

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Efecto de la concentración de azúcares reductores y extracto de levadura en la producción de polihidroxibutirato por *Bacillus* sp. empleando residuos de cervecería

PRESENTADO POR:

BACH. CARLOS BENJAMIN HONORIO BRIONES

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

NUEVO CHIMBOTE, PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Efecto de la concentración de azúcares reductores y extracto de levadura en la producción de polihidroxitirato por *Bacillus* sp. empleando residuos de cervecería

PRESENTADO POR:

BACH. CARLOS BENJAMIN HONORIO BRIONES

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOTECNOLOGÍA

Revisado y aprobado por el asesor:

DR. ROBERTO JHIALVER VEGA PAULINO
ASESOR

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Efecto de la concentración de azúcares reductores y extracto de levadura en la producción de polihidroxibutirato por *Bacillus* sp. empleando residuos de cervecería

PRESENTADO POR:

BACH. CARLOS BENJAMIN HONORIO BRIONES

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOTECNOLOGÍA

Revisado y aprobado por el Jurado Evaluador:

M. Sc. Ángel Castro Alvarado

Presidente

Dr. Roberto Vega Paulino
Integrante

Blgo. Mblgo. Eterio Alva Muñoz
Integrante

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional del Santa, en el AULA MULTIMEDIA 2DO PISO FACULTAD DE CIENCIAS, siendo las 14:45 horas del día 04 DE AGOSTO DEL 2019, dando cumplimiento a la Resolución N° 100-2019-UNS-FC se reunió el Jurado Evaluador presidido por ANGEL CASTRO ALVARADO teniendo como miembros a ROBERTO VEGA PAULINO (secretario) (a), y ETERIO ALVA MUÑOZ (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGIA realizado por el, (la), (los) tesista (as).....

CARLOS BENJAMIN HONORIO BRIONES

....., quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada: EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES INICIALES DE AZÚCARES REDUCTORES Y EXTRACTO DE LEVADURA EN LA PRODUCCION DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR BACILLUS SP. A PARTIR DE UN HIDROLIZADO DE GRANOS GASTADOS DE CERVECERIA Y LEVADURA CERVECERA RESIDUAL

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (s) respondió (eron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como SOBRESALIENTE asignándole un calificativo de 19 puntos, según artículo 103° del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente (Res. 492-2017-CU-R-UNS).

Siendo las 14:50 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

Nombre: ANGEL CASTRO ALVARADO
Presidente

Nombre: ROBERTO VEGA PAULINO
Secretario

Nombre: ETERIO ALVA MUÑOZ
Integrante

Distribución: Integrantes J.E. (), tesistas () y archivo (02).

**ACTA DE LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES POSTERIOR A LA
SUSTENTACIÓN DE LA TESIS Y CERTIFICACIÓN**

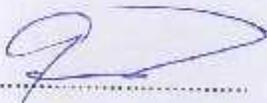
En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Laboratorio de Investigación de la E.P. Biotecnología, dando cumplimiento a la Resolución N° 160-2019-UNS-FC, siendo las 11:45 horas del día 06/08/2019 se reunió el Jurado Evaluador presidido por M.Sc. Angel Castro Alvarado teniendo como miembros a Dr. Roberto Vega Paulino (secretario) (a) y Algo. Mblgo. Eterio Alva Muñoz (integrante), para el levantamiento de observaciones posterior a la sustentación de tesis, presentada por (el), (la), (los) tesisistas Carlos Benjamín Honorio Briones

quien (es) expuso (ieron) el trabajo intitulado:

EFECCO DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y
EXTRACTO DE LEVADURA EN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO
POR BACILLUS SP. EMPLEANDO RESIDUOS DE CERVECERIA

Terminada la revisión se observa que (el), (la), (los) tesisistas han cumplido con levantar las observaciones, por tanto se CERTIFICA LA APROBACIÓN DE LA TESIS EN MENCIÓN.

Siendo las 12:34 horas del mismo día se dio por terminado el acto firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad.


Nombre: ANGEL CASTRO ALVARADO
Presidente


Nombre: ROBERTO VEGA PAULINO
Secretario


Nombre: Eterio ALVA MUÑOZ
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (03), tesisistas() y archivo FC (02).



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Carlos Benjamin Honorio Briones
Título del ejercicio: BIOTECNOLOGÍA
Título de la entrega: Efecto de la concentración de azúca...
Nombre del archivo: Informe_de_tesis_v1.docx
Tamaño del archivo: 9.78M
Total páginas: 149
Total de palabras: 37,646
Total de caracteres: 206,460
Fecha de entrega: 02-sep-2019 02:26p.m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 1166317404

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Efecto de la concentración de azúcares reductores y extracto de levadura en la producción de polihidroxibutirato por *Bacillus* sp. empleando residuos de cervecería

PRESENTADO POR:

BACH. CARLOS BENJAMIN HONORIO BRIONES

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

NUEVO CHIMBOTE, PERÚ

2019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación, así como la de mis hermanos. Siempre están brindándome su apoyo incondicional y confianza, ellos son la razón por la que he logrado y sé que continuaré logrando muchas más cosas.

AGRADECIMIENTO

La presente tesis es un esfuerzo en el cual, directa e indirectamente, participaron varias personas, leyendo, opinando, corrigiendo, con paciencia y buen ánimo, acompañándome en momentos de crisis y momentos de felicidad.

A mi asesor, Dr. Roberto Vega Paulino, quien siempre estuvo aconsejándome y animándome a lo largo de la concepción, ejecución y redacción de este trabajo.

A mis profesores M. Sc. Ángel Castro Alvarado, Mblgo. Eterio Alva Muñoz, y Mblgo. José Villanueva Carlos por compartir su enorme experiencia con comentarios y consejos hacia el trabajo.

Al Dr. Alfredo Cruz y al Dr. Alberto Quezada, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por toda su ayuda y consejos durante mi estancia en el laboratorio y en la realización de este trabajo.

A Anthony Fuentes, por su confianza, amistad y enseñanzas.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Tecnologías Limpias y/o Emergentes, pasantes, estudiantes, tesisistas, por su confianza, amistad, sus enseñanzas y por los gratos momentos que compartimos dentro y fuera del laboratorio.

A mis profesores de la carrera profesional por su aporte en mi formación, por sus consejos, enseñanzas, apoyo y por su amistad.

A mi familia por todo su cariño, apoyo y comprensión brindado durante el tiempo de labores y aprendizaje.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Problema.....	4
1.2. Hipótesis.....	4
1.3. Objetivos.....	4
1.4. Justificación.....	5
II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Biomasa Lignocelulósica.....	6
2.2. Celulosa.....	6
2.3. Hemicelulosa.....	7
2.4. Lignina.....	7
2.5. Hidrólisis de Materiales Lignocelulósicos.....	8
2.5.1. Hidrólisis ácida.....	8
2.5.2. Azúcares Reductores.....	9
2.6. Residuos Agroindustriales.....	9
2.6.1. Residuos de la Industria Cervecera.....	10
2.6.1.1. Granos Gastados de Cervecería.....	11
2.6.1.1.1. Composición de los Granos Gastados de Cervecería.....	12
2.6.2. Levadura Residual Cervecera.....	13
2.6.2.1. Extracto de Levadura.....	15
2.7. Plásticos.....	15
2.7.1. Clasificación.....	16
2.7.2. Bioplásticos.....	17
2.7.3. Polihidroxialcanoatos.....	19
2.7.3.1. Generalidades.....	19
2.7.3.2. Tipos de Polihidroxialcanoatos.....	21
2.7.3.3. Polihidroxibutirato (PHB).....	23

2.7.3.4.	Aplicaciones de los Polihidroxicanoatos	23
2.7.3.5.	Métodos de Producción de Polihidroxicanoatos.....	25
2.7.3.6.	Fermentación microbiana para la producción de PHA.....	26
2.7.3.7.	<i>Bacillus</i> como productoras de PHA.....	27
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1.	Materiales.....	29
3.1.1.	Granos gastados de cervecera	29
3.1.2.	Levadura cervecera residual.....	29
3.1.3.	Microorganismo	30
3.2.	Métodos.....	30
3.2.1.	Acondicionamiento de los granos gastados de cervecera	30
3.2.2.	Acondicionamiento de la levadura cervecera residual.....	31
3.2.3.	Preparación del hidrolizado de granos gastados de cervecera	32
3.2.4.	Preparación del extracto de levadura cervecera residual	33
3.2.5.	Cinética del microorganismo	35
3.2.5.1.	Reactivación del microorganismo	35
3.2.5.2.	Preparación del inóculo	35
3.2.5.3.	Cinética en medio de cultivo definido.....	36
3.2.5.4.	Cinética en medio de cultivo complejo	37
3.2.6.	Diseño experimental para optimización de la producción de PHB.....	38
3.2.6.1.	Preparación del inóculo	40
3.2.6.2.	Fermentación	41
3.2.6.3.	Recolección de datos	41
3.2.6.3.1.	Cuantificación de biomasa.....	41
3.2.6.3.2.	Cuantificación de azúcares reductores.....	42
3.2.6.3.3.	Cuantificación de nitrógeno total.....	42
3.2.6.3.4.	Cuantificación de PHB	42
3.2.6.4.	Análisis de Datos	42
3.2.7.	Ensayo de verificación	42
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1.	Caracterización de la materia prima	43
4.2.	Cinética de producción de PHB en medio definido.....	46
4.3.	Cinética de producción de PHB en medio complejo	49
4.3.1.	Ensayos previos con hidrolizado de granos gastados de cervecera	49
4.4.	Cinética de producción de PHB en medio complejo H + EL	51

4.5.	Optimización del medio complejo H + EL.....	55
4.5.1.	Efecto de la concentración inicial de azúcares reductores	58
4.5.2.	Efecto de la concentración inicial de extracto de levadura	61
4.5.3.	Optimización estadística de la producción de PHB	65
4.5.4.	Validación del modelo	69
V.	CONCLUSIONES.....	72
VI.	RECOMENDACIONES	73
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES	74
VIII.	ANEXOS	91

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición química de los granos gastados de cervecería.	12
Cuadro 2: Composición de la levadura cervecera residual.	14
Cuadro 3. Ejemplos de materiales plásticos pertenecientes al grupo de termoplásticos y termocompuestos.	17
Cuadro 4. Algunas propiedades de los PHA.	20
Cuadro 5. Algunos géneros y especies microbianos productores de PHA.	21
Cuadro 6. Cepas bacterianas comúnmente utilizadas para la producción de PHA a gran escala.	28
Cuadro 7. Diseño experimental factorial central compuesto rotatable 2^2	39
Cuadro 8. Valores de las variables independientes a los diferentes niveles del diseño experimental.	40
Cuadro 9. Caracterización química del hidrolizado de granos gastados de cervecería y el extracto de levadura cervecera residual.....	43
Cuadro 10. Resultados de ensayo inicial con hidrolizado de granos gastados.	50
Cuadro 11. Comparación de producción de PHB en medio H y H + EL a las 24 horas de cultivo.	52
Cuadro 12. Comparación de los parámetros de producción obtenidos en medio definido (medio M) y medio complejo (H + EL) a las 24 y 22 horas de cultivo, respectivamente.	54
Cuadro 13. Matriz del diseño central compuesto rotatable con las variables independientes en forma codificada y natural.	57
Cuadro 14. Resultados de consumo de azúcares reductores a las 24 horas de cultivo.	61
Cuadro 15. Resultados del consumo de nitrógeno a las 24 horas de cultivo.	63
Cuadro 16: Comparación de ensayos no optimizados y el ensayo optimizado.	69
Cuadro 17. Porcentaje de sólidos totales y humedad en los granos gastados de cervecería	91
Cuadro 18. Porcentaje de extractivos en los granos gastados de cervecería.....	92
Cuadro 19: Resultados del contenido de alfa-, beta- y gamma-celulosa	97
Cuadro 20: Concentración de inhibidores en el hidrolizado concentrado.....	103
Cuadro 21. Datos necesarios para el cálculo de la relación C/N.....	110
Cuadro 22: Razón molar carbono/nitrógeno inicial (mol/mol) del medio a los diferentes niveles de las variables independientes, y su relación con la respuesta %PHB.....	111

