B027	31.4239	31.9489	0.5250

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114. Datos con un error de variabilidad método de 14.94%.

Cuadro 33. Datos obtenidos para la cuantificación de subproducto de la fermentación de azúcares invertidas a diferentes tiempos de la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Ácido acético (± 0.001 % (m/v))
A2A001	0.64
A2A002	0.654
B2B003	0.683
A2A004	0.623
A2A005	0.618
B2B006	1.066
A2A007	1.168
A2A008	1.082
B2B009	1.03
A2A010	1.102
B2B011	1.129
A2A012	1.174

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un Cromatógrafo líquido con columna Hi-plex y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 13.98%.

Cuadro 34. Continuación de datos obtenidos para la cuantificación de subproducto de la fermentación de azúcares invertidas a diferentes tiempos de la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Ácido acético (± 0.001 % (m/v))
A2A013	1.12
B2B014	1.096
A2A015	1.157
A2A016	1.087
B2B017	1.134
A2A018	1.112
A2A019	1.115
B2B020	1.02
A2A021	1.146
A2A022	1.025
A2A023	1.192
A2A024	1.048
A2A025	1.067
A2A026	1.196
A2A027	1.129
A2A028	1.11
A2A029	1.054

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un Cromatógrafo líquido con columna Hi-plex y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 13.98%.

Cuadro 35. Datos obtenidos para la cuantificación de glucosa, sacarosa y fructosa presente en la mezcla reactiva a diferentes tiempos de la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Glucosa (± 0.002 %(m/v))	Sacarosa (± 0.002 %(m/v))	Fructosa (± 0.004 %(m/v))
C2C001	0	0.013	0.076
C2C002	0	0.014	0.075
C2C003	0	0.013	0.069

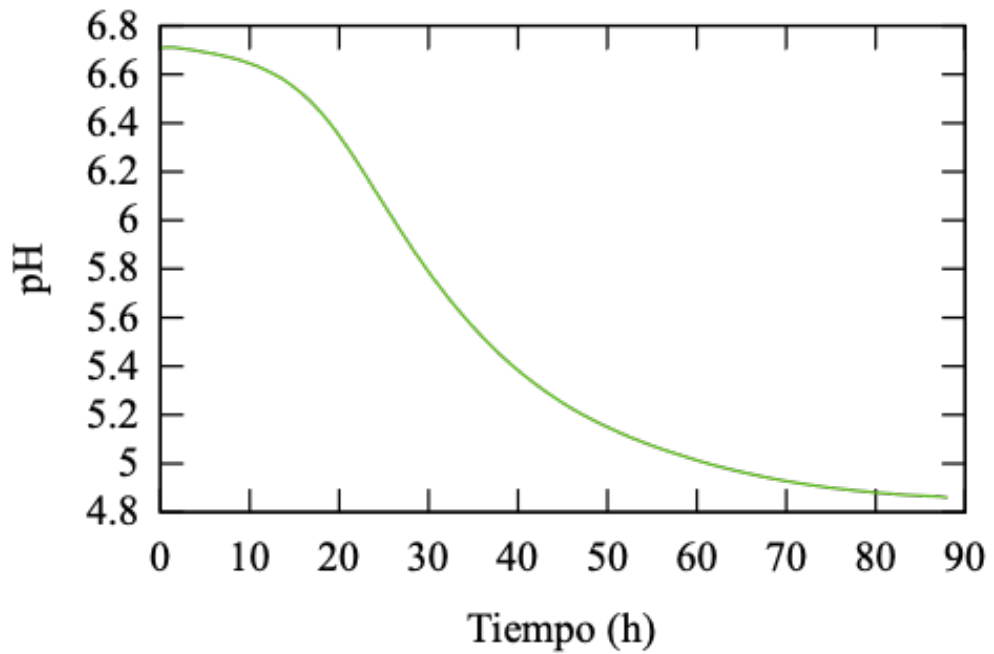
Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un Cromatógrafo líquido con columna Hi-plex y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 13.98%.

Cuadro 36. Medición de pH a diferentes tiempos para la corrida experimental 2

Identificación de muestra	pH (± 0.01)
C2C001	4.76
C2C002	4.78
C2C003	4.73

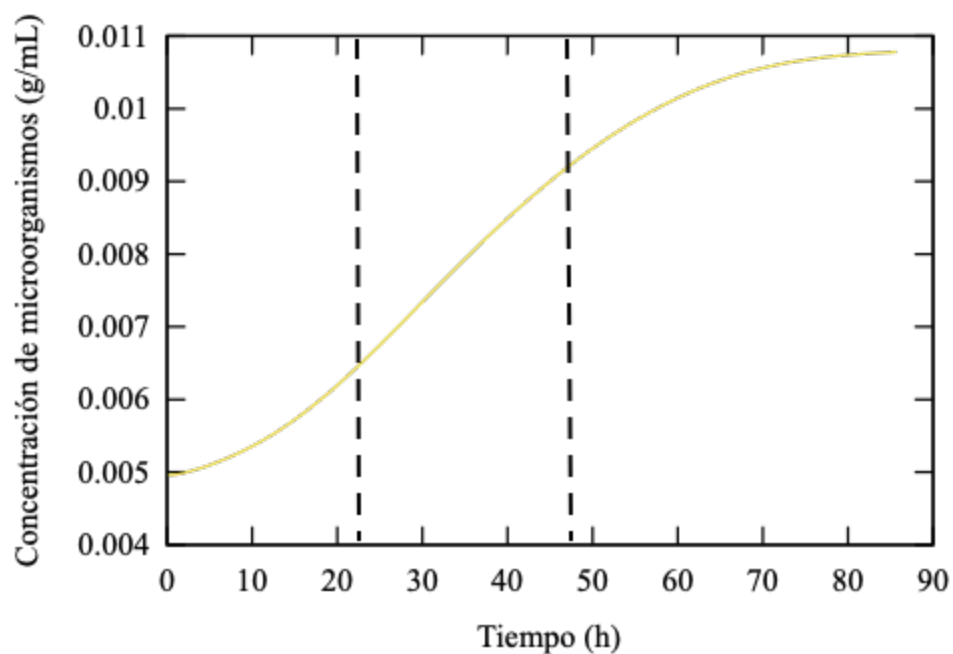
Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300. Datos con un error de variabilidad método de 1.59%.

Figura 30. Comportamiento del pH para corrida 2 con el tiempo



Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300

Figura 31. Identificación de las fases de crecimiento celular para la corrida 2



Fases identificadas de acuerdo a la Figura 2 y a la teoría mostrada en el marco teórico.

3. Datos cuantificados para la corrida 3

Cuadro 37. Formulación utilizada para la inversión de azúcares de la corrida experimental 3

Compuesto	Cantidad	Unidad
Volumen ácido sulfúrico	12	±0.05 mL
Masa de hidróxido de sodio	17.7897	±0.0001 g
Masa de melaza	300	±0.1 g
Volumen de agua	1210	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 38. Cantidades de reactivos empleados en la preparación del buffer para la fermentación de la corrida experimental 3

Compuesto	Cantidad	Unidad
Masa de fosfato monopotásico	4.1720	±0.0001g
Masa de fosfato de disódio	2.7460	±0.0001g
Volumen de agua	500	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 39. Cantidades de reactivos empleados en la preparación del medio de cultivo para la fermentación de la corrida experimental 3

Compuesto	Cantidad	Unidad
Cloruro de amonio	5.0109	±0.0001g
Bicarbonato de Sodio	2.4998	±0.0001g
Fosfato monopotásico	10.0035	±0.0001g
Fosfato de disódio	7.9762	±0.0001g
Sulfato de magnesio heptahidratado	2.5015	±0.0001g
Cloruro de calcio dihidratado	0.0512	±0.0001g
Citrato de amonio férrico.	0.2497	±0.0001g
Sulfato de Zinc heptahidratado	0.4062	±0.0001g
Cloruro de Manganeso tetrahidratado	0.5016	±0.0001g
Ácido bórico	1.4994	±0.0001g
Molibdato de sodio dihidratado	0.1102	±0.0001g
Volumen de sales	5000	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 40. Identificación de muestras para la corrida 3 tomadas con el tiempo

Identificación de muestra	Tiempo (h)	Identificación de muestra	Tiempo (h)
A3A001	0.00	A3A015	43.92
A3A002	1.00	B3B016	45.92
B3B003	2.00	A3A017	47.92
A3A004	3.00	A3A018	49.92
A3A005	5.50	B3B019	51.92
B3B006	6.75	A3A020	65.42
A3A007	17.92	A3A021	68.42
A3A008	22.92	B3B022	71.42
B3B009	23.67	A3A023	73.42
B3B010	24.92	A3A024	75.42
A3A011	25.92	B3B025	77.42
B3B012	26.92	A3A026	88.92
B3B013	27.92	A3A027	91.92
A3A014	41.67	B3B028	94.92

En donde los primeros dos símbolos (A3) indica el número de corrida y los últimos tres (A001) se refiere al correlativo de muestra.

Cuadro 41. Concentraciones obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables con cromatografía líquida para la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Glucosa (± 0.003 %(m/v))	Sacarosa (± 0.003 %(m/v))	Fructosa (± 0.003 %(m/v))
A3A001	0.104	0.089	0.101
A3A002	0.085	0.092	0.125
B3B003	0.124	0.092	0.23
A3A004	0.107	0.089	0.256
A3A005	0.107	0.103	0.256
B3B006	0.125	0.091	0.215
A3A007	0.119	0.069	0.017
A3A008	0.039	0.014	0
B3B009	0.016	0.025	0
B3B010	0	0.026	0
A3A011	0	0.024	0
B3B012	0	0.024	0
B3B013	0	0.025	0
A3A014	0.035	0.026	0
A3A015	0.026	0.026	0
B3B016	0	0.031	0
A3A017	0.035	0.037	0.026
A3A018	0.037	0.029	0
B3B019	0	0.026	0.009
A3A020	0	0.008	0
A3A021	0	0.011	0
B3B022	0.029	0.029	0
A3A023	0	0	0
A3A024	0.026	0.017	0
B3B025	0	0.008	0
A3A026	0	0.008	0
A3A027	0	0.008	0
B3B028	0	0.027	0

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando una columna Hi-plex H y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 3.35%.

Cuadro 42. Medición de pH a diferentes tiempos para la corrida experimental 3

Identificación de muestra	pH (± 0.01)
B3B003	5.99
B3B006	5.9
B3B010	6.03
B3B013	6.62
B3B016	6.77
B3B019	6.75
B3B022	6.77
B3B025	6.84
B3B028	6.98

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300. Datos con un error de variabilidad método de 0.43%.

Cuadro 43. Masas obtenidas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Masa Beaker (± 0.0001 g)	Masa Beaker con muestra (± 0.0001 g)	Masa de Microorganismos (± 0.0001 g)
B3B003	18.8788	19.4139	0.5351
B3B006	32.3564	32.8924	0.5360
B3B010	30.8132	31.3892	0.5760
B3B013	32.1986	32.7961	0.5975
B3B016	29.2667	29.9385	0.6718
B3B019	30.566	31.2556	0.6896
B3B022	30.2476	30.9363	0.6887
B3B025	29.2996	29.9980	0.6984
B3B028	31.4239	32.1468	0.7229

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114. Datos con un error de variabilidad método de 6.75%.

Cuadro 44. Masas obtenidas para la cuantificación de PHA luego de purificarlo y secarlo para la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Masa de Beaker (± 0.0001 g)	Masa de Beaker con PHA (± 0.0001 g)	Masa de PHA (± 0.0001 g)
B3B003	18.8788	19.2534	0.3746
B3B006	32.3564	32.7258	0.3694
B3B010	30.8132	31.2008	0.3876
B3B013	32.1986	32.6648	0.4662
B3B016	29.2667	29.7739	0.5072
B3B019	30.5660	31.1354	0.5694
B3B022	30.2476	30.8448	0.5972
B3B025	29.2996	29.892768	0.5932
B3B028	31.4239	32.0297	0.6058

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114. Datos con un error de variabilidad método de 12.5%.

Cuadro 45. Concentraciones obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables con cromatografía líquida para la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Glucosa (± 0.003 % (m/v))	Sacarosa (± 0.003 % (m/v))	Fructosa (± 0.003 % (m/v))
C3C001	0	0.009	0
C3C002	0	0.011	0
C3C003	0	0.01	0

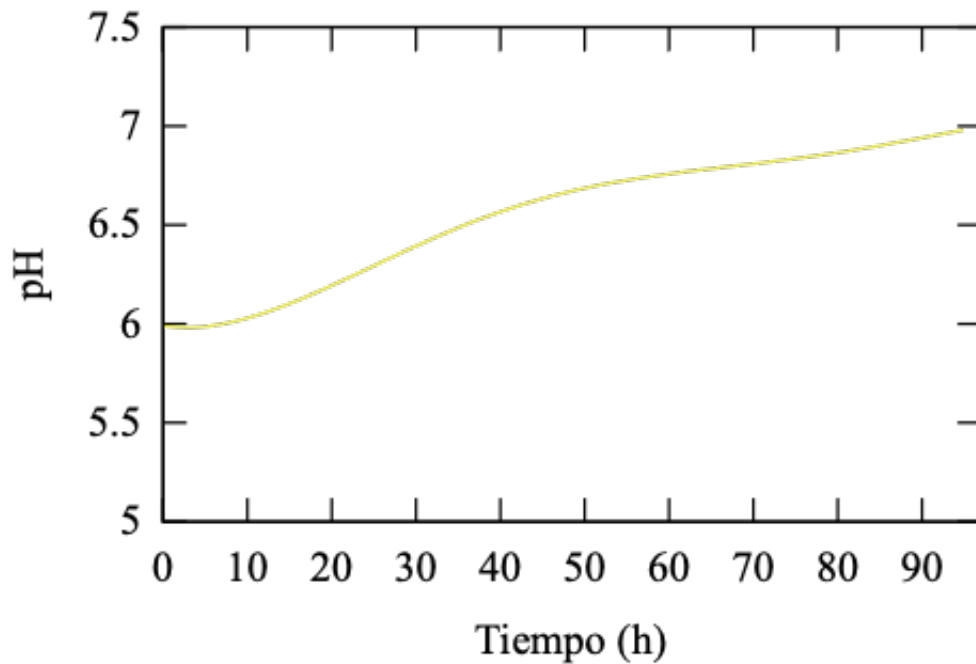
Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando una columna Hi-plex H y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 3.35%.

Cuadro 46. Medición de pH a diferentes tiempos para triplicado de corrida experimental 3

Identificación de muestra	pH (± 0.01)
C3C001	6.96
C3C002	6.97
C3C003	6.98

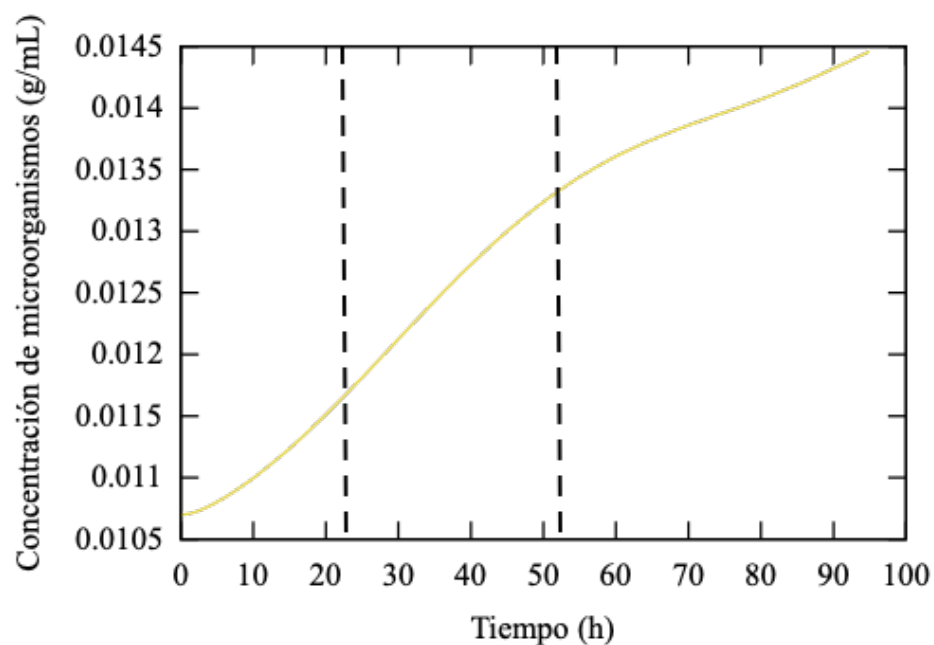
Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300. Datos con un error de variabilidad método de 0.43%.

Figura 32. Comportamiento de pH para corrida 3 con el tiempo



Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300

Figura 33. Identificación de las fases de crecimiento celular para la corrida 3



Fases identificadas de acuerdo a la Figura 2 y a la teórica mostrada en el marco teórico.

4. Datos cuantificados para la corrida 4

Cuadro 47. Formulación utilizada para la inversión de azúcares de la corrida experimental 4

Compuesto	Cantidad	Unidad
Volumen ácido sulfúrico	19	±0.05 mL
Masa de hidróxido de sodio	27.9766	±0.0001 g
Masa de melaza	300	±0.1 g
Volumen de agua	1000	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 48. Cantidad empleada de hidróxido de sodio en la preparación de solución de hidróxido de sodio 0.88 M para la fermentación de la corrida experimental 4

Compuesto	Cantidad	Unidad
Masa de hidróxido de sodio	38.751	±0.0001 g
Volumen de agua	1100	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 49. Cantidades de reactivos empleados en la preparación del medio de cultivo para la fermentación de la corrida experimental 4

Compuesto	Cantidad	Unidad
Cloruro de amonio	14.5046	±0.0001g
Bicarbonato de Sodio	5.001	±0.0001g
Fosfato monopotásico	19.9997	±0.0001g
Fosfato de disódio	15.9559	±0.0001g
Sulfato de magnesio heptahidratado	5.0002	±0.0001g
Cloruro de calcio dihidratado	0.1024	±0.0001g
Citrato de amonio férrico.	0.5053	±0.0001g
Sulfato de Zinc heptahidratado	0.1084	±0.0001g
Cloruro de Manganeso tetrahidratado	0.0553	±0.0001g
Ácido bórico	0.4026	±0.0001g
Molibdato de sodio dihidratado	0.21927	±0.0001g
Volumen de sales	10000	±5mL

Las masas y volúmenes mostrados se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando balanza analítica OHAUS y los instrumentos volumétricos mostrados en la metodología.

Cuadro 50. Identificación de muestras para la corrida 4 tomadas con el tiempo

Identificación de muestra	Tiempo (h)	Identificación de muestra	Tiempo (h)	Identificación de muestra	Tiempo (h)
A4A001	0	A4A010	22	A4A019	52
A4A002	1	A4A011	24	A4A020	55
B4B003	2	B4B012	26	B4B021	58
A4A004	3	A4A013	28	A4A022	70
A4A005	4	A4A014	30	A4A023	74
B4B006	5	B4B015	32	B4B024	78
A4A007	6	A4A016	34	A4A025	82
A4A008	7	A4A017	46	A4A026	94
B4B009	8	B4B018	49	B4B027	96

En donde los primeros dos símbolos (A4) indica el número de corrida y los últimos tres (A001) se refiere al correlativo de muestra.

Cuadro 51. Concentraciones obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables con cromatografía líquida para la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Glucosa ($\pm 0.001\%$ (m/v))	Sacarosa ($\pm 0.003\%$ (m/v))	Fructosa ($\pm 0.001\%$ (m/v))
A4A001	0.208	0.041	0.109
A4A002	0.161	0	0.032
B4B003	0.196	0.049	0.059
A4A004	0.166	0	0.02
A4A005	0.152	0	0.002
B4B006	0.154	0	0.022
A4A007	0.185	0.013	0.054
A4A008	0.194	0.016	0.028
B4B009	0.168	0	0.008
A4A010	0.136	0	0.104
A4A011	0.036	0	0.009
B4B012	0.028	0	0.009
A4A013	0.027	0	0.067
A4A014	0.037	0	0.039
B4B015	0.039	0	0.025
A4A016	0.038	0	0.011
A4A017	0.028	0	0.019
B4B018	0.028	0	0.018
A4A019	0.028	0	0.013
A4A020	0.031	0	0.01
B4B021	0.029	0	0.018
A4A022	0	0	0.005
A4A023	0	0	0.001
B4B024	0	0.006	0.016
A4A025	0.007	0.006	0.017
A4A026	0	0.007	0.019
B4B027	0.006	0.007	0.006

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando una columna Hi-plex y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 6.92%.

Cuadro 52. Medición de pH a diferentes tiempos para la corrida experimental 4

Identificación de muestra	pH (± 0.01)
A4A001	7.02
A4A002	6.93
B4B003	6.84
A4A004	6.70
A4A005	6.65
B4B006	6.49
A4A007	6.31
A4A008	6.45
B4B009	6.46
A4A010	4.59
A4A011	6.99
B4B012	6.85
A4A013	6.72
A4A014	6.71
B4B015	6.58
A4A016	6.44
A4A017	6.44
B4B018	6.82
A4A019	6.72
A4A020	6.59
B4B021	6.51
A4A022	6.32
A4A023	6.38
B4B024	6.43
A4A025	6.47
A4A026	6.55
B4B027	6.53

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300. Datos con un error de variabilidad método de 0.70%.

Cuadro 53. Medición de pH a diferentes tiempos para triplicado de corrida experimental 4

Identificación de muestra	pH (± 0.01)
C4C001	6.56
C4C002	6.54
C4C003	6.54

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300. Datos con un error de variabilidad método de 0.70%.

Cuadro 54. Masas obtenidas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Masa Beaker (± 0.0001 g)	Masa Beaker con muestra (± 0.0001 g)	Masa de Microorganismos (± 0.0001 g)
B4B003	30.8132	31.1322	0.3190
B4B006	32.1986	32.5646	0.3660
B4B009	29.2996	29.6687	0.3691
B4B012	29.2667	29.7642	0.4975
B4B015	30.566	31.1329	0.5669
B4B018	30.2476	30.8104	0.5628
B4B021	31.3968	31.9731	0.5763
B4B024	32.3564	32.9467	0.5903
B4B027	31.4239	32.0507	0.6268

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114. Datos con un error de variabilidad método de 7.69%.

Cuadro 55. Masas obtenidas para la cuantificación de PHA luego de purificarlo y secarlo para la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Masa de Beaker (± 0.0001 g)	Masa de Beaker con PHA (± 0.0001 g)	Masa de PHA (± 0.0001 g)
B4B003	30.8132	31.1128	0.2996
B4B006	32.1986	32.5478	0.3492
B4B009	29.2996	29.6672	0.3676
B4B012	29.2667	29.7436	0.4769
B4B015	30.5660	31.1206	0.5546
B4B018	30.2476	30.8005	0.5529
B4B021	31.3968	31.9599	0.5631
B4B024	32.3564	32.9336	0.5772
B4B027	31.4239	32.0393	0.6154

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114. Datos con un error de variabilidad método de 7.64%.

Cuadro 56. Datos obtenidos para la cuantificación de subproductos de la fermentación de azúcares invertidas a diferentes tiempos de la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Ácido Láctico ($\pm 0.002\%$ (m/v))	Etanol ($\pm 0.001\%$ (m/v))
A4A001	0.024	0
A4A002	0.033	0.078
B4B003	0	0.033
A4A004	0.029	0.035
A4A005	0.034	0.049
B4B006	0.028	0.039
A4A007	0	0
A4A008	0	0.049
B4B009	0.017	0
A4A010	0.022	0.05
A4A011	0.015	0.052
B4B012	0.02	0
A4A013	0.041	0
A4A014	0.04	0
B4B015	0.047	0
A4A016	0.037	0
A4A017	0.003	0
B4B018	0.041	0
A4A019	0.019	0
A4A020	0.021	0
B4B021	0.02	0
A4A022	0.029	0.101
A4A023	0	0.107
B4B024	0	0.123
A4A025	0	0.128
A4A026	0.03	0.135
B4B027	0	0.132

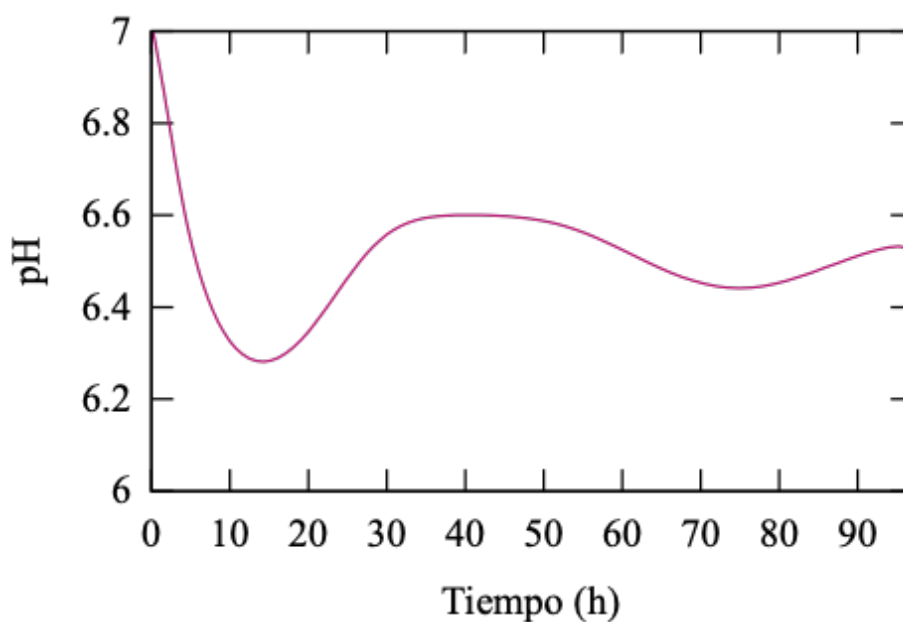
Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando una columna Hi-plex y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 6.92%.