Cuadro 23: Resultados de biomasa para la cinética de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23 en el medio definido M.	112
Cuadro 24: Resultados de biomasa para la cinética de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23 en el medio complejo H + EL.	112
Cuadro 25: Resultados de biomasa para la cinética de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23 del diseño experimental	113
Cuadro 26: Resultados de biomasa para la cinética de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23 de la validación.....	114
Cuadro 27: Datos para la cinética de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23 en el medio complejo H + EL	114
Cuadro 28: Resultados de la cuantificación de azúcares reductores en el hidrolizado por método DNS	115
Cuadro 29: Resultados de la cuantificación de azúcares reductores en el extracto de levadura por método DNS	115
Cuadro 30: Resultados de la cuantificación de glucosa en el hidrolizado por método DNS	115
Cuadro 31: Resultados de la cuantificación de glucosa en el extracto de levadura por método DNS	116
Cuadro 32: Resultados de la cuantificación de nitrógeno total en hidrolizado (solución a 100 g/L azúcares reductores).....	116
Cuadro 33: Resultados de la cuantificación de nitrógeno total en extracto de levadura (solución a 30 g/L extracto de levadura).	116
Cuadro 34: Resultados de la cuantificación de nitrógeno total en el diseño experimental	117
Cuadro 35: Resultados de cuantificación de PHB para la cinética de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23 en el medio definido M.	117
Cuadro 36: Resultados de cuantificación de PHB para la cinética de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23 en el medio complejo H + EL.	118
Cuadro 37: Resultados de cuantificación de PHB para el diseño experimental.	118
Cuadro 38: Resultados de cuantificación de PHB para la validación	119
Cuadro 39: Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta de Productividad (Q_{PHB}).	119
Cuadro 40: Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta de contenido de PHB ($\%PHB$).	120

Cuadro 41: Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la respuesta $\%PHB$	120
Cuadro 42: Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la respuesta Q_{PHB}	121
Cuadro 43. Composición elemental de la biomasa de bacterias.	124
Cuadro 44. Composición del medio M modificado.	125
Cuadro 45. Cálculo de las capacidades de biomasa del medio de cultivo	126
Cuadro 46. Biomasa teórica y real obtenidas en los ensayos de optimización.	129
Cuadro 47. Biomasa teórica y real obtenidas en los ensayos de optimización.	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la lignocelulosa. FUENTE: (Mussatto & Teixeira, 2010).	7
Figura 2. Representación de la estructura de la glucosa (β -D-glucopiranososa), un azúcar reductor. FUENTE: https://www.quimicaorganica.org	9
Figura 3. Representación del proceso de producción de cerveza y los puntos del proceso donde se generan los principales residuos. FUENTE: (Mussatto, 2009).	10
Figura 4. Apariencia de los granos gastados de cervecería (A) Micrografía por microscopía electrónica de barrido de muestra de granos gastados de cervecería (B) FUENTE: (Mussatto, 2009).	11
Figura 5. Bloques de construcción moleculares más comunes de los biopolímeros, todos producidos naturalmente por fermentación bacteriana. FUENTE: (Raza <i>et al.</i> , 2018)..	18
Figura 6. Representación en cuatro cuadrantes de los tipos de materiales plásticos según su origen y biodegradabilidad (Gilbert, 2016). Abreviaciones: PE, polietileno; PVC, poli(cloruro de vinilo); PET, poli(tereftalato de etileno); PTT, poli(tereftalato de trimetileno); PBT, poli(tereftalato de butileno); PLA, polilactato; PHA, poli(hidroxialcanoato); PBS, poli(succinato de butileno); PP, polipropileno; PS, poliestireno; PCL, poli(ϵ -caprolactona); PBAT, poli(adipato-co-tereftalato de butileno). FUENTE: (Gilbert, 2016).....	19
Figura 7. Representación de la estructura básica de los polihidroxialcanoatos. R: cadena lateral, x: número de grupos metileno -CH ₂ - en el esqueleto principal del monómero, n: número de monómeros en la molécula o grado de polimerización. FUENTE: (Gilbert, 2016).....	20
Figura 8. Representación esquemática de una célula procariota conteniendo gránulos de PHA (“carbonosomas”). FUENTE: Elaboración propia.	20
Figura 9. Estructura de los monómeros comunes de PHAs. Monómeros de scl-PHAs: 3-hidroxibutirato (3HB), 3-hidroxivalerato (3HV). Monómeros de mcl-PHAs: 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxioctanoato (3HO), 3-hidroxidecanoato (3HD), 3-hidroxidodecanoato (3HDD). FUENTE: (G.-Q. Chen, 2010).	22
Figura 10. Estructura química de los homopolímeros de PHA más comunes: polihidroxibutirato (PHB) y polihidroxivalerato (PHV), y el copolímero de PHA más común: polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV). FUENTE: (Gilbert, 2016).	22
Figura 11. Aplicaciones de los PHA. FUENTE: (G.-Q. Chen, 2010; Tan et al., 2017).	24

Figura 12. Ruta I de la biosíntesis de PHB. FUENTE: Elaboración propia basado en (Gilbert, 2016).	25
Figura 13. Granos gastados de cervecería donados por la cervecería Isla Blanca Company S.A.C.	29
Figura 14. Sedimento de un lote cerveza que contiene la levadura cervecera residual, donado por la cervecería Isla Blanca Company S.A.C.....	29
Figura 15. Micrografía de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23, donada por el Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes, de la Universidad Nacional de Trujillo. (Aumento: 1000x con aceite de inmersión en microscopio Zeiss Primo Star).....	30
Figura 16. Acondicionamiento de los granos gastados de cervecería. A) Lavado con agua corriente; B) Secado; C) Granos gastados secos; D) Molido; E) Cernido; F) Conservación.	31
Figura 17. Acondicionamiento de la levadura cervecera residual. A) Centrifugación; B) Biomasa de levadura precipitada; C) Recuperación de la biomasa de levadura.	31
Figura 18. Preparación del hidrolizado de granos gastados de cervecería. A) Pesado de granos gastados acondicionados; B) Mezclado con agua y ácido sulfúrico; C) Autoclavado a 120°C por 17 minutos; D) Filtrado para separación de la fracción líquida (hidrolizado de granos gastados); E) Concentrado del hidrolizado en rotavapor; F) Neutralización del hidrolizado; G) Centrifugación del hidrolizado para remoción de precipitados; H) Filtración para remoción de partículas remanentes; I) Aspecto final del hidrolizado.....	33
Figura 19. Preparación del extracto de levadura cervecera residual. A) Biomasa de levadura húmeda; B) Autoclavado de biomasa resuspendida en agua; C) Enfriado en baño frío; D) Centrifugado para remoción de sólidos y recuperación del sobrenadante (extracto de levadura); E) Autoclavado del extracto de levadura; F) Enfriado en baño frío; G) Concentrado en rotavapor; H) Liofilizado; I) Aspecto final del extracto de levadura en seco.	34
Figura 20. Reactivación de cepa <i>Bacillus</i> sp. B23. A) Vial con cepa conservada a 4°C; B) Cultivo en caldo nutritivo; C) Incubación a 30°C; D) Vial con cepa incubada por 24 horas, listo para su uso o conservación.....	35
Figura 21. A) Preparación del inóculo de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23 en medio definido M. B) Inóculo al final de la incubación.....	36
Figura 22. A) Preparación del inóculo de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23 en medio complejo H+EL. B) Incubación de inóculo a 200 rpm y 30°C.	36

Figura 23. A) Preparación de medio de cultivo M. B) Matraces de cinética en incubación a 200 rpm y 30°C.....	37
Figura 24. A) Inoculación de cultivos para la cinética en medio complejo. B) Incubación de matraces de cinética en medio complejo H+EL. C) Matraces de cinética después de incubación.....	38
Figura 25. A) Soluciones concentradas para la preparación del medio complejo "H + EL" del inóculo. B) Preparación del inóculo. C) Inóculo a al finalizar la incubación.....	40
Figura 26. A) Preparación de los matraces para la fermentación del diseño experimental. B) Inoculación de los matraces. C) Incubación a 200 rpm y 30°C. D) Matraces luego de la incubación.....	41
Figura 27. Cinética de la cepa Bacillus sp. B23 en medio definido M.	46
Figura 28. Cinética cepa Bacillus sp. B23 en el medio H + EL	51
Figura 29. Comparación de la biomasa y el %PHB alcanzados en los medios de cultivo H y H + EL.	52
Figura 30. Gráfica de Pareto para el contenido de PHB (% PHB). (L): lineal, (Q): cuadrático. 1Lby2L: interacción lineal. Gráficos obtenidos con Statistica v8.0.	58
Figura 31. Gráfica de Pareto para la productividad de PHB (Q_{PHB}). (L): lineal, (Q): cuadrático. 1Lby2L: interacción lineal. Gráficos obtenidos con Statistica v8.0.	58
Figura 32. (A) Gráfico de superficie de respuesta y (B) gráfico de contorno para la productividad (Q_{PHB}) en función de la concentración inicial de azúcares reductores y concentración inicial de extracto de levadura (Gráficos realizados con el software Statistica v 8.0).	67
Figura 33. (A) Gráfico de superficie de respuesta y (B) gráfico de contorno para el contenido de PHB (%PHB) en función de la concentración inicial de azúcares reductores y concentración inicial de extracto de levadura (Gráficos realizados con el software Statistica v 8.0).	68
Figura 34. A) Pesado de muestra y B) Secado en horno de convección a 105°C.....	91
Figura 35. A) Equipo Soxhlet, B) Rotavapor C) Enfriador de agua acoplado a Soxhlet y rotavapor.....	93
Figura 36. A) Muestras de afrecho con ácido acético y clorito de sodio. B) Incubación de las muestras en Baño María por 24 horas. C) Muestras después de 24 horas de incubación. D) Lavada de la holocelulosa. E) Muestra de afrecho original (arriba) y muestra después del tratamiento (holocelulosa blanca) (abajo).	94

Figura 37. A) Muestra de holocelulosa blanca. B) Agitación de la muestra con dispersor de pulpa. C) Filtración de la suspensión.....	95
Figura 38. A) Muestra del filtrado con $K_2Cr_2O_7$ 0.5 N y H_2SO_4 cc. B) Adición de ferroína a la solución. C) Muestras después de titulación con FAS.....	95
Figura 39. A) Incubación de muestras en Baño María. B) Centrifugación. C) Muestras después de la titulación con FAS.....	96
Figura 40. A) Muestras analizadas para azúcares reductores por el método de DNS. B) Espectrofotómetro UV-Vis empleado en la lectura de absorbancia.....	98
Figura 41. Curvas de calibración de azúcares reductores. A) Curva 1. B) Curva 2.	99
Figura 42. A) Glicemia enzimática AA líquida, utilizada para la cuantificación de glucosa. B) Espectrofotómetro UV-Vis.....	100
Figura 43. Curva de calibración de glucosa por el método con glicemia enzimática AA líquida Wiener Lab.	100
Figura 44. Implementos y kit para realizar el test de nitrógeno total.	101
Figura 45. Implementos y kit para el test de amonio.	102
Figura 46. Curva de calibración de furfural.	104
Figura 47. Curva de calibración de HMF.....	105
Figura 48. (a) Estufa utilizada para secar la biomasa colocada en los crisoles. (b) Pesado de los crisoles con la biomasa seca.....	106
Figura 49. Curva de calibración de Biomasa (g/L) de la cepa <i>Bacillus</i> sp. B23	106
Figura 50. (a) Muestras pesadas de biomasa en tubos Eppendorf. (b) Aspecto inicial de las muestras con H_2SO_4 cc antes de la digestión a $90^\circ C$. (c) Digestión de muestras a $90^\circ C$. (d) Aspecto final de la muestra digestada.....	107
Figura 51. Curva de calibración de ácido crotónico.....	108
Figura 52. Correlación entre C/N y %PHB. Encerrado en una elipse están los ensayos realizados a concentración de azúcares reductores ≥ 20 g/L.....	111
Figura 53. Perfil de Valores predichos y Deseabilidad. En cuadrados azules están los valores predichos para las respuestas, y en cuadrados rojos los valores de las variables independientes que optimizan la producción.....	121
Figura 54. Cromatograma de azúcares en el hidrolizado de granos gastados de cervecería, diluido 1:3. 1. Xilosa. 2.Arabinosa. 3.Fructosa. 4.Glucosa. 5.Celobiosa	122
Figura 55. Cromatogramas superpuestos de muestras de sobrenadante de la cinética en medio complejo H + EL. Las flechas indican los azúcares para mayor claridad: 1. Glucosa, 2. Xilosa y 3. Arabinosa.	123