Cuadro 57. Concentraciones obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables con cromatografía líquida para la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Glucosa ($\pm 0.001\%$ (m/v))	Sacarosa ($\pm 0.003\%$ (m/v))	Fructosa ($\pm 0.001\%$ (m/v))
C4C001	0.005	0	0.011
C4C002	0.006	0	0.007
C4C003	0.003	0	0.007

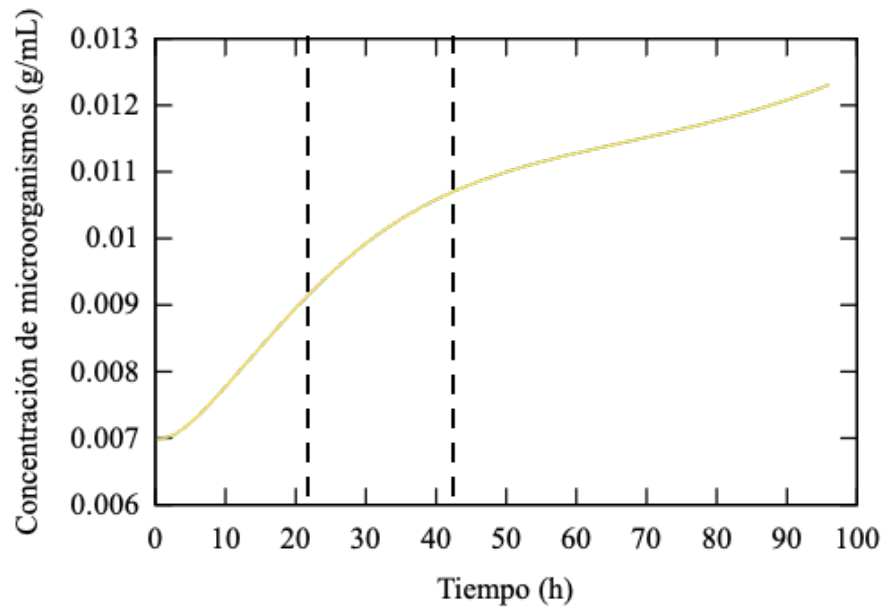
Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando una columna Hi-plex H y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 6.92%.

Figura 34. Comportamiento de pH para corrida 4 con el tiempo



Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un potenciómetro OHAUS con electrodo estándar ST300

Figura 35. Identificación de las fases de crecimiento celular para la corrida 4



Fases identificadas de acuerdo a la Figura 2 y a la teórica mostrada en el marco teórico.

B. CÁLCULOS DE MUESTRA

Cálculo 1. Determinación del rendimiento de concentración de microorganismos con respecto al consumo de sustrato ($Y_{x/s}$).

Utilizando la ecuación (8) de la sección de marco teórico y los datos de consumo de sustrato y generación de producto mostrados en los cuadros 27 y 62, se obtiene:

$$Y_{x/s} = \frac{(0.0108 - 0.0050) \text{ g/mL}}{(0.0156 - 0.0077) \text{ g/mL}}$$

$$Y_{x/s} = 0.7295 \times 100$$

$$Y_{x/s} = 72.95\%$$

Cálculo 2. Determinación del rendimiento de concentración de producto con respecto al consumo de sustrato ($Y_{p/s}$).

Utilizando la ecuación (9) de la sección de marco teórico y los datos de consumo de sustrato y generación de producto mostrados en los cuadros 28 y 62, se obtiene:

$$Y_{p/s} = \frac{(0.0103 - 0.0046) \text{ g/mL}}{(0.0156 - 0.0077) \text{ g/mL}}$$

$$Y_{p/s} = 0.7145 \times 100$$

$$Y_{p/s} = 71.45\%$$

Cálculo 3. Determinación del rendimiento de concentración de producto con respecto a microorganismos ($Y_{p/x}$).

Para calcular el rendimiento $Y_{p/x}$, se utiliza la ecuación:

$$Y_{p/x} = \frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}} \quad (41)$$

Ecuación 41. Rendimiento de generación de producto con respecto al consumo de sustrato, donde $Y_{x/s}$ es el rendimiento de concentración de microorganismos con respecto al sustrato y $Y_{p/s}$ es el rendimiento de concentración de producto con respecto al sustrato.

Empleando los datos de los cuadros 27, 28 y 62 para los rendimientos necesarios para el cálculo, se obtiene:

$$Y_{p/x} = \frac{0.7145}{0.7295}$$

$$Y_{p/x} = 0.9793 \times 100$$

$$Y_{p/x} = 97.93\%$$

Cálculo 4. Determinación del rendimiento de concentración de subproducto con respecto a sustrato ($Y_{sp/s}$).

Utilizando la ecuación (10) de la sección de marco teórico y los datos de consumo de sustrato y generación de subproducto mostrados en los cuadros 29 y 62, se obtiene

$$Y_{sp/s} = \frac{(0.00316 - 0.00192) \text{ g/mL}}{(0.0156 - 0.0077) \text{ g/mL}}$$

$$Y_{sp/s} = 0.1562 \times 100$$

$$Y_{sp/s} = 15.62\%$$

Cálculo 5. Determinación de la concentración de microorganismos

Para calcular el rendimiento C_N , se utiliza la ecuación:

$$C_N = \frac{g \text{ peso seco}}{mL \text{ de muestra}} \quad (42)$$

Ecuación 42. Concentración de microorganismos, donde *g peso seco* es la masa que se obtiene de microorganismos y *mL de muestra* es el volumen de la muestra tomada para la obtención de microorganismos.

Empleando los datos del Cuadro 27 y considerando que el volumen de muestra fue de 50mL para los datos necesarios para el cálculo, se obtiene:

$$C_N = \frac{0.5023 \text{ g}}{50 \text{ mL}}$$

$$C_N = 0.0100 \text{ g/mL}$$

Cálculo 6. Determinación de la concentración de PHA

Para calcular el rendimiento C_P , se utiliza la ecuación:

$$C_P = \frac{g \text{ PHA}}{mL \text{ de muestra}} \quad (43)$$

Ecuación 43. Concentración de PHA, donde *g PHA* es la masa que se obtiene de producto y *mL de muestra* es el volumen de la muestra tomada para la obtención de PHA.

Empleando los datos del Cuadro 28 y considerando que el volumen de muestra fue de 50mL para los datos necesarios para el cálculo, se obtiene:

$$C_P = \frac{0.4501 \text{ g}}{50 \text{ mL}}$$

$$C_P = 0.0090 \text{ g/mL}$$

Cálculo 7. Corrección de azúcares fermentables cuantificados por HPLC

Utilizando el factor de dilución 1:3 que se trabajó para la preparación de las muestras en la escala de la curva de calibración del HPLC, se calcula el porcentaje de azúcares de la siguiente manera:

$$0.194\% \text{ glucosa en solución} \times (3) = 0.582\% (m/v)$$

$$0.582\% (m/v) \left(\frac{1}{100} \right) = 0.00582 \text{ g/mL}$$

Cálculo 8. Concentración total de azúcares fermentables cuantificados por HPLC

Para calcular la concentración total de azúcares fermentables, se utiliza la ecuación:

$$Cs = ([Glucosa] + [Sacarosa] + [Fructosa]) \text{ g/mL} \quad (44)$$

Ecuación 44. Concentración total de azúcares fermentables, donde [Glucosa] es la concentración de glucosa, [Sacarosa] es la concentración de sacarosa y [Fructosa] es la concentración de fructosa.

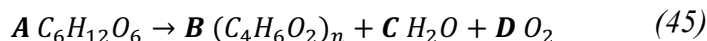
Empleando los datos del Cuadro 61, necesarios para el cálculo, se obtiene:

$$Cs = ([0.00582] + [0.00306] + [0.00675]) \text{ g/mL}$$

$$Cs = 0.0156 \text{ g/ml}$$

Cálculo 9. Formación de Polihidroxicanoatos

Para calcular determinar los coeficientes estequiométricos, se utiliza la ecuación:



Ecuación 45. Reacción química para la formación de PHA, donde A es el coeficiente estequiométrico de la glucosa, B el coeficiente estequiométrico de PHA, C el coeficiente estequiométrico del agua formada y D el coeficiente estequiométrico del oxígeno formado.

Considerando que el compuesto común para los polihidroxicanoatos es el PHB y que el más común de estos es el P₃HB el cual presenta como monómero C₄H₆O₂ y un peso molecular promedio de 1.65x10⁵ g/mol, se tiene lo siguiente:

$$n = \frac{1.65 \times 10^5 \text{ g/mol P3HB}}{86.09 \text{ g/mol C}_4\text{H}_6\text{O}_2}$$

$$n = 1917$$

$$(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2)_n = (\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2)_{1917}$$

Cuadro 58. Balanceo de carbono, hidrógeno y oxígeno en la fermentación de PHA

REACTIVOS	PRODUCTOS
$C) \frac{7666}{6} = 1277$ $H) 1278 \times 12 = 15333$ $O) 1278 \times 6 = 7666$	$C) 4 \times 1917 = 7666$ $H) 6 \times 1917 = 11500$ $O) 2 \times 1917 = 3833$

Balanceando oxígeno y agua

$$(H_{IN} - H_{out}) \text{ mol H} \left(\frac{1 \text{ mol H}_2\text{O}}{2 \text{ mol H}} \right) = C$$

$$\frac{15333 \text{ mol H} - 11500 \text{ mol H}}{2} = 1917 \text{ mol H}_2\text{O}$$

$$[(O_{IN}) \text{ mol O} - (O_{OUT}) \text{ mol O}] \left(\frac{1 \text{ mol O}_2}{2 \text{ mol O}} \right) = D$$

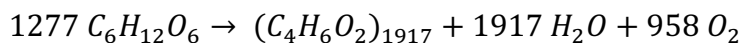
$$\frac{7666 \text{ mol O} - 3833 \text{ mol O}}{2} = 1917$$

$$1917 \text{ mol O}_2 \left(\frac{1}{2} \right) = 958 \text{ mol O}_2$$

Cuadro 59. Valores de coeficientes para la ecuación (45)

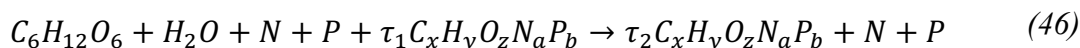
Coeficiente	Valor
A	1277
B	1
C	1918
D	958
n	1917

Reacción balanceada para la producción de polihidroxicanoatos



Cálculo 10. Producción de biomasa

Para calcular determinar los coeficientes estequiométricos, se utiliza la ecuación:



Ecuación 46. Reacción química para la producción de Biomasa, donde τ_1 y τ_2 son los coeficientes estequiométricos para la ecuación molecular de microorganismos, x el subíndice para el carbono, y el subíndice para el hidrógeno, z el subíndice para el oxígeno, a el subíndice para el nitrógeno y b el subíndice para el fósforo presente en la ecuación molecular de microorganismos.