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Caracterización de granos gastados de cervecería.....	91
1.1. Determinación de Sólidos Totales y Humedad (NREL & MRI, 1998)	91
1.2. Determinación de extractivos en biomasa (NREL & MRI, 1998).....	92
1.3. Metodología para determinación de holocelulosa en biomasa (Rowell, Young, & Rowell, 1996).....	93
ANEXO 2: Protocolos de análisis y curvas de calibración	97
2.1. Determinación de azúcares reductores por método DNS según (Adney & Baker, 2008) 97	
2.2. Determinación de glucosa por kit enzimático (Wiener Lab, 2000)	99
2.3. Metodología para cuantificación de nitrógeno total por el Test 0-83 Nanocolor® Nitrogen Total TN _b 22 (MACHEREY-NAGEL, 2016)	100
2.4. Cuantificación de amonio con el Test 0-03 Nanocolor® Amonio 3 (MACHEREY-NAGEL, 2019).....	101
2.5. Cuantificación de furfural e hidroximetilfurfural por HPLC (Li et al., 2017)102	
2.6. Cuantificación de Biomasa por Peso Seco.....	105
2.7. Cuantificación de ácido crotonico (PHB derivatizado) por HPLC.....	106
ANEXO 3: Medio de cultivo y cálculo de razón C/N	109
3.1. Composición del medio de cultivo definido “medio M”	109
3.2. Cálculo de la razón C/N (mol/mol) del medio de cultivo	109
ANEXO 4: Datos de gráficos y análisis de muestras	112
4.1. Datos de cuantificación de biomasa por peso seco	112
4.2. Datos de gráfica de cinética en medio complejo H + EL	114
4.3. Datos de cuantificación de azúcares reductores por método DNS	114
4.4. Datos de cuantificación de glucosa.....	115
4.5. Datos de cuantificación de nitrógeno total.....	116
4.6. Datos de cuantificación de PHB	117
ANEXO 5: Análisis estadístico y pruebas estadísticas	119
5.1. Cuadros de Efectos Estimados.....	119
5.2. Cuadros de ANOVA	120
5.3. Prueba de Deseabilidad.....	121
ANEXO 6: Cromatogramas.....	122
6.1. Cromatograma de azúcares en hidrolizado	122
6.2. Cromatograma de consumo de azúcares en hidrolizado.....	123

ANEXO 7: Cálculos de biomasa teórica esperada	124
7.1. Cálculo de la biomasa teórica esperada para el medio M.....	124
7.2. Cálculo de la biomasa teórica esperada para el medio H.....	127
7.3. Cálculo de la biomasa teórica esperada para el medio H + EL	128
7.4. Cálculo de la biomasa teórica esperada para los ensayos de optimización ...	128

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones iniciales de azúcares reductores y extracto de levadura en la producción de polihidroxibutirato por *Bacillus* sp. B23 a partir de residuos de la cervecería. El medio de cultivo se elaboró a partir de los granos gastados de cervecería y la levadura cervecera residual, provenientes del proceso de elaboración de cerveza de la empresa Isla Blanca Company S.A.C (Nuevo Chimbote, Áncash). Se utilizó un diseño experimental compuesto central rotatable para estudiar el efecto de las variables sobre la producción de PHB y optimizar la productividad volumétrica y el contenido de PHB del microorganismo empleando los sustratos residuales de cervecería como única fuente de nutrientes. Los ensayos permitieron establecer las concentraciones iniciales óptimas de azúcares reductores (34.14 g/L) y extracto de levadura (4.41 g/L) del medio de cultivo para maximizar la producción de PHB con la cepa B23. La productividad incrementó en un 31% y el contenido de PHB en un 22%, respecto a ensayos no optimizados. La productividad y el contenido de PHB alcanzada a las 24 horas de cultivo por lote fue de 0.1245 g/L.h y 55.18%, respectivamente. Adicionalmente se determinó que la cinética de producción de PHB de la cepa B23 está asociada al crecimiento. Este trabajo demuestra el potencial para la producción de PHB con *Bacillus* sp. B23 a partir de un hidrolizado de granos gastados de cervecería y un extracto de levadura cervecera residual.

Palabras clave: biopolímero, *Bacillus*, PHA, granos gastados de cervecería, extracto de levadura, optimización, superficie de respuesta, diseño central compuesto rotatable

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of different initial concentrations of reducing sugars and yeast extract on the production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* sp. B23 from brewery waste. The culture medium was made from spent brewery grains and residual brewer's yeast, from the brewing process of Isla Blanca Company S.A.C (Nuevo Chimbote, Áncash). A rotatable central composite experimental design was used to study the effect of the variables on PHB production and optimize the volumetric productivity and PHB content of the microorganism using residual brewery substrates as the sole source of nutrients. The tests allowed to establish the optimal initial concentrations of reducing sugars (34.14 g / L) and yeast extract (4.41 g / L) of the culture medium to maximize the production of PHB with strain B23. Productivity increased by 31% and PHB content by 22%, compared to non-optimized trials. The productivity and PHB content reached at 24 hours of batch cultivation was 0.1245 g / L.h and 55.18%, respectively. Additionally, it was determined that the PHB production kinetics of strain B23 is associated with growth. This work demonstrates the potential for the production of PHB with *Bacillus* sp. B23 from a spent brewery grain hydrolyzate and a residual brewer's yeast extract.

Keywords: biopolymer, *Bacillus*, PHA, spent brewery grains, yeast extract, optimization, response surface, rotatable composite core design

I. INTRODUCCIÓN

Los plásticos son polímeros que en su mayor parte se derivan de hidrocarburos fósiles (Gilbert, 2016). Estos materiales son producidos en grandes cantidades ya que son baratos, duraderos y muy versátiles; lo que ha permitido su aplicación en casi todas las áreas de la vida cotidiana. Sin embargo, la naturaleza de los plásticos tradicionales es muy resistente a la degradación química o biológica, por lo que se acumulan en vertederos, y en ambientes naturales, causando graves problemas ambientales (Geyer, Jambeck, & Law, 2017).

La búsqueda de alternativas al plástico tradicional es un área que está siendo muy investigada recientemente (Nakajima, Dijkstra, & Loos, 2017). Los esfuerzos están centrados en la producción de plásticos biodegradables a partir de recursos renovables (G. Kaur, Uisan, Ong, & Ki Lin, 2018). Entre los materiales que se han desarrollado hasta la actualidad, los polihidroxialcanoatos (PHA) se presentan como uno de los polímeros verdes del futuro, que se espera reemplacen gradualmente a los plásticos tradicionales (Kourmentza et al., 2017).

Actualmente, existen varias compañías que se dedican a la producción de PHA a escala industrial (Kourmentza et al., 2017). Sin embargo, debido a su elevado costo, la aplicación de los PHAs en mercados de demanda masiva, como la industria del empaquetado y embalaje, es muy limitada (Hartley Yee & Ray Foster, 2014). Por ahora, el mercado de aplicaciones biomédicas es de los pocos que soportan los costos de estos polímeros, ya que, además de ser biodegradables, demuestran una alta biocompatibilidad con los tejidos humanos y animales (Koller, 2018c).

Los costos de producción elevados de los PHAs están asociados principalmente al uso de materias primas de alta pureza como fuente de carbono y otros nutrientes, contribuyendo hasta en un 50% de los costos del proceso (Koller & Braunegg, 2018). En este aspecto, el empleo de materias primas residuales, baratas y abundantes, es una alternativa potencial que puede ayudar a reducir ampliamente el costo de estos biopolímeros, y así, aumentar su competitividad frente a los plásticos tradicionales (G. Kaur, 2015).

Las industrias agrícolas y alimentarias son una fuente abundante de residuos orgánicos ricos en nutrientes. Sin embargo, la mayor parte de estos termina en vertederos

municipales, plantas de tratamiento de aguas o son usados como alimento para animales (Nielsen, Rahman, Rehman, Walsh, & Miller, 2017). Con la creciente disponibilidad de estos recursos, y la necesidad por disminuir los costos de producción de los PHAs, se están realizando numerosos esfuerzos para utilizarlos en el desarrollo de procesos de producción de PHAs sostenibles y eficientes (Pakalapati, Chang, Show, Arumugasamy, & Lan, 2018; Rodriguez-Perez, Serrano, Pantión, & Alonso-Fariñas, 2018).

Entra las actividades fermentativas más antiguas, la elaboración de cerveza, ha trascendido hasta convertirse en una prolifera industria de consumo masivo. Durante la producción de cerveza se generan principalmente tres residuos: los granos gastados, los lúpulos gastados, y la levadura cervecera residual (Mussatto, 2009). Al tener una gran demanda a escala global, la industria cervecera produce cantidades significativas de estos subproductos. En el Perú, la producción de cerveza supera los 1.4 millones de litros anuales (Backus, 2017), lo que resulta en la generación de aprox. 280 mil kg de granos gastados, y 28 mil kg de levadura residual (Mathias, de Aguiar, Silva, de Mello, & Sérvulo, 2017; Mussatto, Dragone, & Roberto, 2006). Sin embargo, el uso de los subproductos de cervecería para aplicaciones de alto valor sigue siendo limitado, ya que básicamente se venden como insumo para alimento de animales (Backus, 2011; Ferreira, Pinho, Vieira, & Tavarela, 2010).

Para aprovechar eficientemente los subproductos de la industria cervecera para la producción de PHAs, es necesaria la aplicación de microorganismos productores capaces de metabolizar una mayor diversidad de azúcares (pentosas y hexosas) y que puedan utilizar las proteínas presentes en la materia prima (mediante la producción de proteasas, por ejemplo). Si a esto se suma el uso de microorganismos capaces de acumular PHA durante su crecimiento, se podría lograr el desarrollo de estrategias adecuadas para la transformación de los subproductos cerveceros en bioplásticos de forma eficiente y económicamente viable. En este sentido, el uso de bacterias del género *Bacillus* es muy atractivo.

Las bacterias del género *Bacillus* fueron los primeros microorganismos en los que se descubrió la acumulación de polihidroxibutirato (PHB), el PHA más común y el más estudiado. Además de ser muy estables genéticamente, y tener tasas de crecimiento más altas que otras bacterias, las especies de *Bacillus* son ventajosas al momento de producir PHAs porque carecen de lipopéptidos en su membrana celular, lo que facilita los procesos

de extracción y purificación de estos biopolímeros (Mohapatra, Maity, et al., 2017). Adicionalmente, estos microorganismos pueden producir copolímeros de PHAs a partir de sustratos simples, baratos y diversos en estructura (Valappil, Boccaccini, Bucke, & Roy, 2007). Estas y otras cualidades han sido reconocidas por muchos investigadores, que ya vienen evaluando el uso de diversas cepas de *Bacillus* como productoras de PHAs a partir de numerosos residuos agroindustriales (Krueger & Radetski, 2012; Ramadas, Singh, Soccol, & Pandey, 2009; Santimano, Prabhu, & Garg, 2009; Halami, 2008). Gracias a su amplia capacidad para metabolizar diversos azúcares y producir múltiples enzimas extracelulares, se deberían explorar como candidatos para la producción de PHA a partir de los subproductos de cervecería.

En procesos para la producción de PHA a partir de residuos agroindustriales con cepas de *Bacillus*, se han reportado concentraciones iniciales variables de azúcares presentes en los hidrolizados (Sindhu, Silviya, Binod, & Pandey, 2013), y se han propuesto diferentes concentraciones de extracto de levadura como suplemento de nitrógeno y otros nutrientes (Hamieh, Olama, & Holail, 2013; Ramadas et al., 2009; Sukan, Roy, & Keshavarz, 2014). Generalmente se suelen obtener mayores niveles de acumulación de PHB en las células a proporciones de carbono/nitrógeno elevadas en el medio de cultivo (Singh Saharan, Grewal, & Kumar, 2014). Sin embargo, proporciones muy altas suelen generar inhibición en los microorganismos, mientras que proporciones muy bajas también podrían afectar las condiciones fisiológicas de los mismos y reducir su producción (Wei et al., 2011).