En donde la composición de los microorganismos es una incógnita. Es por esto que se toma en cuenta que:

Inicio fermentación

Nitrógeno

$$14.5046 \text{ g } NH_4Cl \left(\frac{1 \text{ mol } NH_4Cl}{53.491 \text{ g } NH_4Cl} \right) \left(\frac{1 \text{ mol } NH_4}{1 \text{ mol } NH_4Cl} \right) \left(\frac{1 \text{ mol } N}{1 \text{ mol } NH_4} \right) \\ = 0.2711 \text{ mol } N$$

$$0.5053 \text{ g } Fe(NH_4Cl) \left(\frac{1 \text{ mol } Fe(NH_4Cl)}{261.974 \text{ g } Fe(NH_4Cl)} \right) \left(\frac{1 \text{ mol } NH_4}{1 \text{ mol } Fe(NH_4Cl)} \right) \left(\frac{1 \text{ mol } N}{1 \text{ mol } NH_4} \right) \\ = 0.0019 \text{ mol } N$$

$$\text{moles totales de } N = 0.2730 \text{ mol } N$$

Fósforo

$$19.9997 \text{ g } KH_2PO_4 \left(\frac{1 \text{ mol } KH_2PO_4}{136 \text{ g } KH_2PO_4} \right) \left(\frac{1 \text{ mol } H_2PO_4^-}{1 \text{ mol } KH_2PO_4} \right) \left(\frac{1 \text{ mol } P}{1 \text{ mol } H_2PO_4^-} \right) \\ = 0.1471 \text{ mol } P$$

$$15.9559 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \left(\frac{1 \text{ mol Na}_2\text{HPO}_4}{141.96 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4} \right) \left(\frac{1 \text{ mol HPO}_4^{-2}}{1 \text{ mol Na}_2\text{HPO}_4} \right) \left(\frac{1 \text{ mol P}}{1 \text{ mol HPO}_4^{-2}} \right)$$

$$= 0.1124 \text{ mol P}$$

$$\text{moles totales de P} = 0.2594 \text{ mol P}$$

Glucosa

$$0.00624 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) (10 \text{ L}) = 62.4 \text{ g glucosa} \left(\frac{1 \text{ mol glucosa}}{180.156 \text{ g glucosa}} \right)$$

$$= 0.3463 \text{ mol glucosa}$$

Final fermentación

Nitrógeno

$$100 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ Nitrógeno} (10 \text{ L}) = 1000 \text{ mg} \left(\frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol N}}{14.0067 \text{ g N}} \right)$$

$$= 0.0713 \text{ mol N}$$

Fósforo

$$275 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ Fósforo} (10 \text{ L})$$

$$= 2750 \text{ mg} \left(\frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol PO}_4^{-3}}{94.9714 \text{ g PO}_4^{-3}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol P}}{1 \text{ mol PO}_4^{-3}} \right)$$

$$= 0.02895 \text{ mol P}$$

Glucosa

$$0.0018 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) (10 \text{ L}) = 1.8 \text{ g glucosa} \left(\frac{1 \text{ mol glucosa}}{180.156 \text{ g glucosa}} \right)$$

$$= 0.0099 \text{ mol glucosa}$$

Formula molecular

$$\text{P) } 0.2595 + \tau_1 b = 0.02895 + \tau_2 b$$

$$\text{N) } 0.2730 + \tau_1 a = 0.0713 + \tau_2 a$$

$$\text{O) } 0.3463(6) = \tau_2 z$$

$$\text{H) } 0.3463(12) = \tau_2 y$$

$$\text{C) } 0.3463(6) = \tau_2 x$$

Tomando en cuenta únicamente los consumos de reactivos en la reacción, se tiene por lo tanto que $\tau_1 = 0$

$$\text{P) } 0.23049 = \tau_2 b$$

$$\text{N) } 0.201694 = \tau_2 a$$

$$\text{O) } 2.0778 = \tau_2 z$$

$$\text{H) } 4.1556 = \tau_2 y$$

$$\text{C) } 2.0778 = \tau_2 x$$

Encontrando valores para a,b,x,y,z

$$\frac{a\tau_2}{a\tau_2} = \frac{a}{a} = \frac{0.201694}{0.201694} = 1$$

$$\frac{b\tau_2}{a\tau_2} = \frac{b}{a} = \frac{0.23049}{0.201694} = 1.1428$$

$$\frac{x\tau_2}{a\tau_2} = \frac{x}{a} = \frac{2.0778}{0.201694} = 10.3017$$

$$\frac{y\tau_2}{a\tau_2} = \frac{y}{a} = \frac{4.1556}{0.201694} = 20.6035$$

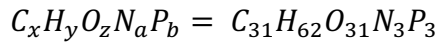
$$\frac{z\tau_2}{a\tau_2} = \frac{z}{a} = \frac{2.0778}{0.201694} = 10.30175$$

Dado que a=1 se tiene que:

$$\frac{b}{(1)} = 1.1428 \quad b = 1.1428 \quad \frac{x}{(1)} = 10.3017 \quad x = 10.3017$$

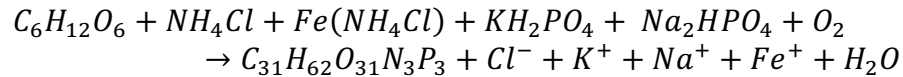
$$\frac{y}{(1)} = 20.6035 \quad y = 20.6035 \quad \frac{z}{(1)} = 10.30175 \quad z = 10.30175$$

$$(3)a = 3 \quad (3)b = 3 \quad (3)x = 31 \quad (3)y = 62 \quad (3)z = 31$$

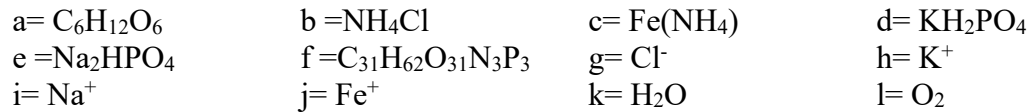


Balanceo

Colocando la formula molecular que se determinó para los microorganismos y los compuestos utilizados como fuente de nitrógeno y fósforo, se tiene la siguiente ecuación a balancear:



Asignando variables y planteando ecuaciones para cada compuesto se tiene:



- C) $6a = 31f$
- H) $12a + 4b + 4c + 2d + e = 62f + 2k$
- O) $6a + 4d + 4e + 2l = 31f + k$
- N) $b + c = 3f$
- P) $d + e = 3f$
- K) $d = h$
- Cl) $b = g$
- Fe) $c = j$
- Na) $2e = i$

Calculando los moles agregados para cada compuesto:

Cuadro 60. Cantidad de sustancia agregada para las fuentes de N, P y sustrato

Compuesto	Cantidad (±0.0001 g)	Peso molecular (g/mol)	Cantidad de sustancia (mol)
NH ₄ Cl	14.5046	53.49	0.271164704
Fe(NH ₄)	0.1084	261.974	0.000413782
KH ₂ PO ₄	19.9997	136	0.147056618
Na ₂ HPO ₄	15.9559	141.96	0.112397154
Melaza	300	--	--

Dado que la cantidad de materia para Fe(NH₄) es significativamente menor a los demás compuestos, se aproxima a cero ($4.13 \times 10^{-4} \approx 0 \rightarrow c=0$)

Si f=10 y c=0, entonces:

$$a = 52 \quad b = 30 \quad g = 30 \quad j = 0$$

Conociendo que,

$$\frac{Na_2HPO_4}{KH_2PO_4} = \frac{0.1123971}{0.1470566} = 0.7643$$

Se tiene la relación $e/d=0.7643$, por lo tanto:

$$\begin{aligned} e &= 0.7643d \\ d + 0.7643d &= 30 \\ 1.7643d &= 30 \\ d &= 17 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} d &= h \\ h &= 17 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} e &= 0.7643(17) \\ e &= 13 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2e &= i \\ i &= 26 \end{aligned}$$

Balanceando oxígeno y agua:

Hidrógeno

$$12(52) + 4(30) + 4(0) + 2(17) + (13) = 62(10) + 2k$$

$$791 = 620 + 2k$$

$$k = 85.5$$

Oxígeno

$$6(52) + 4(17) + 4(13) + 2l = 31(10) + k$$

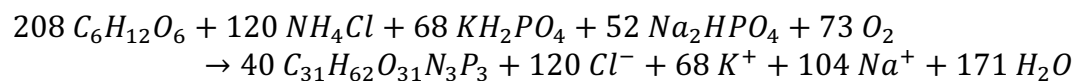
$$6(52) + 4(17) + 4(13) + 2l = 31(10) + (85.5)$$

$$l = 18.25$$

Cuadro 61. Determinación de coeficientes para la ecuación (46)

Coeficiente	Valor		Valor corregido
a	52	→	208
b	30	→	120
c	0	→	0
d	17	→	68
e	13	→	52
f	10	→	40
g	30	→	120
h	17	→	68
i	26	→	104
j	0	→	0
k	85.5	→	342
l	18.25	→	73

Para eliminar decimales, se multiplican todos los coeficientes por 4 por lo tanto finalmente se tiene la reacción balanceada para la formación de microorganismos.



C. ANÁLISIS DE ERROR

Cálculo 11. Propagación de error para azúcares totales.

Para calcular la incertidumbre, se utiliza la ecuación:

$$\Delta y = \pm \sqrt{(\Delta A)^2 + (\Delta B)^2} \quad (47)$$

Ecuación 47. Incertidumbre de sumas y restas, donde ΔA es la incertidumbre de la medida A y ΔB la incertidumbre del valor medido B.

Empleando las incertidumbre necesarias para el cálculo, se obtiene:

$$\Delta y = \pm \sqrt{(0.0018)^2 + (0.00202)^2 + (0.004)^2}$$

$$\Delta y = 0.004836 \% (0.00795 \text{ g/mL})$$

$$\Delta y = \pm 3.84 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$$

Cálculo 12. Propagación de error para rendimiento de concentración microorganismos con respecto al sustrato.

Para calcular la incertidumbre, se utiliza la ecuación:

$$\frac{\Delta y}{y} = \pm \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2} \quad (48)$$

Ecuación 48. Incertidumbre de multiplicaciones y divisiones, donde ΔA es la incertidumbre de la medida A, A es el valor de la medición, ΔB la incertidumbre de la medida B y B es el valor de la medición.

Empleando las incertidumbre necesarias para el cálculo, se obtiene:

$$\frac{\Delta y}{72.96} = \pm \sqrt{\left(\frac{3.84 \times 10^{-5}}{0.00795}\right)^2 + \left(\frac{0.0001}{0.00568}\right)^2}$$

$$\Delta y = \pm 1.8136 \%$$

Cálculo 13. Desviación estándar de triplicado de PHA.

Para calcular la desviación estándar, se utiliza la ecuación:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - X)^2}{n - 1}} \quad (49)$$

Ecuación 49. Desviación estándar, donde \bar{X} es la media del set de datos, X el valor del dato puntual y n el número de datos disponibles.

Empleando los datos del cuadro 66 necesarios para el cálculo, se obtiene:

$$S = \pm \sqrt{\frac{(3.1 - 3.2)^2 + (3.1 - 3.1)^2 + (3.1 - 2.9)^2}{2}}$$
$$S = \pm 0.1527 \text{ g}$$

Cálculo 12. Media del triplicado de PHA.

Para calcular la media del triplicado, se utiliza la ecuación:

$$\bar{X} = \frac{\sum n}{N} \quad (50)$$

Ecuación 50. Media, donde $\sum n$ es la sumatoria del set de datos y N es el número de datos disponibles.

Empleando los datos del cuadro 66 necesarios para el cálculo, se obtiene:

$$\bar{X} = \frac{3.1 + 3.1 + 2.9}{3}$$
$$\bar{X} = 3.1 \text{ g}$$

Cálculo 14. Error porcentual de variación de método para PHA.

Para calcular el error porcentual de variación del método, se utiliza la ecuación:

$$CV = \frac{3\sigma_x}{|X|} \quad (51)$$

Ecuación 51. Error porcentual de variación del método, donde σ_x es la desviación estándar y \bar{X} es el valor absoluto de la media.

Empleando los valores necesarios para el cálculo, se obtiene:

$$CV = \left(\frac{0.1527 \times 3}{3.1} \right) \times 100$$

$$CV = 14.94\%$$

Cálculo 15. Error de la linealidad de curva de calibración

Para calcular el error de la linealidad de curva de calibración del método, se utiliza la ecuación:

$$E = (1 - R^2) \quad (52)$$

Ecuación 52. Error de la linealidad de curva de calibración, donde σ_x es la desviación estándar y \bar{X} es el valor absoluto de la media.

Empleando los valores necesarios para el cálculo, se obtiene:

$$E = (1 - 0.99818)$$

$$E = 0.00182\%$$

D. DATOS CALCULADOS

1. Datos calculados la corrida 1

Cuadro 62. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 1

Identificación de muestra	Masa de microorganismos (± 0.0001 g)	Concentración microorganismos ($\pm 3.01 \times 10^{-6}$ g/mL)
B1B003	0.0088	0.0003
B1B006	0.0092	0.0003
B1B009	0.0117	0.0003
B1B011	0.0131	0.0004
B1B014	0.0158	0.0005
B1B017	0.0199	0.0006
B1B020	0.0203	0.0006
B1B023	0.0205	0.0006

Las masas y concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 63. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de PHA luego de purificarlo y secarlo para la corrida experimental 1

ID	Masa de PHA (± 0.0001 g)	Concentración de PHA ($\pm 2.86 \times 10^{-6}$ g/mL)
B1B003	0.00110	0.0000
B1B006	0.00120	0.0000
B1B009	0.00150	0.0000
B1B011	0.00420	0.0001
B1B014	0.00780	0.0002
B1B017	0.00930	0.0003
B1B020	0.00970	0.0003
B1B023	0.01010	0.0003

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 64. Concentraciones de azúcares fermentables calculados en la corrida experimental 1 con cromatografía líquida y tomando en cuenta las disoluciones preparadas

Identificación de muestra	Glucosa (±0.0096g/mL)	Sacarosa (±0.0096g/mL)	Fructosa (±0.0096g/mL)
A1A001	0.00423	0.00054	0.00714
A1A002	0.00429	0.00051	0.00693
B1B003	0.00447	0.00057	0.00711
A1A004	0.00432	0.00051	0.00699
A1A005	0.00417	0.00054	0.00681
B1B006	0.00429	0.00054	0.00621
A1A007	0.00453	0.00051	0.00714
A1A008	0.0045	0.00057	0.00711
B1B009	0.00426	0.00048	0.00708
A1A010	0.00444	0.00057	0.00711
B1B011	0.00417	0.00051	0.00666
A1A012	0.00375	0.00048	0.00543
A1A013	0.00312	0.00045	0.00528
B1B014	0.00336	0.00042	0.00576
A1A015	0.00315	0.00042	0.00558
A1A016	0.00309	0.00039	0.00534
B1B017	0.00312	0.00036	0.00543
A1A018	0.00321	0.00033	0.00573
A1A019	0.00324	0.00036	0.00555
B1B020	0.00351	0.00033	0.00576
A1A021	0.00321	0.00036	0.00561
A1A022	0.00321	0.00039	0.00573
B1B023	0.0036	0.00036	0.00573
A1A024	0.003	0.00036	0.0057

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un Cromatógrafo líquido con columna Hi-plex H y fase móvil acuosa

Cuadro 65. Concentraciones de azúcares fermentables totales calculados en la corrida experimental 1 con cromatografía líquida

Identificación de muestra	Azúcares totales ($\pm 1.05 \times 10^{-5}$ g/mL)
A1A001	0.01191
A1A002	0.01173
B1B003	0.01215
A1A004	0.01182
A1A005	0.01152
B1B006	0.01104
A1A007	0.01218
A1A008	0.01218
B1B009	0.01182
A1A010	0.01212
B1B011	0.01134
A1A012	0.00966
A1A013	0.00885
B1B014	0.00954
A1A015	0.00915
A1A016	0.00882
B1B017	0.00891
A1A018	0.00927
A1A019	0.00915
B1B020	0.0096
A1A021	0.00918
A1A022	0.00933
B1B023	0.00969
A1A024	0.00906

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando un Cromatógrafo líquido con columna Hi-plex H y fase móvil acuosa.

Cuadro 66. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 1

Identificación de muestra	Masa microorganismos (± 0.0001 g)	Concentración microorganismos ($\pm 3.01 \times 10^{-6}$ g/mL)
C1C001	7.5	0.0015
C1C002	7.3	0.0024
C1C003	6.8	0.0023

Las masas y concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 67. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de PHA luego de purificarlo y secarlo y para la corrida experimental 1

Identificación de muestra	Masa de PHA (± 0.1 g)	Concentración de PHA ($\pm 2.86 \times 10^{-6}$ g/mL)
C1C001	2.5	0.0005
C1C002	2.7	0.0009
C1C003	2.5	0.0005

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

2. Datos calculados para la corrida 2

Cuadro 68. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Masa de Microorganismos (± 0.0001 g)	Concentración de Microorganismos ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
B2B003	0.2490	0.00498
B2B006	0.2510	0.00502
B2B009	0.2780	0.00556
B2B011	0.2870	0.00574
B2B014	0.3690	0.00738
B2B017	0.5020	0.01004
B2B020	0.5279	0.010558
B2B023	0.5342	0.010684
B2B027	0.5390	0.01078

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 69. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de PHA luego de purificarlo y secarlo para la corrida experimental 2

I Identificación de muestra	Masa de PHA (± 0.0001 g)	Concentración de PHA ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
B2B003	0.2120	0.00424
B2B006	0.2070	0.00414
B2B009	0.2470	0.00494
B2B011	0.2250	0.00450
B2B014	0.2900	0.00580
B2B017	0.4500	0.00900
B2B020	0.4860	0.00972
B2B023	0.5162	0.01032
B2B027	0.5250	0.01050

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 70. Concentraciones calculadas de azúcares fermentables en la mezcla reactiva a diferentes tiempos, para la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Glucosa (±0.00012 g/mL)	Sacarosa (±0.00012 g/mL)	Fructosa (±0.00012 g/mL)
A2A001	0.00582	0.00306	0.00675
A2A002	0.00576	0.00303	0.00687
B2B003	0.00582	0.00306	0.00528
A2A004	0.00561	0.00303	0.00468
A2A005	0.0057	0.003	0.00693
B2B006	0.00558	0.00312	0.00522
A2A007	0.00579	0.00327	0.00525
A2A008	0.00558	0.00321	0.00534
B2B009	0.00555	0.00324	0.00513
A2A010	0.00534	0.00327	0.00576
B2B011	0.00531	0.0033	0.00507
A2A012	0.00489	0.00321	0.00561
A2A013	0.00474	0.00327	0.00549
B2B014	0.00459	0.00321	0.0051
A2A015	0.00426	0.00234	0.00498
A2A016	0.0039	0.00177	0.00462
B2B017	0.00348	0.00177	0.00471
A2A018	0.00384	0.00174	0.00462
A2A019	0.00375	0.00186	0.00453
B2B020	0.00315	0.00177	0.00384
A2A021	0.0033	0.00165	0.00411
A2A022	0.003	0.0015	0.00378
A2A023	0.00273	0.00168	0.00384
A2A024	0.00312	0.00168	0.00474
A2A025	0.00273	0.00144	0.00357
A2A026	0.00255	0.00165	0.00342
A2A027	0.00252	0.00186	0.00354
A2A028	0.00249	0.00168	0.00351
A2A029	0.00255	0.00165	0.00348

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando las concentraciones obtenidas con la cromatografía líquida, columna Hi-plex H y fase móvil acuosa.

Cuadro 71. Concentraciones calculadas de azúcares fermentables totales en la mezcla reactiva a diferentes tiempos, para la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Azúcares totales ($\pm 3.84 \times 10^{-5}$ g/mL)
A2A001	0.0156
A2A002	0.0157
B2B003	0.0142
A2A004	0.0133
A2A005	0.0156
B2B006	0.0139
A2A007	0.0143
A2A008	0.0141
B2B009	0.0139
A2A010	0.0144
B2B011	0.0137
A2A012	0.0137
A2A013	0.0135
B2B014	0.0129
A2A015	0.0116
A2A016	0.0103
B2B017	0.0100
A2A018	0.0102
A2A019	0.0101
B2B020	0.0088
A2A021	0.0091
A2A022	0.0083
A2A023	0.0083
A2A024	0.0095
A2A025	0.0077
A2A026	0.0076
A2A027	0.0079
A2A028	0.0077
A2A029	0.0077

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando las concentraciones obtenidas con la cromatografía líquida, columna Hi-plex H y fase móvil acuosa.

Cuadro 72. Concentraciones calculadas de subproducto para la fermentación de azúcares invertidas a diferentes tiempos, para la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Ácido acético (± 0.00012 g/mL)
A2A001	0.00192
A2A002	0.001962
B2B003	0.002049
A2A004	0.001869
A2A005	0.001854
B2B006	0.003198
A2A007	0.003504
A2A008	0.003246
B2B009	0.00309
A2A010	0.003306
B2B011	0.003387
A2A012	0.003522
A2A013	0.00336
B2B014	0.003288
A2A015	0.003471
A2A016	0.003261
B2B017	0.003402
A2A018	0.003336
A2A019	0.003345
B2B020	0.00306
A2A021	0.003438
A2A022	0.003075
A2A023	0.003576
A2A024	0.003144
A2A025	0.003201
A2A026	0.003588
A2A027	0.003387
A2A028	0.00333
A2A029	0.003162

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando las concentraciones obtenidas con la cromatografía líquida, columna Hi-plex H y fase móvil acuosa.

Cuadro 73. Rendimiento de subproducto con respecto al consumo de sustrato para la corrida 2

Cambio de consumo de sustrato ($\Delta S \pm 3.84 \times 10^{-5}$ g/mL)	Cambio de generación de subproducto ($\Delta sP \pm 0.00012$ g/mL)	Rendimiento de generación de subproducto con respecto al sustrato (yp/s ± 0.37 % (m/m))
0.0080	0.0012	15.62%

Rendimiento global calculado en la experimentación en un reactor New Brunswick con volumen efectivo de 10 L.

Cuadro 74. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Masa Microorganismos (± 0.1 g)	Concentración Microorganismos ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
C2C001	4.6	0.0015
C2C002	4.2	0.0014
C2C003	4.3	0.0014

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 75. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 2

Identificación de muestra	Masa de PHA (± 0.1 g)	Concentración PHA ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
C2C001	3.2	0.0011
C2C002	3.1	0.0010
C2C003	2.9	0.0010

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

3. Datos calculados para la corrida 3

Cuadro 76. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Masa de Microorganismos (± 0.0001 g)	Concentración Microorganismos ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
B3B003	0.5351	0.01070
B3B006	0.5360	0.01072
B3B010	0.5760	0.01152
B3B013	0.5975	0.01195
B3B016	0.6718	0.01344
B3B019	0.6896	0.01379
B3B022	0.6887	0.01377
B3B025	0.6984	0.01397
B3B028	0.7229	0.01446

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4 kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 77. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de PHA luego de purificarlo y secarlo para la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Masa de PHA (± 0.0001 g)	Concentración PHA ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
B3B003	0.3746	0.00849
B3B006	0.3694	0.00739
B3B010	0.3876	0.00775
B3B013	0.4662	0.00932
B3B016	0.5072	0.01014
B3B019	0.5694	0.01139
B3B022	0.5972	0.01194
B3B025	0.5932	0.01186
B3B028	0.6058	0.01212

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4 kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 78. Concentraciones calculadas para la cuantificación de azúcares fermentables con cromatografía líquida para la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Glucosa (±0.00115g/mL)	Sacarosa (±0.00115g/mL)	Fructosa (±0.00115g/mL)
A3A001	0.00728	0.00623	0.00707
A3A002	0.00595	0.00644	0.00875
B3B003	0.00372	0.00276	0.0069
A3A004	0.00321	0.00267	0.00768
A3A005	0.00321	0.00309	0.00768
B3B006	0.00375	0.00273	0.00645
A3A007	0.00357	0.00207	0.00051
A3A008	0.00117	0.00042	0
B3B009	0.00048	0.00075	0
B3B010	0	0.00078	0
A3A011	0	0.00072	0
B3B012	0	0.00072	0
B3B013	0	0.00075	0
A3A014	0.00105	0.00078	0
A3A015	0.00078	0.00078	0
B3B016	0	0.00093	0
A3A017	0.00105	0.00111	0.00078
A3A018	0.00111	0.00087	0
B3B019	0	0.00078	0.00027
A3A020	0	0.00024	0
A3A021	0	0.00033	0
A3A022	0.00087	0.00087	0
A3A023	0	0	0
A3A024	0.00078	0.00051	0
A3A025	0	0.00024	0
A3A026	0	0.00024	0
A3A027	0	0.00024	0
B3B028	0	0.00081	0

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando una columna Hi-plex y fase móvil acuosa.