Por tanto, es necesario evaluar diferentes concentraciones de la fuente de carbono (azúcares reductores del hidrolizado) y nitrógeno (extracto de levadura cervecera residual) como parte del medio de cultivo para la producción de PHB y más precisamente, evaluar el efecto que tienen sobre la productividad y el contenido de PHB. Algunos autores han demostrado mediante análisis de procesos y evaluaciones económicas, que la productividad y el contenido de PHB son dos de los parámetros más importantes que afectan el precio del PHB (Choi & Lee, 1997). De esta forma se podrá planificar un uso eficiente y racional de los subproductos de cervecería, y desarrollar estrategias para su máximo aprovechamiento en la producción de polihidroxialcanoatos.

En base a lo anteriormente mencionado, en este trabajo de investigación se emplearon granos gastados de cervecería y levadura cervecera residual para la elaboración y optimización de un medio de producción de polihidroxibutirato (PHB) empleando un cultivo de *Bacillus* sp. nativo, aislado en un estudio previo.

1.1. Problema

¿Cuál es el efecto de diferentes concentraciones iniciales de azúcares reductores (5.86, 10, 20, 30 y 34.14 g/L) y extracto de levadura (0.17, 1, 3, 5 y 5.83 g/L) en la producción de PHB por *Bacillus* sp. B23 a partir de un hidrolizado de granos gastados de cervecería y levadura cervecera residual?

1.2. Hipótesis

La producción de PHB de la cepa *Bacillus* sp. B23 en un medio de cultivo derivado de residuos de la cervecería será máxima si contiene alrededor de 30 g/L de azúcares reductores y 5 g/L de extracto de levadura.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones iniciales de azúcares reductores (5.86, 10, 20, 30 y 34.14 g/L) y extracto de levadura (0.17, 1, 3, 5 y 5.83 g/L) en la producción de polihidroxibutirato por *Bacillus* sp. B23 a partir de un hidrolizado de granos gastados de cervecería suplementado con extracto de levadura cervecera residual.

1.3.2. Objetivos específicos

- Identificar el tipo de cinética de producción de PHB (asociada o no al crecimiento) de *Bacillus* sp. B23;
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones iniciales de azúcares reductores y extracto de levadura en la productividad volumétrica de PHB (g de PHB /L.h) y el contenido de PHB (g de PHB * 100% /g de biomasa total) de *Bacillus* sp. B23 mediante un diseño experimental compuesto central rotatorio; y
- Establecer las concentraciones iniciales óptimas de azúcares reductores y extracto de levadura para la producción de PHB por *Bacillus* sp. B23 a partir de un hidrolizado de granos gastados de cervecería y levadura cervecera residual.

1.4. Justificación

La producción de bioplásticos es una prioridad en una época de crisis ambiental y gran demanda de materiales como la que se vive actualmente. En este sentido, el uso de residuos de la cervecería podría ser una alternativa atractiva para promover la producción de bioplásticos PHA en el Perú, a la vez que se revalorizan los subproductos de la industria cervecera con un valor biotecnológico. La evaluación de un medio de cultivo derivado de granos gastados y levadura cervecera residual permitirá desarrollar estrategias adecuadas para el uso eficiente de estos subproductos en la producción de PHAs. Además, permitirá redirigir la atención hacia nuevas aplicaciones biotecnológicas que empleen estos residuos, como la producción de enzimas, u otros metabolitos según los microorganismos empleados, poniendo en práctica el concepto de biorrefinerías, base de la industria biotecnológica del futuro. Por estos motivos, la presente tesis busca aprovechar los residuos de cervecería como materia prima para investigar la producción de bioplástico.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Biomasa Lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es el recurso natural renovable más abundante en el planeta. Este material se deriva de las paredes celulares de las plantas; siendo producido a partir de CO₂ atmosférico, agua y luz solar mediante la fotosíntesis biológica (Zhou, Xia, Lin, Tong, & Beltramini, 2011). La biomasa lignocelulósica engloba a los residuos agroindustriales, forestales, así como cultivos herbáceos y leñosos (Obruca, 2015).

La biomasa lignocelulósica se considera un recurso con una huella de carbono neutral, lo que la convierte en una alternativa para limitar el consumo de recursos fósiles no renovables como el petróleo, ayudando a reducir las emisiones de CO₂ y la contaminación de la atmósfera (Isikgor & Becer, 2015; Zhou et al., 2011).

Debido a su abundancia, la biomasa lignocelulósica tiene el potencial de ser un sustrato renovable para la generación de una amplia variedad de productos biotecnológicos, químicos finos y otros productos industriales de uso masivo, como polímeros o combustibles (Hausman, Strauss, Ertan, & Siddiqui, 2016; Isikgor & Becer, 2015). Sin embargo, lograr esto de una forma económicamente viable continúa siendo un desafío.

La lignocelulosa ha evolucionado para ser resistente a la degradación química o biológica. Esta propiedad es una consecuencia de su composición y estructura compleja (Isikgor & Becer, 2015). En general, la pared celular de las plantas varía en su composición de acuerdo al material biológico de origen, pero los principales polímeros que lo conforman son: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (H. Chen, 2014; Obruca, 2015).

2.2. Celulosa

El principal componente de la biomasa lignocelulósica es la celulosa. La celulosa es un polisacárido con una cadena lineal de glucosas unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos (Hausman et al., 2016). Tiene la fórmula general $(C_6H_{12}O_5)_n$ y la unidad que se repite en sus cadenas es el disacárido celobiosa (Zhou et al., 2011). Las cadenas de este polisacárido son largas y sin prolongaciones laterales, lo que permite que se empaqueten fuertemente mediante interacciones de van der Waals y enlaces de hidrógeno, creando microfibras cristalinas insolubles (Hausman et al., 2016). Además de regiones cristalinas (ordenadas), la celulosa también contiene regiones amorfas (desordenadas) (Hausman

et al., 2016). La alta cristalinidad de este material le proporciona rigidez y soporte a la pared de las células. Esta propiedad también dificulta su degradación biológica y química, por lo que se requieren pre tratamientos previos a su hidrólisis, para aumentar los rendimientos de obtención de azúcares (H. Chen, 2014).

2.3. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante. A diferencia de la celulosa, que consiste solo de unidades de glucosa, la hemicelulosa es un polímero compuesto de dos o más monosacáridos, entre ellos, xilosa, glucosa, manosa, arabinosa, galactosa y sus derivados (H. Chen, 2014). Las cadenas de la hemicelulosa son heterogéneas, aleatorias, con cadenas laterales y en consecuencia la estructura del polímero es amorfa (Isikgor & Becer, 2015). La hemicelulosa forma una compleja red de enlaces con la lignina y la celulosa que le otorga mayor fortaleza a las paredes celulares de las plantas (Isikgor & Becer, 2015).

2.4. Lignina

La lignina es un polímero conformado por unidades de fenilpropano, enlazadas aleatoriamente y de manera no lineal (H. Chen, 2014). En consecuencia, la lignina posee una estructura tridimensional compleja (Isikgor & Becer, 2015). Este polímero se encuentra unido con la celulosa y la hemicelulosa, formando un complejo estable lignina-carbohidrato (H. Chen, 2014).

En las paredes celulares, la celulosa constituye un esqueleto en forma de microfibrillas, mientras que la lignina y la hemicelulosa, unidas mediante enlaces covalentes, envuelven estas microfibrillas (H. Chen, 2014) (Fig. 1).

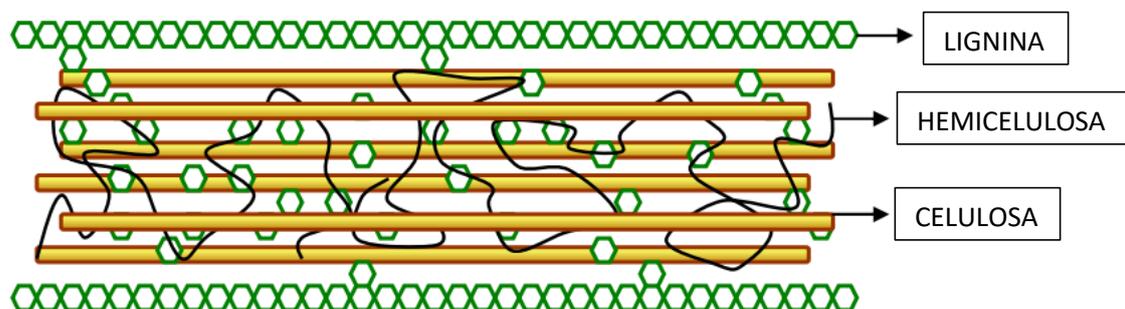


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la lignocelulosa. FUENTE: (Mussatto & Teixeira, 2010).

2.5. Hidrólisis de Materiales Lignocelulósicos

La obtención de azúcares a partir de los materiales lignocelulósicos puede involucrar tratamientos físicos, químicos, biológicos y/o enzimáticos (Verardi, De, Ricca, & Calabr, 2012). Entre estos, el método más empleado es la hidrólisis química usando ácidos.

2.5.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida de celulosa y hemicelulosa se realiza con ácidos concentrados o diluidos. Estos ácidos catalizan la ruptura de las cadenas de los polisacáridos para formar oligosacáridos de cadena más corta y monosacáridos (Obruca, 2015). Los ácidos más utilizados en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica son el ácido sulfúrico y el ácido clorhídrico (Obruca, 2015; Verardi et al., 2012). La hidrólisis ácida tiene la principal ventaja de poder penetrar la lignina sin necesidad de pre tratamientos a la biomasa; además, es más rápida que una hidrólisis enzimática (Obruca, 2015; Verardi et al., 2012).

En los procesos de hidrólisis con ácidos concentrados, la concentración del ácido suele estar entre 10-30%. El proceso se realiza a bajas temperaturas, produciendo altos rendimientos de hidrólisis de celulosa. Sin embargo, la gran cantidad de ácido empleado puede causar corrosión en los equipos (Verardi et al., 2012).

La principal ventaja de los procesos de hidrólisis con ácidos diluidos es la baja concentración de ácido requerida (2-5%). Sin embargo, el proceso se realiza a temperaturas altas para acelerar la catálisis y obtener rendimientos aceptables (Verardi et al., 2012). Temperaturas muy elevadas pueden generar la descomposición de azúcares, lo que resulta en la formación de compuestos tóxicos (furfurales e hidroximetilfurfurales) que pueden ser inhibidores para la fermentación de los azúcares en procesos biotecnológicos (Mussatto & Roberto, 2005; Obruca, 2015; Verardi et al., 2012). El producto final de la hidrólisis se denomina hidrolizado y contiene azúcares (principalmente) y otros compuestos en solución. El hidrolizado generalmente necesita ser neutralizado con una base y además, ser suplementado con otros compuestos como sales, metales, etc., para su uso en fermentaciones (Mussatto & Roberto, 2008).

2.5.2. Azúcares Reductores

Gran parte de los azúcares producidos durante la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica son azúcares reductores, como la glucosa, xilosa y arabinosa. De hecho, todos los monosacáridos son azúcares reductores. Los azúcares reductores son aquellos que poseen un grupo aldehído o cetona libre en sus átomos de carbono anoméricos (Fig. 2), lo que les permite actuar como compuestos reductores en reacciones como la prueba de Tollens, la prueba de Fehling y la prueba de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Ahluwalia & Raghav, 1997).