Cuadro 79. Concentraciones calculadas para la cuantificación de azúcares fermentables totales con cromatografía líquida para la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Azúcares totales ($\pm 8.62 \times 10^{-7}$ g/mL)
A3A001	0.02058
A3A002	0.02114
B3B003	0.01338
A3A004	0.01356
A3A005	0.01398
B3B006	0.01293
A3A007	0.00615
A3A008	0.00159
B3B009	0.00123
B3B010	0.00078
A3A011	0.00072
B3B012	0.00072
B3B013	0.00075
A3A014	0.00183
A3A015	0.00156
B3B016	0.00093
A3A017	0.00294
A3A018	0.00198
B3B019	0.00105
A3A020	0.00024
A3A021	0.00033
A3A022	0.00174
A3A023	0
A3A024	0.00129
A3A025	0.00024
A3A026	0.00024
A3A027	0.00024
B3B028	0.00081

Las concentraciones se calcularon a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando una columna Hi-plex y fase móvil acuosa.

Cuadro 80. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Masa de Microorganismos (± 0.1 g)	Concentración Microorganismos ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
C3C001	5	0.0015
C3C002	5.2	0.0011
C3C003	5.2	0.0014

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4 kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 81. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de PHA con la técnica de peso seco, luego de purificar y secar y para la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Masa de PHA (± 0.1 g)	Concentración PHA ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
C3C001	2.5	0.0011
C3C002	2.8	0.0007
C3C003	3.2	0.0010

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4 kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

4. Datos calculados para la corrida 4

Cuadro 82. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Masa de Microorganismos (± 0.0001 g)	Concentración Microorganismos ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
B4B003	0.3190	0.00638
B4B006	0.3660	0.00732
B4B009	0.3691	0.00738
B4B012	0.4975	0.00995
B4B015	0.5669	0.01134
B4B018	0.5628	0.01126
B4B021	0.5763	0.01153
B4B024	0.5903	0.01181
B4B027	0.6268	0.01254

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4 kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 83. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de PHA luego de purificarlo y secarlo para la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Masa de PHA (± 0.0001 g)	Concentración PHA ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
B4B003	0.2996	0.00699
B4B006	0.3492	0.00698
B4B009	0.3676	0.00735
B4B012	0.4769	0.00954
B4B015	0.5546	0.01109
B4B018	0.5529	0.01106
B4B021	0.5631	0.01126
B4B024	0.5772	0.01154
B4B027	0.6154	0.01231

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4 kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 84. Concentraciones calculadas para la cuantificación de azúcares fermentables con cromatografía líquida para la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Glucosa (± 0.00032 g/mL)	Sacarosa (± 0.00032 g/mL)	Fructosa (± 0.00032 g/mL)
A4A001	0.00624	0.00123	0.00327
A4A002	0.00483	0	0.00096
B4B003	0.00588	0.00147	0.00177
A4A004	0.00498	0	0.0006
A4A005	0.00456	0	0.00006
B4B006	0.00462	0	0.00066
A4A007	0.00555	0.00039	0.00162
A4A008	0.00582	0.00048	0.00084
B4B009	0.00504	0	0.00024
A4A010	0.00408	0	0.00312
A4A011	0.00108	0	0.00027
B4B012	0.00084	0	0.00027
A4A013	0.00081	0	0.00201
A4A014	0.00111	0	0.00117
B4B015	0.00117	0	0.00075
A4A016	0.00114	0	0.00033
A4A017	0.00084	0	0.00057
B4B018	0.00084	0	0.00054
A4A019	0.00084	0	0.00039
A4A020	0.00093	0	0.0003
B4B021	0.00087	0	0.00054
A4A022	0	0	0.00015
A4A023	0	0	0.00003
B4B024	0	0.00018	0.00048
A4A025	0.00021	0.00018	0.00051
A4A026	0	0.00021	0.00057
B4B027	0.00018	0.00021	0.00018

Las concentraciones se calcularon a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando una columna Hi-plex y fase móvil acuosa.

Cuadro 85. Concentraciones calculadas para la cuantificación de azúcares fermentables totales con cromatografía líquida para la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Azúcares totales ($\pm 3.45 \times 10^{-5}$ g/mL)
A4A001	0.01074
A4A002	0.00579
B4B003	0.00912
A4A004	0.00558
A4A005	0.00462
B4B006	0.00528
A4A007	0.00756
A4A008	0.00714
B4B009	0.00528
A4A010	0.0072
A4A011	0.00135
B4B012	0.00111
A4A013	0.00282
A4A014	0.00228
B4B015	0.00192
A4A016	0.00147
A4A017	0.00141
B4B018	0.00138
A4A019	0.00123
A4A020	0.00123
B4B021	0.00141
A4A022	0.00015
A4A023	0.00003
B4B024	0.00066
A4A025	0.0009
A4A026	0.00078
B4B027	0.00057

Las concentraciones se calcularon a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando una columna Hi-plex y fase móvil acuosa. Datos con un error de variabilidad método de 6.92%.

Cuadro 86. Concentraciones calculadas de subproductos para la fermentación de azúcares invertidas a diferentes tiempos, para la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Ácido Láctico (± 0.00017 g/mL)	Etanol (± 0.00017 g/mL)
A4A001	0.00072	0
A4A002	0.00099	0.00234
B4B003	0	0.00099
A4A004	0.00087	0.00105
A4A005	0.00102	0.00147
B4B006	0.00084	0.00117
A4A007	0	0
A4A008	0	0.00147
B4B009	0.00051	0
A4A010	0.00066	0.0015
A4A011	0.00045	0.00156
B4B012	0.0006	0
A4A013	0.00123	0
A4A014	0.0012	0
B4B015	0.00141	0
A4A016	0.00111	0
A4A017	0.00009	0
B4B018	0.00123	0
A4A019	0.00057	0
A4A020	0.00063	0
B4B021	0.0006	0
A4A022	0.00087	0.00303
A4A023	0	0.00321
B4B024	0	0.00369
A4A025	0	0.00384
A4A026	0.0009	0.00405
B4B027	0	0.00396

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando las concentraciones obtenidas con la cromatografía líquida, columna Hi-plex H y fase móvil acuosa.

Cuadro 87. Concentraciones totales de subproductos para la fermentación de azúcares invertidas a diferentes tiempos, para la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Subproductos totales ($\pm 0.00024\text{g/mL}$)
A4A001	0.00072
A4A002	0.00333
B4B003	0.00099
A4A004	0.00192
A4A005	0.00249
B4B006	0.00201
A4A007	0
A4A008	0.00147
B4B009	0.00051
A4A010	0.00216
A4A011	0.00201
B4B012	0.0006
A4A013	0.00123
A4A014	0.0012
B4B015	0.00141
A4A016	0.00111
A4A017	0.00009
B4B018	0.00123
A4A019	0.00057
A4A020	0.00063
B4B021	0.0006
A4A022	0.0039
A4A023	0.00321
B4B024	0.00369
A4A025	0.00384
A4A026	0.00495
B4B027	0.00396

Las concentraciones se obtuvieron a 23 °C y 84.4kPa de presión barométrica, utilizando las concentraciones obtenidas con la cromatografía líquida, columna Hi-plex H y fase móvil acuosa.

Cuadro 88. Rendimiento de subproducto con respecto al consumo de sustrato para la corrida 4

Cambio de consumo de sustrato ($\Delta S \pm 3.45 \times 10^{-5}$ g/mL)	Cambio de generación de subproducto ($\Delta sP \pm 0.00024$ g/mL)	Rendimiento de generación de subproducto con respecto al sustrato ($y_{sp/s} \pm 0.29$ % (m/m))
0.01017	0.00324	15.62%

Rendimiento global calculado en la experimentación en un reactor New Brunswick con volumen efectivo de 10 L.

Cuadro 89. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de microorganismos con la técnica de peso seco de la corrida experimental 3

Identificación de muestra	Masa de Microorganismos (± 0.1 g)	Concentración Microorganismos ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
C4C001	4.0	0.0013
C4C002	3.8	0.0012
C4C003	3.9	0.0013

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4 kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

Cuadro 90. Masas y concentraciones calculadas para la cuantificación de PHA con la técnica de peso seco, luego de purificar y secar para la corrida experimental 4

Identificación de muestra	Masa de PHA (± 0.1 g)	Concentración PHA ($\pm 2.00 \times 10^{-6}$ g/mL)
C4C001	2.3	0.00076
C4C002	2.2	0.00073
C4C003	2.3	0.00076

Las masas se obtuvieron a 23 °C y 84.4 kPa de presión barométrica, empleando la balanza analítica OHAUS, modelo PA114.