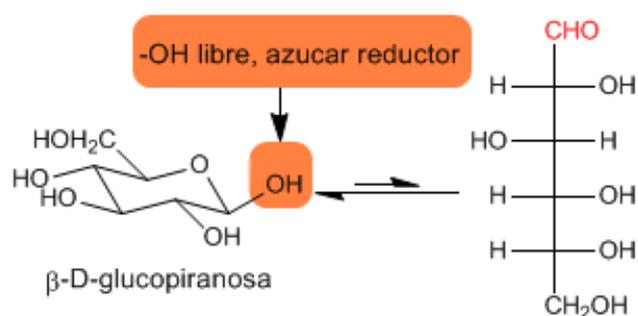


Figura 2. Representación de la estructura de la glucosa (β-D-glucopiranososa), un azúcar reductor. FUENTE: <https://www.quimicaorganica.org>

2.6. Residuos Agroindustriales

Los residuos agroindustriales son generados por el procesamiento industrial de productos agrícolas o animales (Mussatto, Ballesteros, Martins, & Teixeira, 2012). Los derivados de actividades agrícolas incluyen materiales como paja, tallos, hojas, cáscaras, semillas, pulpa o rastrojo de frutas, legumbres o cereales (arroz, trigo, maíz, sorgo, cebada...), bagazos generados a partir de la molienda de caña de azúcar, granos de café gastados, granos gastados de la cerveza y muchos otros (Mussatto et al., 2012). Debido a su abundancia, su disposición suele generar problemas ambientales, y llegan a ocupar espacio significativo en vertederos municipales, a la vez que requieren una inversión de energía en su procesamiento y transporte (Mussatto et al., 2012; Nielsen et al., 2017).

Los residuos agroindustriales poseen un alto contenido de lignocelulosa en su biomasa, son baratos, y generalmente están disponibles en grandes cantidades durante todo el año. Estos materiales generalmente son poco valorizados, sin embargo, están atrayendo mucha atención por ser considerados un recurso renovable barato y disponible para la producción de compuestos químicos, materiales y biocombustibles (Vandamme, 2009).

2.6.1. Residuos de la Industria Cervecera

Como parte del proceso de producción de cerveza, se generan tres residuos principales: los granos gastados de cervecería, la levadura cervecera residual y los lúpulos gastados (Mussatto, 2009) (Fig. 3). Entre estos, los granos gastados y la levadura residual se encuentran en mayores cantidades. En el Perú, la producción de cerveza supera los 1.4 millones de litros anuales (Backus, 2017), generándose entre 14 y 20 kg de granos gastados, y entre 1.5 a 3 kg de levadura residual por hectolitro (Mathias et al., 2017). Sin embargo, el uso de los subproductos de cervecería para aplicaciones de alto valor sigue siendo limitado, ya que se suelen vender como alimento para animales (Backus, 2011; Ferreira et al., 2010).

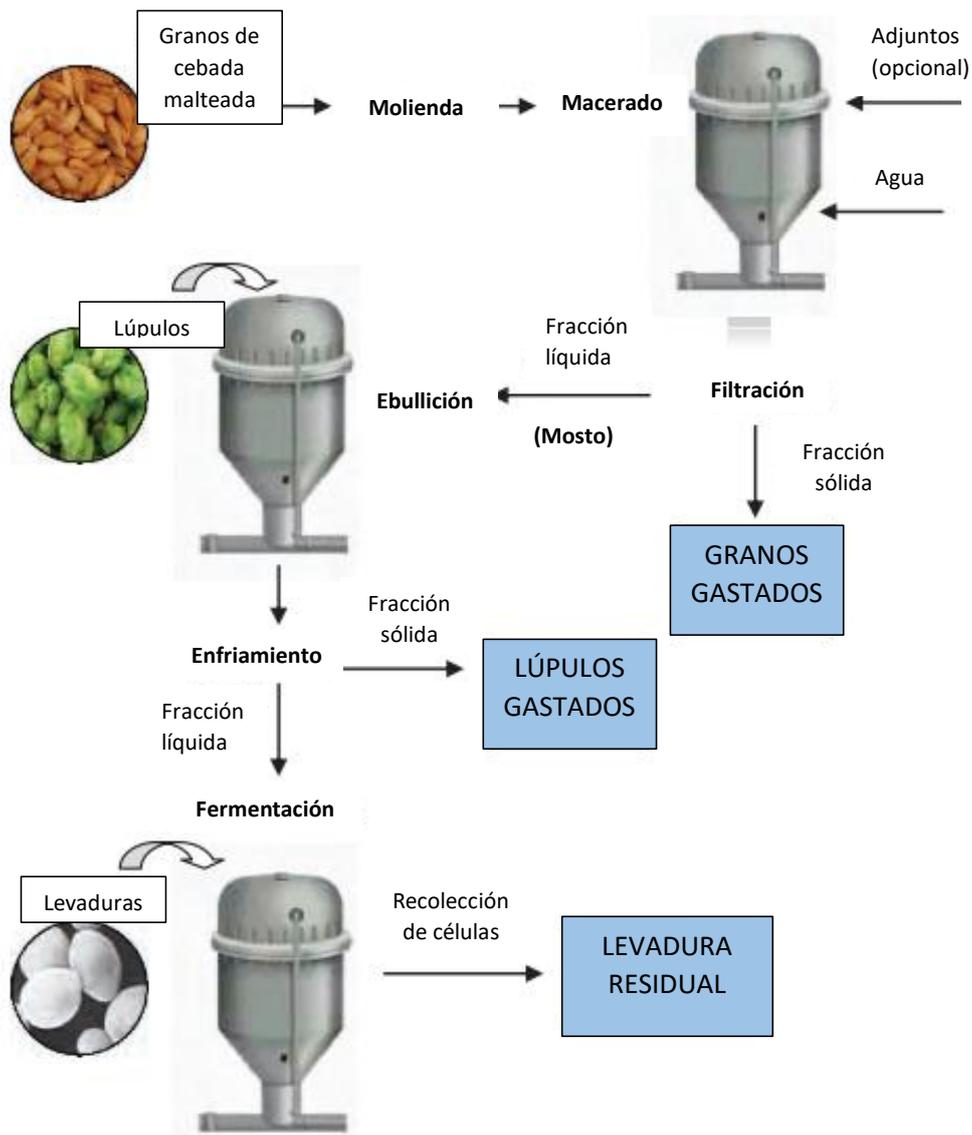


Figura 3. Representación del proceso de producción de cerveza y los puntos del proceso donde se generan los principales residuos. FUENTE: (Mussatto, 2009).

2.6.1.1. Granos Gastados de Cervecería

Los granos gastados de cerveza (Fig. 4) son el principal residuo generado durante el proceso de producción de cerveza, representando hasta el 85% del total de los residuos (Mussatto, 2009). Se estima que se producen entre 14 a 20 kg de granos gastados de cerveza por cada 100 L de cerveza producida (Mathias et al., 2017). Por ahora, la mayoría de los granos gastados de cerveza es usado como alimento para animales (Backus, 2011), por lo que urge aprovecharlos para la obtención de productos de alto valor (Mussatto, 2009). Otras aplicaciones de los granos gastados de cerveza se enfocan en la producción de energía (pirólisis, combustión, producción de carbón, biogás y etanol) y en procesos químicos (extracción de compuestos de alto valor, pulpa para producción de papel, materiales adsorbentes) y biotecnológicos (sustrato para fermentaciones y producción de enzimas, extracción de compuestos de valor por procesos enzimáticos e inmovilización de enzimas) (Mussatto, 2014).



Figura 4. Apariencia de los granos gastados de cerveza (A) Micrografía por microscopía electrónica de barrido de muestra de granos gastados de cerveza (B) FUENTE: (Mussatto, 2009).

2.6.1.1.1. Composición de los Granos Gastados de Cervecería

Los granos gastados de cerveza están compuestos principalmente de las cáscaras de los granos de cebada (Fig. 4). Según el régimen usado en la maceración, durante la elaboración de cerveza, pueden contener una cantidad de almidón residual, y residuos de otros cereales (Mussatto, 2009).

Los granos gastados de cerveza son principalmente materiales lignocelulósicos, están compuestos de celulosa, hemicelulosa y lignina. Casi el 50% (peso/peso) de la composición de los granos gastados de cerveza es celulosa y hemicelulosa, lo que revela la gran cantidad de azúcares presentes en la biomasa, como glucosa, xilosa y arabinosa (Mussatto, 2009). Los granos gastados de cerveza también pueden contener cantidades significativas de proteínas y aminoácidos, vitaminas, lípidos y minerales (Mussatto, 2014).

La composición química de los granos gastados de cerveza puede variar significativamente dependiendo de factores como la variedad de cebada usada, el tiempo en el que fue cosechada, y las condiciones de cultivo, así como las condiciones utilizadas durante el malteado y el macerado (Mussatto, 2009).

En el Cuadro 1 se muestran algunos análisis de la composición de los granos gastados de cerveza (Mussatto, 2014).

Cuadro 1: Composición química de los granos gastados de cerveza.

Item	(Mussatto & Roberto, 2006)	(Kanauchi et al., 2001)	(Carvalho, Esteves, Parajó, Pereira, & Gírio, 2004)	(J. P. Silva et al., 2004)	(Meneses, Martins, Teixeira, & Mussatto, 2013)	(Waters, Jacob, Titze, Arendt, & Zannini, 2012)
<i>Componentes</i>						
<i>(g/kg de materia seca)</i>						
Celulosa (glucano)	168	254	219	253	217	260
Hemicelulosa	284	218	296	419	192	222
Xilano	199	NR	206	NR	136	NR
Arabinano	85	NR	90	NR	56	NR
Lignina	278	119	217	169	194	NR
Grupos acetilo	14	NR	11	NR	NR	NR

continuación

Proteínas	153	240	246	NR	247	221
Cenizas	46	24	12	46	42	11
Extractivos	58	NR	NR	95	107	NR
<i>Minerales</i>						
<i>(mg/kg materia seca)</i>						
Silicio	10740	NR	NR	NR	NR	1400
Fósforo	5186	NR	NR	NR	6000	4600
Calcio	3515	NR	NR	NR	3600	2200
Magnesio	1958	NR	NR	NR	1900	2400
Azufre	1980	NR	NR	NR	2900	NR
Potasio	258.1	NR	NR	NR	600	700
Sodio	309.3	NR	NR	NR	137.1	100
Hierro	193.4	NR	NR	NR	154.9	100
Zinc	178.0	NR	NR	NR	82.1	100
Aluminio	36.0	NR	NR	NR	81.2	100
Manganeso	51.4	NR	NR	NR	40.9	NR
Cobalto	NR	NR	NR	NR	17.8	NR
Cobre	18.0	NR	NR	NR	11.4	NR
Estroncio	12.7	NR	NR	NR	10.4	NR
Iodo	NR	NR	NR	NR	11.0	NR
Bario	13.6	NR	NR	NR	8.6	NR
Cromo	5.9	NR	NR	NR	<0.5	NR
Molibdeno	NR	NR	NR	NR	1.4	NR
Boro	NR	NR	NR	NR	3.2	NR

NR: No reportado. FUENTE: (Mussatto, 2014).

2.6.2. Levadura Residual Cervecera

La biomasa de la levadura *Saccharomyces* es el segundo subproducto más abundante de la industria cervecera (Mussatto, 2009). En esta industria es usual el repicado de la levadura, y generalmente es reutilizada varias veces (entre 4 a 6 veces), pasándola de una fermentación para iniciar la siguiente, antes de su disposición final (Ferreira et al., 2010). La biomasa de levadura es una rica fuente de nitrógeno, de proteínas, vitaminas de complejo B, ácidos nucleicos, otras vitaminas y minerales (Ferreira et al., 2010). Productos de levadura cervecera son encontrados en forma de polvo, tabletas, o en forma

líquida. Estos productos pueden ser aplicados como suplementos en comidas, o mezclados con leche, sopas, jugos, entre otros (Ferreira et al., 2010; Podpora, Świdorski, Sadowska, Rakowska, & Wasiak-Zys, 2016). El potencial de la levadura cervecera residual como materia prima de alto valor aún no está siendo explotado por completo ya que suele venderse como aditivo nutricional para alimento de animales (Ferreira et al., 2010). Además, su disposición puede ser un problema para el ambiente. Se han realizado varios intentos por aprovechar esta materia prima como sustrato en procesos biotecnológicos, por ejemplo, en procesos fermentativos como sustrato para el cultivo de microorganismos.

Cuadro 2: Composición de la levadura cervecera residual.