E. ESPECTROS IR

Figura 36. Espectro IR para la corrida 1

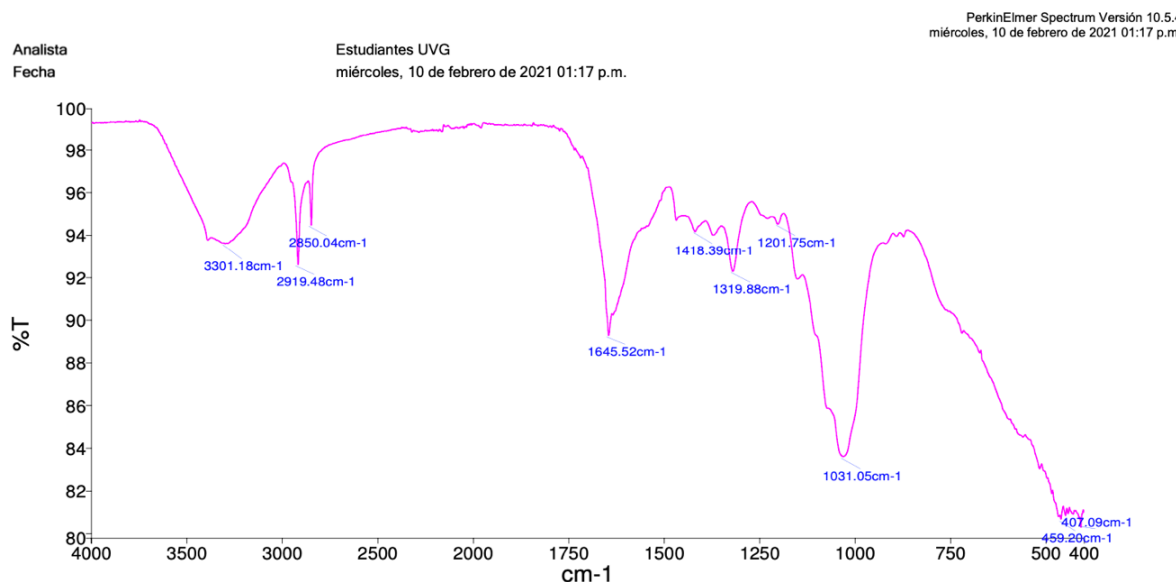


Figura 37. Espectro IR para la corrida 2

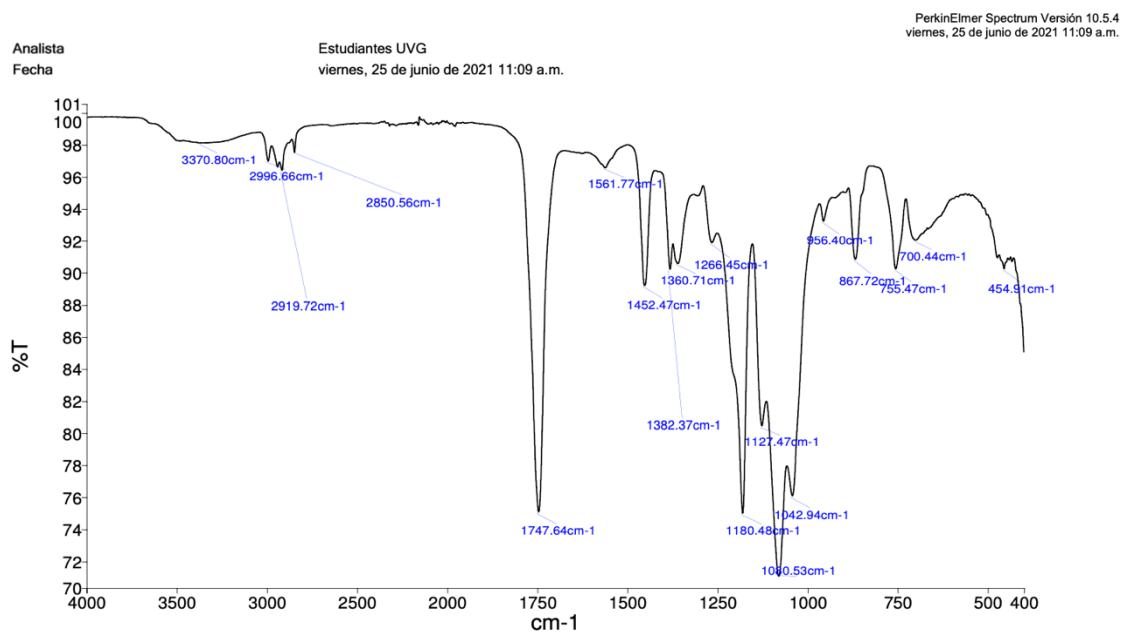


Figura 38. Espectro IR para la corrida 3

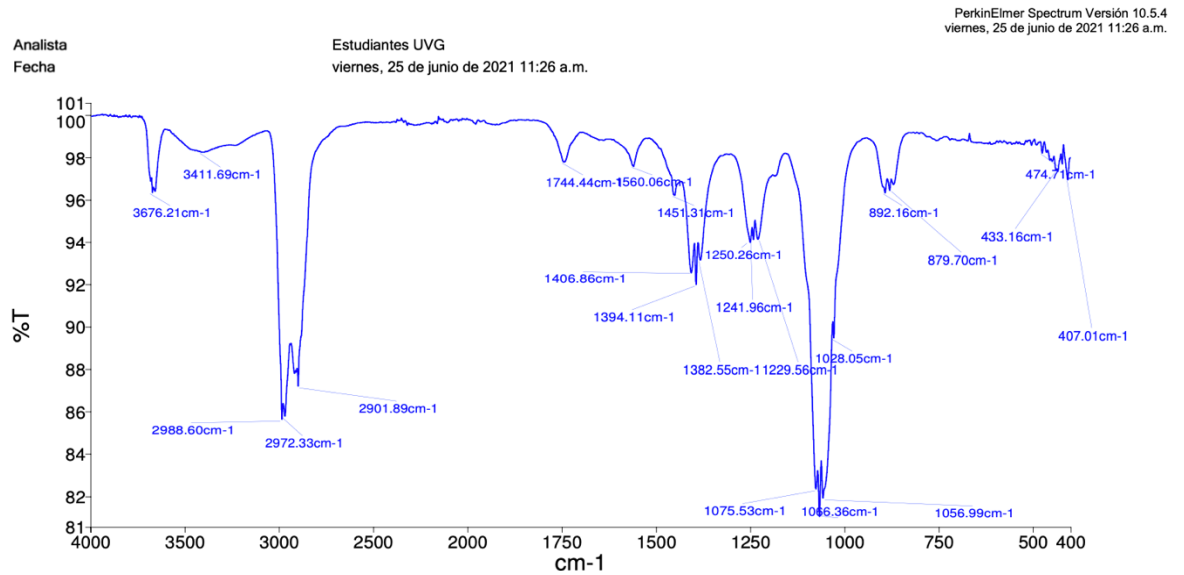


Figura 39. Espectro IR para la corrida 4

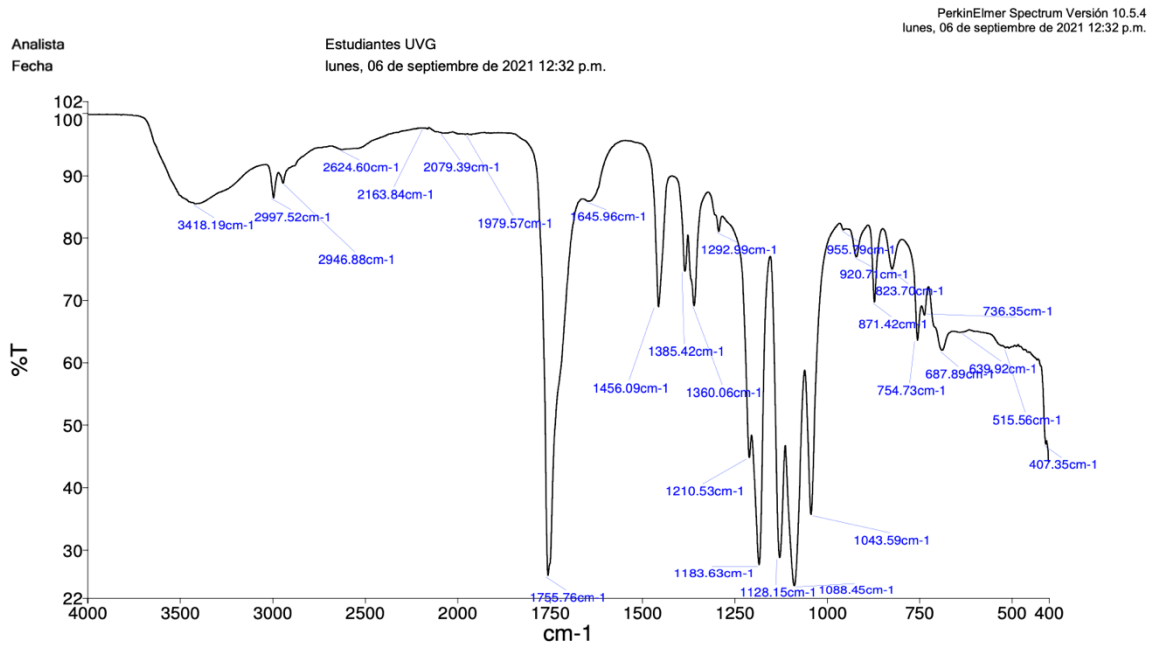
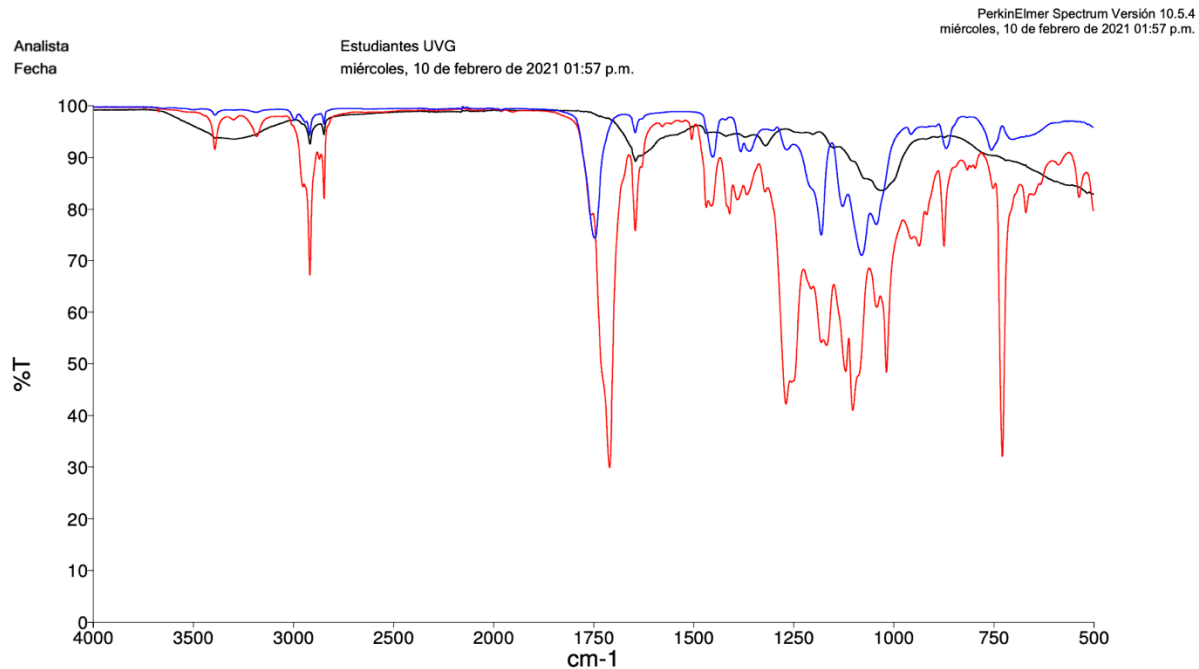


Figura 40. Comparación de espectros IR de corrida 2 y corrida 3 con estándares de PHA



En donde el espectro de color negro corresponde a la muestra de la corrida 1. Los espectros de color azul y rojo, son los estándares de PHA transparente y PHA milky white respectivamente.

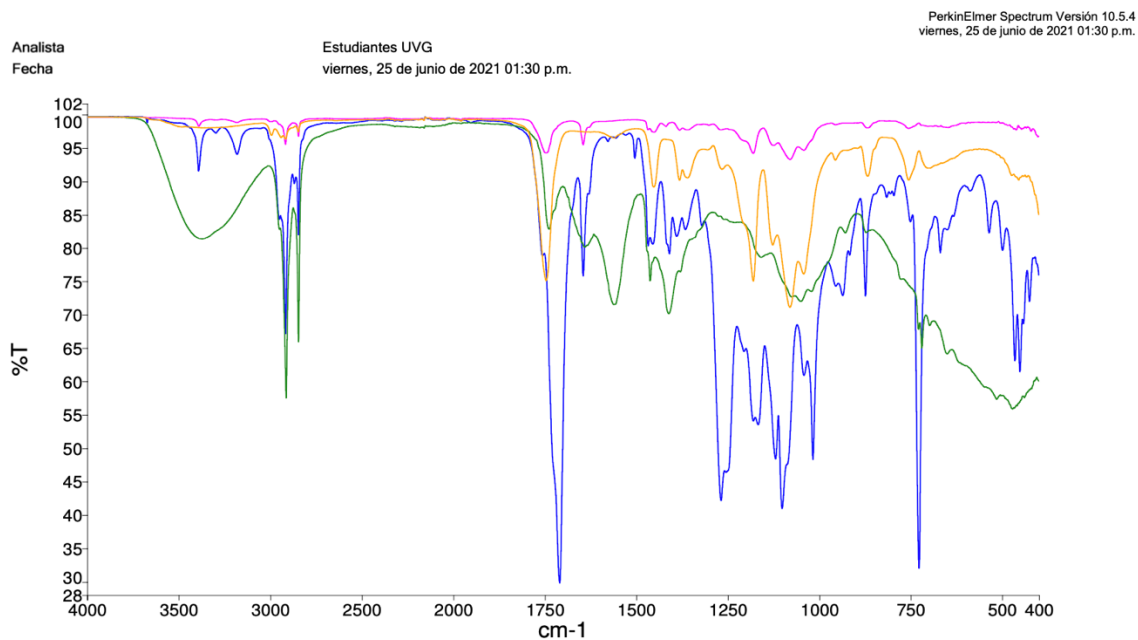
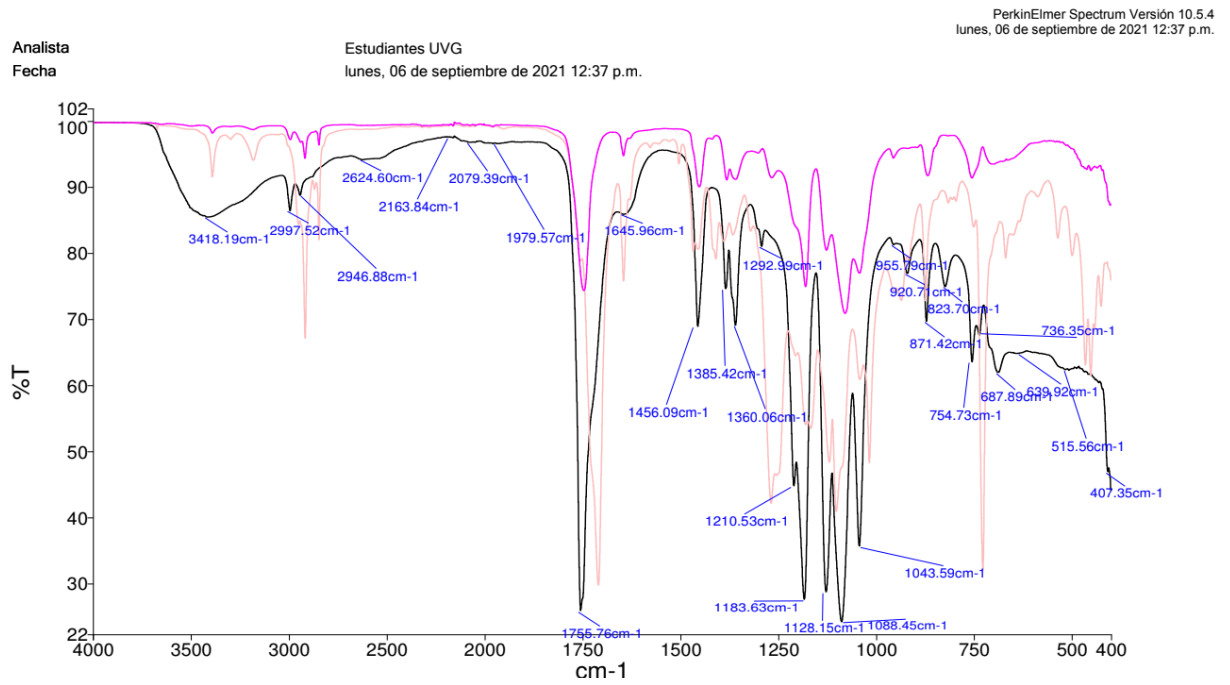


Figura 41. Comparación de espectros IR de corrida 2 y corrida 3 con estándares de PHA
En donde el espectro de color amarillo corresponde a la muestra de la corrida 2 y el espectro de color verde corresponde a la muestra de la corrida 3. Los espectros de color rosado y azul, son los estándares de PHA transparente y PHA milky white respectivamente.