Componentes	(% peso/peso)
Masa seca	92.8
Proteína cruda	44.2
Fibra cruda	1.9
Grasa cruda	3.8
Cenizas	6.5
Cenizas insolubles	0.5
Lignina	0.7
Almidón	0.9
Azúcares totales	1.7
Sales Minerales	(g/kg)
Calcio	2.8
Fósforo	12.5
Magnesio	2.2
Potasio	20.5
Sodio	1.68
Cloro	3.5
Azufre	4.2
Manganeso	31
Zinc	96
Cobre	19
Hierro	87
Selenio	0.06
Cobalto	0.5
Molibdeno	1
Iodo	1
Vitaminas y pigmentos	(mg/kg)
Vitamina E	2
Vitamina B1 tiamina	85
Vitamina B2 riboflavina	39
Vitamina B6 piridoxina	33
Vitamina B12	7
Niacina	445
Ácido pantoténico	110
Ácido Fólico	10
Biotina	1
Colina	3316

FUENTE: www.feedtables.com

2.6.2.1.Extracto de Levadura

El extracto de levadura es un producto procesado derivado de la biomasa de las levaduras, que comprende los componentes solubles de las células (Zarei, Dastmalchi, & Hamzeh-Mivehroud, 2016). Los extractos de levadura pueden ser producidos por la degradación de la pared celular de las levaduras usando enzimas endógenas o exógenas (Podpora et al., 2016). También pueden ser preparados por hidrólisis ácida o enzimática y se suele denominar al producto como “hidrolizado de levadura” (Podpora et al., 2016). Independientemente del método empleado, el extracto de levadura es básicamente el contenido nutritivo de las células (Zarei et al., 2016). Este producto es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como saborizante, aditivo nutricional o suplemento vitamínico (Zarei et al., 2016).

Debido a su composición rica en nutrientes, el uso del extracto de levadura es de interés en la elaboración de medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos y producción de metabolitos como ácido láctico, etanol, ácido succínico, etc. (Ferreira et al., 2010). El extracto de levadura también se ha utilizado como suplemento nutricional y fuente de nitrógeno orgánica en muchos estudios para la producción de PHA (Babruwad, Prabhu, Upadhyaya, & Hungund, 2015; Getachew & Woldeesenbet, 2016; Page, 1992a; Quillaguamán, Muñoz, Mattiasson, & Hatti-kaul, 2007).

2.7. Plásticos

La ISO 472 (“Plásticos –Vocabulario”) define a “plástico” de la siguiente manera: un material que contiene como ingrediente esencial un polímero y que en alguna etapa de su procesamiento hasta productos terminados puede ser moldeado por flujo (Simpson, 1995).

Los plásticos pertenecen a una familia química denominada polímeros (Gilbert, 2016). El término polímero significa “hecho de muchas unidades”. Las pequeñas moléculas utilizadas para formar un polímero se denominan monómeros. Estos monómeros pueden ser de uno o más tipos. Para fines prácticos los polímeros pueden definirse como grandes moléculas orgánicas construidas por repetición de estas unidades químicas (Gilbert, 2016), que pueden ser de origen fósil o natural (Plastics Europe, 2017).

Los plásticos no son un solo tipo de material; son una gran familia de cientos de materiales diferentes con una amplia variedad de propiedades (Plastics Europe, 2017). Por sus características y versatilidad son uno de los materiales más utilizados en el mundo.

2.7.1. Clasificación

Los plásticos se pueden clasificar en categorías según diferentes criterios. Según su origen, pueden clasificarse como: 1) Bioplásticos, aquellos derivados de origen biológico (Plastics Europe, 2017). Por ejemplo, derivados de la celulosa, almidón, o monómeros producidos por microorganismos, etc. (Gilbert, 2016); 2) Plásticos sintéticos, aquellos plásticos derivados del petróleo u otras fuentes no renovables (Gilbert, 2016).

Según su comportamiento frente al calor, estos pueden ser: 1) termoplásticos, una familia de plásticos que pueden ser fundidos cuando se calientan y se endurecen cuando se enfrían, pero de forma reversible, por lo que pueden ser recalentados, remodelados y enfriados repetidamente (Plastics Europe, 2017); 2) termocompuestos son una familia de plásticos que cambian químicamente cuando se calientan, creando una red tridimensional. Una vez calentados y formados, no pueden ser refundidos para su remodelación (Plastics Europe, 2017). En el Cuadro 3 se indican algunos ejemplos.

Según su biodegradabilidad, pueden clasificarse como: 1) No biodegradables, 2) parcialmente biodegradables y 3) completamente biodegradables. El término biodegradabilidad generalmente se refiere a un material que puede ser degradado relativamente rápido por agentes biológicos en un ambiente bioactivo (Gilbert, 2016).

Cuadro 3. Ejemplos de materiales plásticos pertenecientes al grupo de termoplásticos y termocompuestos.

Termoplásticos	Termocompuestos
<ul style="list-style-type: none"> • Poli teraftalato de etileno (PET), • Polipropileno (PP), • Poliestireno (PS), • Polietileno (PE), • Poliestireno expandido (PS-E), • Policloruro de vinilo (PVC), • Polimetacrilato de metilo (PMMA), • Poliamidas (PA), • Elastómeros termoplásticos (TPE), • Fluoropolímeros, • Poliarilsulfonato (PSU), • Policarbonato (PC), etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Poliuretano, • Resinas Epoxi, • Poliéster insaturado, • Resinas Acrílicas, • Ester de vinilo, • Urea-formaldehído, • Fenol-formaldehído, • Silicona, • Resinas fenólicas, • Resinas de melamina, • etc.

FUENTE: (Plastics Europe, 2017)

2.7.2. Bioplásticos

Se consideran bioplásticos a los plásticos que son de origen biológico o que son biodegradables, o que poseen ambas características (European Bioplastics, 2017).

Algunos bioplásticos son derivados de polisacáridos de origen vegetal como el almidón, o la celulosa, mientras otros tienen un origen microbiano. En este último caso, los microorganismos son alimentados con materiales biológicos simples como azúcares, ácidos grasos, proteínas, entre otros, y pueden convertirlos en varios monómeros con los cuales se pueden producir polímeros con características muy similares a los plásticos convencionales (Fig. 5). Los bioplásticos sintetizados a partir de estos monómeros, suelen ser fácilmente biodegradables y pueden ser transformados en dióxido de carbono, agua y materia orgánica por gran variedad de organismos (Nehra, Jamdagni, & Lathwal, 2017).

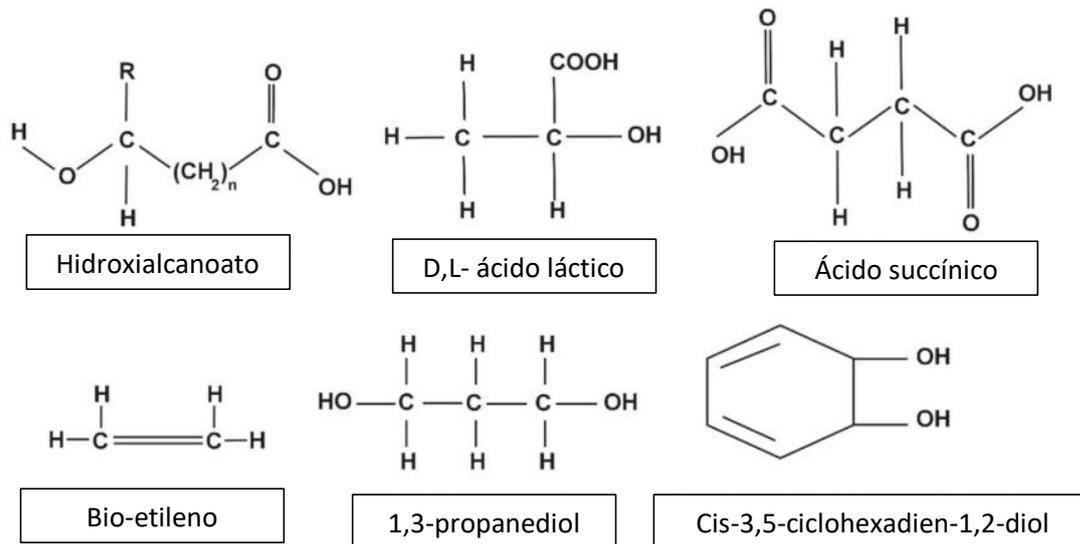


Figura 5. Bloques de construcción moleculares más comunes de los biopolímeros, todos producidos naturalmente por fermentación bacteriana. FUENTE: (Raza *et al.*, 2018)

El que un bioplástico sea de origen biológico, no implica necesariamente que sea biodegradable; la biodegradabilidad es una propiedad inherente de un material y no es lo mismo a ser de base biológica (European Bioplastics, 2017; L. Kaur, Khajuria, Parihar, & Singh, 2017). Un material puede ser de origen fósil y ser biodegradable, mientras que un bioplástico de origen biológico puede no ser biodegradable. Por ejemplo, el etileno empleado para la producción del polietileno puede tener origen biológico (etanol de caña de azúcar) u origen fósil (derivado del petróleo), y el producto final es un plástico no biodegradable, en cualquier caso.

Tres de los grupos en la Fig. 6 pueden clasificarse como bioplásticos (Gilbert, 2016).

1. Plásticos no biodegradables. Por ejemplo: el polietileno (PE), polipropileno (PP), poli(tereftalato de etileno) (PET), o poli(tereftalato de trimetileno) cuyo origen es parcial o totalmente biológico (cuadrante superior izquierdo).
2. Plásticos de base biológica y a la vez biodegradables, como el polilactato (PLA) y los poli(hidroxicarboxilatos) (PHA) o el poli(succinato de butileno) (PBS) (cuadrante superior derecho). En este grupo también están polisacáridos como el almidón y la celulosa, utilizados en mezclas para plásticos biodegradables.
3. Plásticos biodegradables de origen fósil, como el poli(ϵ -caprolactona) (PCL) o poli(adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT) (cuadrante inferior derecho).

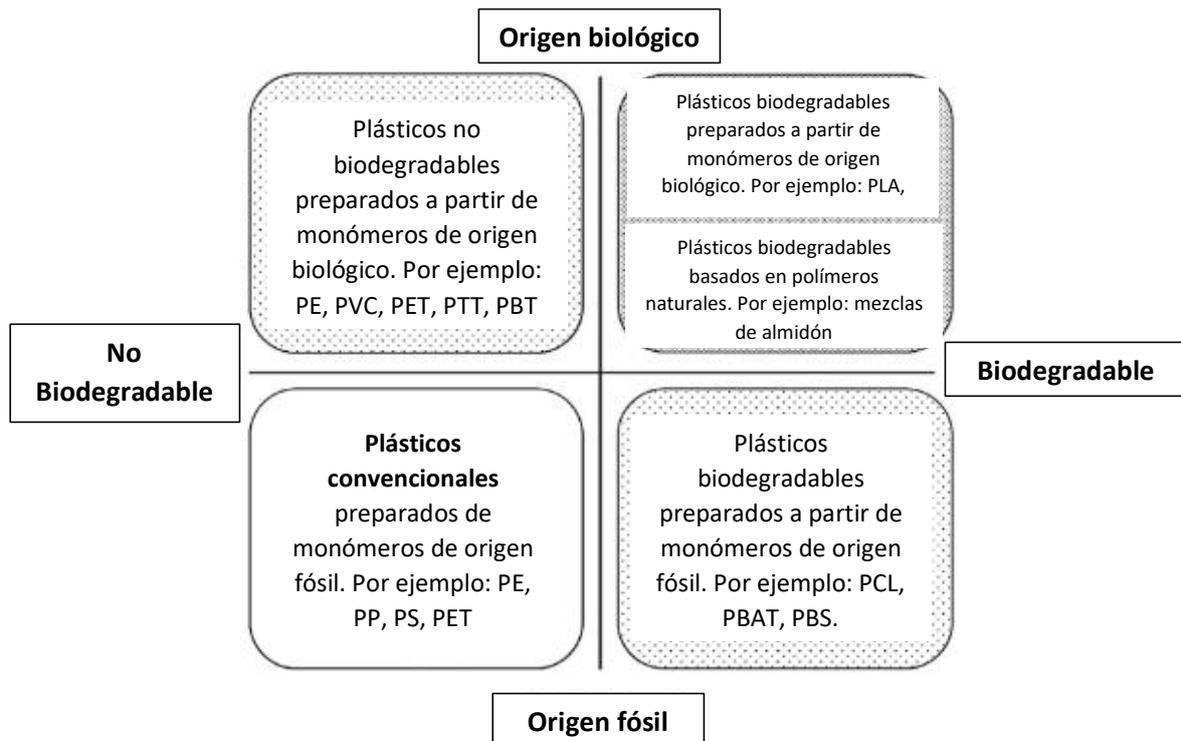


Figura 6. Representación en cuatro cuadrantes de los tipos de materiales plásticos según su origen y biodegradabilidad (Gilbert, 2016). Abreviaciones: PE, polietileno; PVC, poli(cloruro de vinilo); PET, poli(tereftalato de etileno); PTT, poli(tereftalato de trimetileno); PBT, poli(tereftalato de butileno); PLA, polilactato; PHA, poli(hidroxialcanoato); PBS, poli(succinato de butileno); PP, polipropileno; PS, poliestireno; PCL, poli(ϵ -caprolactona); PBAT, poli(adipato-co-tereftalato de butileno). FUENTE: (Gilbert, 2016)

2.7.3. Polihidroxialcanoatos

2.7.3.1. Generalidades

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son poliésteres alifáticos biodegradables (Gilbert, 2016). Su estructura química básica se muestra en la Fig. 7. Algunos autores consideran a los polihidroxialcanoatos como los únicos bioplásticos *sensu stricto* (Koller & Braunegg, 2018), debido a que son completamente sintetizados por microorganismos, y no requieren intervención humana para su polimerización, como es el caso en todos los bioplásticos de origen microbiano (PLA, PBS, PE, PTT, PPP) (G.-Q. Chen, 2010; G.-Q. Chen & Patel, 2012).

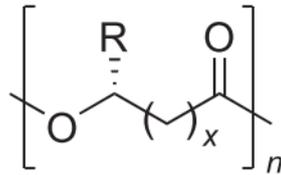


Figura 7. Representación de la estructura básica de los polihidroxicanoatos. R: cadena lateral, x: número de grupos metileno -CH₂- en el esqueleto principal del monómero, n: número de monómeros en la molécula o grado de polimerización. FUENTE: (Gilbert, 2016).

Estructuralmente los PHAs son una familia de poliésteres naturales muy diversa. Su estructura básica está compuesta de ácidos 3-, 4-, 5- y 6-hidroxicanoicos (Raza, Abid, & Banat, 2018). A la fecha existen más de 155 subunidades monoméricas, lo que demuestra la gran variedad de polímeros de PHAs que pueden ser sintetizados por los microorganismos, sus propiedades (Cuadro 4) y la amplia gama de aplicaciones que estos biomateriales pueden tener.

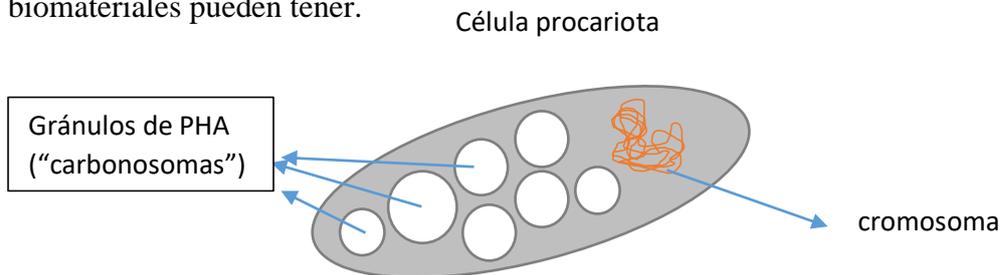


Figura 8. Representación esquemática de una célula procariota conteniendo gránulos de PHA ("carbonosomas"). FUENTE: Elaboración propia.

Cuadro 4. Algunas propiedades de los PHA.

Propiedades de los PHA	
• Termoplásticos	• Pesos moleculares de 20 000 a 30 millones D
• Biodegradables	• Monómeros quirales
• Biocompatibles	• Pueden ser diseñados molecularmente
• Piezoeléctricos	• Activos ópticamente, no lineales
• Quebradizos hasta elásticos	• Hidrofóbicos
• Pueden tener grupos funcionales	• No permeable a gases

FUENTE: (G.-Q. Chen, 2010).

Los PHA son acumulados naturalmente por una gran diversidad de microorganismos (Cuadro 5). Estos biopolímeros se almacenan como inclusiones citoplasmáticas, denominadas gránulos de PHA. En las células, los gránulos de PHA cumplen la función principal de reserva de carbono y energía, y su acumulación inicia, generalmente, cuando los microorganismos están en situaciones de estrés, limitados por algún nutriente y en presencia de un exceso de carbono (G.-Q. Chen, 2010). La acumulación de PHA es un mecanismo de supervivencia que les da a los microorganismos una ventaja ecológica (Castro-Sowinski, Burdman, Matan, & Okon, 2010). Continuamente se le atribuyen nuevas funciones fisiológicas a los gránulos de PHA y son descritos como “carbonosomas” en analogía a los carboxisomas y magnetosomas, debido a la capa proteica que los rodea, que indica que no solo se trata de gránulos simples sino de estructuras celulares organizadas y complejas como los organelos (Jendrossek, 2009; Jendrossek & Pfeiffer, 2014; Koller, 2018b; Obruca et al., 2017).

Cuadro 5. Algunos géneros y especies microbianos productores de PHA.

Microorganismos productores de PHAs	
• <i>Bacillus spp.</i> (G+)	• <i>Cupriavidus necátor</i> (G-)
• <i>Alcaligenes spp.</i> (G-)	• <i>Aeromonas hydrophila</i> (G-)
• <i>Pseudomonas spp.</i> (G-)	• <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (G-)
• <i>Azotobacter spp.</i> (G-)	• <i>Escherichia coli</i> (recombinante) (G-)
• <i>Delftia spp.</i> (G-)	• <i>Burkholderia sacchari</i> (G-)
• <i>Chromobacterium spp.</i> (G+)	• <i>Halomonas boliviensis</i> (G-)
• <i>Staphylococcus spp.</i> (G+)	

G+: Gram Positivo; G-: Gram Negativo. FUENTE: (Amirul, Huong, Ramachandran, & Kannusamy, 2015)

2.7.3.2. Tipos de Polihidroxicanoatos

Los PHA pueden clasificarse en tres grupos: PHA de cadena corta (scl-PHA), PHA de cadena media (mcl-PHA) y PHA de cadena larga (lcl-PHA), de acuerdo al número de átomos de carbono en su cadena lateral. Los scl-PHA tienen menos de 5 carbonos, mientras que los mcl-PHA tienen entre 5 y 14 átomos de carbono (Fig. 9) y los lcl-PHA

tienen más de 14 átomos de carbono, aunque son muy raros y poco estudiados (Raza et al., 2018).

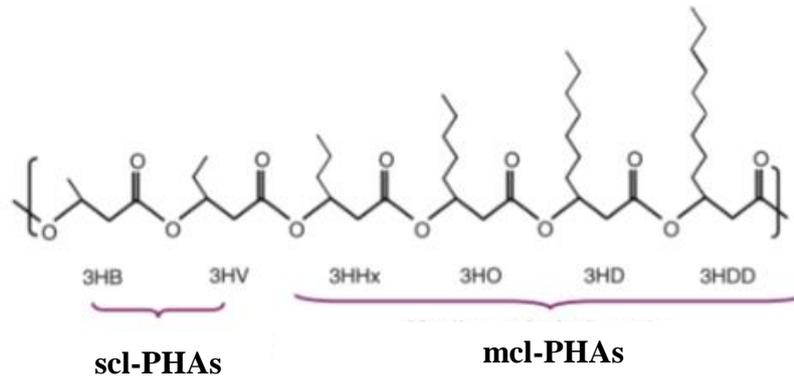


Figura 9. Estructura de los monómeros comunes de PHAs. Monómeros de scl-PHAs: 3-hidroxi butirato (3HB), 3-hidroxi valerato (3HV). Monómeros de mcl-PHAs: 3-hidroxi hexanoato (3HHx), 3-hidroxi octanoato (3HO), 3-hidroxi decanoato (3HD), 3-hidroxi dodecanoato (3HDD). FUENTE: (G.-Q. Chen, 2010).

Adicionalmente los PHA se pueden clasificar como homopolímeros o heteropolímeros (también llamados copolímeros) de acuerdo a las unidades monoméricas que los componen. Uno de los copolímeros más comunes y producidos a nivel industrial es el polihidroxi butirato-co-valerato (Gilbert, 2016). La composición de los PHA depende de los microorganismos y sustratos empleados, en especial, la especificidad de la enzima PHA sintasa que contiene el microorganismo (Gao, Chen, Wu, & Chen, 2011; Halevas & Pantazaki, 2018).

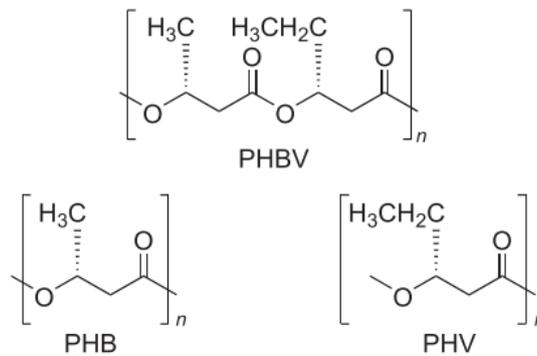


Figura 10. Estructura química de los homopolímeros de PHA más comunes: polihidroxi butirato (PHB) y polihidroxi valerato (PHV), y el copolímero de PHA más común: polihidroxi butirato-co-valerato (PHBV). FUENTE: (Gilbert, 2016).

2.7.3.3. Polihidroxibutirato (PHB)

El PHA más común y mejor estudiado es el homopolímero de 3-hidroxibutirato, poli(3-hidroxibutirato), conocido como P(3HB) o PHB (Kucera et al., 2018). El PHB fue reportado por primera vez en 1926 por Lemoigne, como inclusiones citoplasmáticas en las bacterias Gram positivas *Bacillus megaterium*, (L. Kaur et al., 2017; Nehra, Jamdagni, & Lathwal, 2017). Desde entonces se han descubierto variedad de microorganismos que son capaces de acumularlo, entre ellas, bacterias mesófilas (Bhagowati, Pradhan, Dash, & Das, 2015) y arqueas extremófilas (L. Kaur et al., 2017).

El PHB es quebradizo y rígido, lo que limita sus aplicaciones. Aun así posee propiedades mecánicas que lo asemejan al polipropileno, con la diferencia de que el PHB es biodegradable (Gilbert, 2016). Al añadir unidades de hidroxivalerato (HV) al esqueleto de PHB, se forma el copolímero polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV), mejorando las propiedades del PHB dependiendo de la proporción de unidades de HV añadidas (Gilbert, 2016).

2.7.3.4. Aplicaciones de los Polihidroxicanoatos

Los PHA fueron empleados originalmente para la fabricación de contenedores de cosméticos como botellas de champú, barreras contra la humedad en productos sanitarios y como materia prima para la fabricación de pintura (Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Sin embargo, debido a que los PHA son de origen biológico, biodegradables y biocompatibles, están siendo utilizados en muchos otros campos y constantemente se están explorando nuevas aplicaciones (Fig. 11).

Las propiedades de los PHA son muy similares a las de los plásticos de origen fósil, y además tienen otras características excelentes (Cuadro 3) que los hacen más atractivos que los plásticos tradicionales cuando se destinan para la industria del empaque y para la fabricación de bienes desechables, especialmente aquellos relacionados con los alimentos y consumibles (Tan, Yin, & Chen, 2017).

Los PHA también se están aplicando como materiales biomédicos para suturas y bioimplantes por su excelente biodegradabilidad y compatibilidad con tejidos humanos y animales. Así mismo se están desarrollando nanopartículas de PHA como sistemas de liberación de fármacos, e incluso pesticidas. Los monómeros derivados de diferentes PHA se están utilizando como precursores para la síntesis de fármacos, o directamente

como potenciales fármacos (Koller, 2018c; Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016; Tan et al., 2017).

Otras aplicaciones de los PHA, sus monómeros y derivados pasan por su uso como biocombustibles, alimento para animales, material para impresión 3D y como potenciales materiales inteligentes (Tan et al., 2017).