Figura 42. Comparación de espectros IR de corrida 4 con estándares de PHA



En donde el espectro de color negro corresponde a la muestra de la corrida 4. Los espectros de color rosado y rojo, son los estándares de PHA transparente y PHA milky white respectivamente.

F. ESPECIFICACIONES DE REACTIVOS Y EQUIPO

1. DATOS DE REACTIVOS

Cuadro 91. Datos de caldo nutritivo usado en preparación de inóculos.

Reactivo	Caldo nutritivo
Marca	Merck
Condiciones de preparación (g/L)	8
pH a 25 °C	7
Densidad aparente (g/cm ³)	4.70

Cuadro 92. Datos de ácido sulfúrico usado en la inversión de azúcares invertidas

Reactivo	Ácido Sulfúrico
Marca	Merck
Pureza	98%
Peso molecular (g/mol)	98.079
Densidad específica	1.85

Cuadro 93. Datos de hidróxido de sodio usado en la inversión de azúcares invertidas

Reactivo	Hidróxido de sodio
Marca	Merck
Pureza	98.9%
Densidad (g/cm ³)	2.13

Cuadro 94. Datos de fosfato monopotásico usado en la formulación de medios de cultivo.

Reactivo	Fosfato de potasio monopotásico
Marca	Jost Chemical Co.
Masa molecular (g/mol)	136.09
Densidad (g/cm ³)	2.38
pH	4.5

Cuadro 95. Datos de fosfato de sodio usado en la formulación de medios de cultivo.

Reactivo	Fosfato de disódio
Marca	Jost Chemical Co.
Masa molecular (g/mol)	141.96
pH	8.7-9.3

Cuadro 96. Datos de bicarbonato de sodio usado en la formulación de medios de cultivo.

Reactivo	Bicarbonato de sodio
Marca	Merck
Pureza	99.7%
Densidad relativa	2.20
pH	8.6

Cuadro 97. Datos de sulfato de magnesio usado en la formulación de medios de cultivo.

Reactivo	Sulfato de magnesio heptahidratado
Marca	Merck
Masa molecular (g/mol)	246.5
Densidad (g/cm ³)	1.680
pH	5-8

Cuadro 98. Datos de cloruro de calcio dihidratado usado en la formulación de medios de cultivo.

Reactivo	Cloruro de calcio dihidratado
Marca	Merck
Masa molecular (g/mol)	147.01
Densidad (g/cm ³)	1.85
pH	4,5-8,5

Cuadro 99. Datos de citrato de amonio férrico en la formulación de medios de cultivo.

Reactivo	Citrato de amonio férrico
Marca	Jost Chemical Co.
Masa molecular (g/mol)	244.94
Densidad relativa	1.8

Cuadro 100. Datos de sulfato de zinc heptahidratado usado en la formulación de medios de cultivo.

Reactivo	Sulfato de Zinc heptahidratado
Marca	Merck
Masa molecular (g/mol)	197.90
Densidad relativa	2.54
pH	3.5-6

Cuadro 101. Datos de cloruro de manganeso tetrahidratado usado en la formulación de medios de cultivo.

Reactivo	Cloruro de manganeso tetrahidratado
Marca	Merck
Masa molecular (g/mol)	287.54
Densidad relativa	1.97

Cuadro 102. Datos de ácido bórico usado en la formulación de medios de cultivo.

Reactivo	Ácido bórico
Marca	Brenntag
Masa molecular (g/mol)	61.83
Densidad específica	1.014

Cuadro 103. Datos de molibdato de sodio dihidratado usado en la formulación de medios de cultivo.

Reactivo	Molibdato de sodio dihidratado
Marca	Merck
Masa molecular (g/mol)	241.95
Densidad (g/cm ³)	2.71
pH	9-10

Cuadro 104. Datos de cloroformo usado en la extracción de PHA

Reactivo	Cloroformo
Marca	Merck
Masa molecular (g/mol)	119.38
Densidad (g/cm ³)	1.5

2. ESPECIFICACIONES DE EQUIPOS

Cuadro 105. Datos de automuestreador ALS equipo HPLC

Equipo	ALS automuestreador
Marca	Agilent/HP 1100
Modelo	G1329A
Número de Serie	DE1107031

Cuadro 106. Datos de bomba cuaternaria equipo HPLC

Equipo	QuatPump
Marca	Agilent/HP 1100
Modelo	G1311A
Número de Serie	US80303120

Cuadro 107. Datos de columna equipo HPLC

Equipo	Columna Hi-Plex H
Marca	Agilent/HP 1100
Número de Serie	0006406710-98

Cuadro 108. Datos de Espectrómetro FTIR

Equipo	Espectrómetro FT-IR
Marca	PerkinElmer
Modelo	Frontier

Cuadro 109. Datos de muestreador Espectrómetro FTIR

Equipo	Accesorio de muestreo
Marca	PerkinElmer
Modelo	Universal ATB

Cuadro 110. Datos de reactor empleado en la fermentación

Equipo	Industrial Fermentor
Marca	New Brunswick Scientific Co.
Modelo	3364M

Cuadro 112. Datos de potenciómetro utilizado en la medición de pH para las fermentaciones

Equipo	Potenciómetro
Marca	OHAUS
Modelo	ST300

Cuadro 113. Datos de incubadora usado en la extracción de PHA

Equipo	Incubadora de convección
Marca	VWR Symphony
Modelo	E191047

Cuadro 114. Datos de vortex usado en extracción de PHA

Equipo	Vortex
Marca	Fischer Scientific
Velocidad	1-10

Cuadro 115. Datos de estufa utilizada para la inversión de azúcares

Equipo	Estufa
Marca	Thermo Scientific
Modelo	Cimarec +
Temperatura (°C)	0-540
Agitación (RPM)	50-1500

Cuadro 116. Datos de balanza analítica usada para la medición de sales para medio de cultivo, peso seco y producción de PHA

Equipo	Balanza Analítica
Marca	OHAUS
Modelo	PA114
Capacidad máxima (g)	110.0

Cuadro 117. Datos de reactor portátil HACH

Equipo	Reactor digital
Marca	HACH
Modelo	DRB200
Rango de temperatura (°C)	37-185

Cuadro 118. Datos de kit para la cuantificación de nitrógeno total

Equipo	Balanza Analítica
Marca	HACH
Método	10071
Rango	0.5-25 mg/L N

Cuadro 119. Datos de centrifuga usada para la extracción de PHA

Equipo	Centrifuga
Marca	Eppendorf
Modelo	5804 R
Rotor	A-4-44
Velocidad (RPM)	0-5000

3. ILUSTRACIONES DE LOS EQUIPOS UTILIZADOS

Figura 43. Columna Agilent Hi-Plex H



Figura 44. Equipo HPLC utilizado en los métodos analíticos



El equipo se encuentra compuesto por una bomba cuaternaria, automuestreador ALS, columna Hi-Plex H y un degaseador.

Figura 45. Filtro utilizados para el análisis HPL



Figura 46. Datos placa del reactor utilizado para las fermentaciones



Figura 47. Datos plaza de balanza analítica utilizada para la medición de sales en el medio de cultivo, peso seco y generación de PHA



Figura 48. Espectrómetro FTIR PerkinElmer



Figura 49. Accesorio de muestreo para el espectrómetro FT-IR



Figura 50. Potenciómetro STARTER300



Figura 51. Kit de reactivos HACH utilizados para la determinación de nitrógeno total

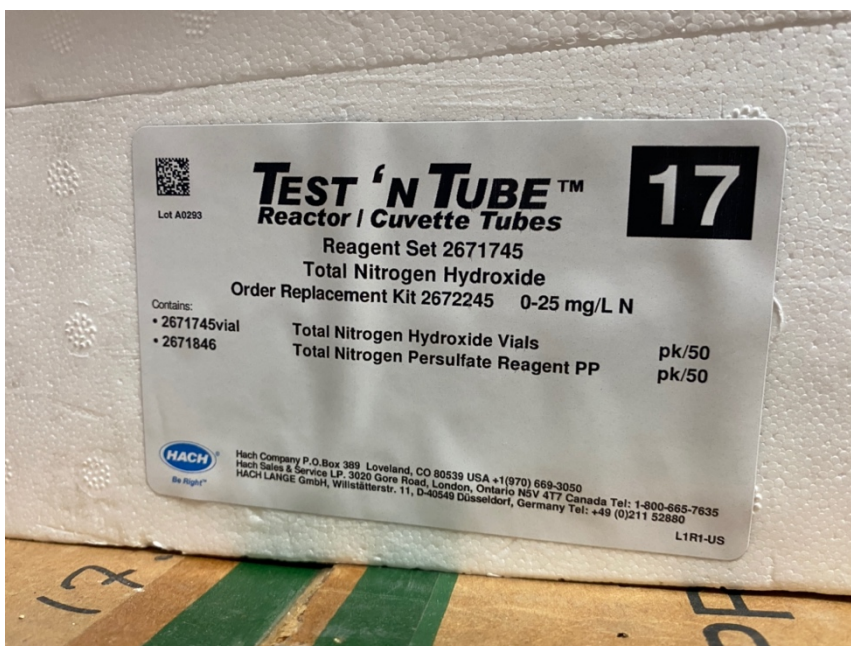


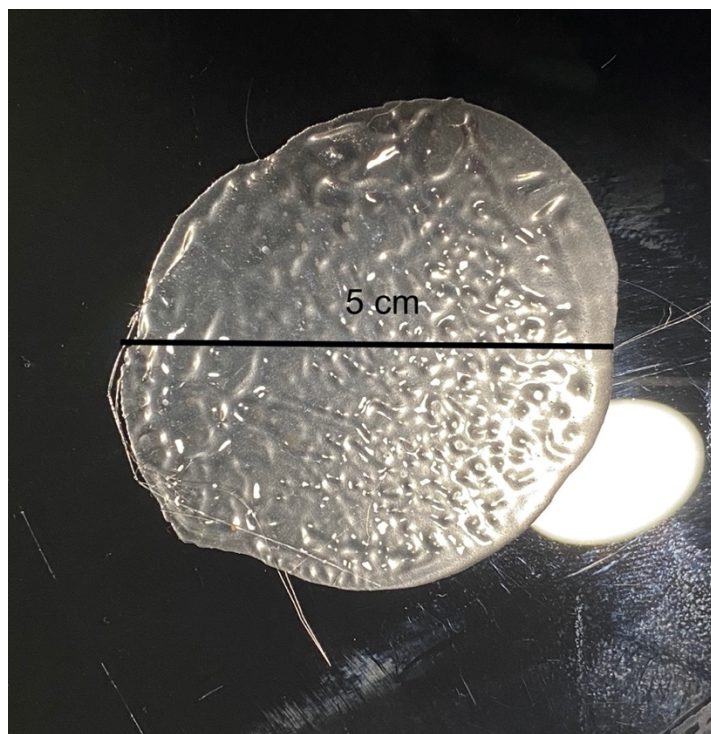
Figura 52. Incubadora de convección VWR Symphony



Figura 53. Centrífuga Eppendorf 5804R



Figura 54. Pieza fabricada con el PHA extraído de las diferentes corridas realizadas



G. ILUSTRACIÓN DEL BALANCE DE MASA DEL SISTEMA

Figura 55. Balance de masa del sistema fermentativo