A pesar de los beneficios que tienen los PHA sobre los polímeros tradicionales, su aplicación masiva se ve limitada por su elevado costo de producción (Blunt et al., 2018). Solo pocas compañías producen PHA actualmente a nivel piloto e industrial, y sus aplicaciones están restringidas a unos pocos nichos de mercado (Blunt et al., 2018). Sin embargo, muchos investigadores creen que es posible lograr la viabilidad económica de los PHA y continúan ideando estrategias para lograr que estos bioplásticos desplacen, eventualmente, a la industria tradicional de los plásticos (Koller & Braunegg, 2018; Nielsen et al., 2017).

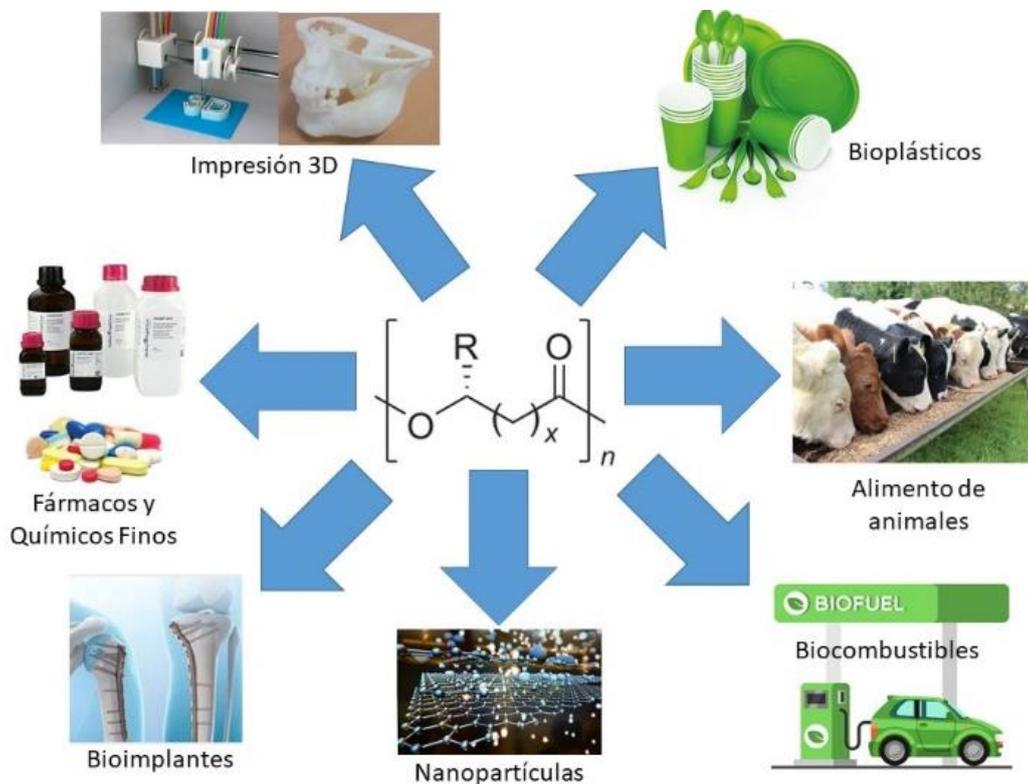


Figura 11. Aplicaciones de los PHA. FUENTE: (G.-Q. Chen, 2010; Tan et al., 2017).

2.7.3.5. Métodos de Producción de Polihidroxicanoatos

La producción de los PHA se puede realizar mediante síntesis natural o síntesis química. La biosíntesis de los PHA se ha reportado que se puede realizar hasta por 14 vías metabólicas, incluyendo 3 rutas naturales y 11 rutas modificadas (Tan et al., 2017). La biosíntesis de PHB mediante la ruta I (Tan et al., 2017), es la ruta natural mejor establecida, donde dos moléculas de acetil-CoA son combinadas por la enzima 3-cetotiolasa (PhaA), para formar acetoacetil-CoA. Luego el acetoacetil-CoA es reducido a 3-hidroxiacetil-CoA por una NADPH-acetoacetil-CoA reductasa (PhaB) y finalmente la enzima PHA sintasa (PhaC) polimeriza los monómeros para producir PHB (Gilbert, 2016).

Los PHA también pueden ser sintetizados por vía química a partir de lactonas empleando metales como catalizadores o utilizando enzimas como parte del proceso (Pollet & Avérous, 2011). Aunque la síntesis química permite un mejor control de la estructura y composición del poliéster, la ventaja de la ruta biológica es que se obtienen polímeros de mayor peso molecular, no se necesitan sustratos costosos para obtenerlos y su método de producción es mucho más simple, amigable con el medio ambiente y sostenible (Pollet & Avérous, 2011).

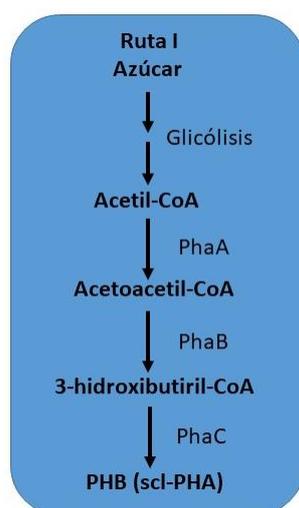


Figura 12. Ruta I de la biosíntesis de PHB. FUENTE: Elaboración propia basado en (Gilbert, 2016).

2.7.3.6. Fermentación microbiana para la producción de PHA

La producción de PHA puede ser realizada por células eucariotas y procariotas (L. Kaur et al., 2017; Raza et al., 2018). Sin embargo, son los procariotas los que se han estudiado más extensivamente y los únicos que se están empleando a escala piloto e industrial en la actualidad (Harvey; Williams & Kelly, 2018).

De entre los microorganismos que se utilizan para la producción de PHA, se pueden distinguir dos grupos (Giourieva, Papi, & Pantazaki, 2019). El primer grupo requiere condiciones de estrés para producir PHA, como el estar en un medio limitado por un nutriente esencial (fósforo, nitrógeno, oxígeno o magnesio) u otra condición como un cambio en el pH, a la vez que existe un exceso de carbono. En este caso, la producción de PHA no se realiza durante la fase de crecimiento. Ejemplos de microorganismos pertenecientes a este grupo son *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans* y *Pseudomonas putida* (Raza et al., 2018). El segundo grupo de microorganismos no requiere de una condición limitante para producir PHA, por lo que se acumula durante la fase de crecimiento. Ejemplos de microorganismos pertenecientes a este grupo son *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli* (recombinante) y *Azotobacter vinelandii* (L. Kaur et al., 2017; Raza et al., 2018).

En la producción de PHAs se pueden utilizar cultivos puros (un solo microorganismo) o cultivos mixtos (co-cultivos definidos o comunidades microbianas naturales) (L. Kaur et al., 2017). Los cultivos puros han sido la opción preferida para la producción de PHAs a nivel industrial (Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004) y la más estudiada (Serafim, Lemos, Albuquerque, & Reis, 2008), pudiéndose alcanzar productividades volumétricas de hasta 5.13 g/L.h con cultivos puros de *Alcaligenes latus* (Wang & Lee, 1997). Los cultivos puros empleados suelen ser microorganismos naturales, o microorganismos modificados genéticamente, como la bacteria *Escherichia coli*, con rutas metabólicas obtenidas de bacterias nativas (Nielsen et al., 2017).

Las estrategias de fermentación que se emplean para la producción de PHAs son variables; dependen de los cultivos microbianos utilizados, y de los sustratos disponibles. Las formas de operación más tradicionales, involucran procesos en lote, lotes repetidos, lotes alimentados y lotes alimentados cíclicos; sin embargo, estas modalidades ofrecen una limitada productividad, o limitado control sobre la composición del polímero (Koller,

2018a). Algunas de las tendencias actuales son el uso de lotes alimentados con reciclaje de células y procesos en continuo de una o varias etapas (Koller, 2018a).

Gracias a la versatilidad de los microorganismos y la gran variedad de rutas metabólicas que poseen, los PHAs se pueden producir a partir de diversos sustratos, especialmente azúcares, ácidos orgánicos e hidrocarburos (Urtuvia, Villegas, González, & Seeger, 2014). Sin embargo, una de las mayores limitaciones para la producción a gran escala de los PHAs es el costo de la fuente de carbono, que se estima entre un 28-50% del costo total de producción (Nielsen et al., 2017). Por ello, el uso de residuos agroindustriales para la producción de PHAs es una alternativa muy atractiva, ya que proporciona sustratos baratos y soluciona problemas ambientales relacionados al almacenaje y tratamiento de estos residuos (Nielsen et al., 2017).

2.7.3.7. *Bacillus* como productoras de PHA

Las bacterias del género *Bacillus* son conocidas acumuladoras de PHA (G.-Q. Chen, König, & Lafferty, 1991). De hecho, el primer PHA en ser descubierto y el más estudiado, el poli-3-hidroxibutirato o PHB, fue reportado en la bacteria *Bacillus megaterium*, en 1926. En algunos casos, se ha reportado que las bacterias de este género pueden llegar a acumular más del 80% de su peso en PHA (Mohapatra, Maity, et al., 2017).

Diversas especies de *Bacillus* son consideradas como organismos modelo tanto en la industria como en la academia (Bunk, Biedendieck, Jahn, & Vary, 2010). Esto se debe a que son muy abundantes en la naturaleza, poseen una gran estabilidad genética, velocidades de crecimiento altas y producen una variedad de enzimas de interés comercial (Mohapatra, Maity, et al., 2017).

Como productoras de PHA, las bacterias del género *Bacillus* ofrecen muchas otras ventajas. Al ser bacterias Gram-positivas, estas bacterias no poseen lipopolisacáridos, que son indeseables en aplicaciones biomédicas, lo que facilita el procesamiento del PHA después de la fermentación (Mohapatra, Maity, et al., 2017). Además, algunas de estas bacterias están entre las más grandes de los procariotas, como es el caso de *Bacillus megaterium*, lo que facilita el proceso de recuperación de la biomasa (por centrifugación o decantación) a escala industrial. Las especies de *Bacillus* también son muy flexibles metabólicamente, pudiendo consumir diversos sustratos y, a partir de ellos, producir PHA más complejos que el PHB (Valappil, Boccaccini, et al., 2007). Estas bondades,

combinadas con las enzimas hidrolíticas que producen, les confieren una gran ventaja en el uso de sustratos baratos, como los residuos agroindustriales o de otras industrias, para la producción de PHA de alto valor (Israni & Shivakumar, 2013; Mohapatra, Maity, et al., 2017; Naranjo, Posada, Higueta, & Cardona, 2013).

A pesar de las ventajas que posee *Bacillus*, los microorganismos más utilizados para la producción industrial de los PHA siguen perteneciendo exclusivamente al grupo de las Gram-negativas (Valappil, Boccaccini, et al., 2007), generalmente porque su acumulación suele ser más elevada, superando el 80% de su peso seco (Byrom, 1987) creciendo rápidamente y acumulando PHA durante su crecimiento (Lee, 2000). En el Cuadro 6 se muestran algunas de las bacterias Gram-negativas comúnmente utilizadas.

La principal desventaja que posee *Bacillus* es su naturaleza formadora de endosporas (Mohapatra, Maity, et al., 2017). El proceso de esporulación es gatillado por las mismas condiciones que promueven la acumulación de PHAs, y además este se consume durante el proceso (Castro-Sowinski et al., 2010), lo que provoca que los rendimientos disminuyan y las productividades caigan. Sin embargo, con el conocimiento de su fisiología microbiana, la aplicación de modificaciones genéticas y el desarrollo de estrategias de fermentación adecuadas (Mohapatra, Maity, et al., 2017), *Bacillus* podría convertirse en la primera de las bacterias Gram-positivas que dé el paso del laboratorio a la industria para una producción eficiente de PHAs.

Cuadro 6. Cepas bacterianas comúnmente utilizadas para la producción de PHA a gran escala.

Cepa	Modalidad de cultivo	Densidad celular (g/L)	Tipo de PHA	Contenido de PHA (%)
<i>Alcaligenes latus</i>	Lote alimentado	112	P3HB	88
<i>Ralstonia eutropha</i>	Lote alimentado	200	PHBV	75
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lote alimentado	50	PHBHHx	50
<i>Escherichia coli</i> (recombinante)	Lote alimentado	100	P3HB4HB	75

P3HB: poli-(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato); PHBV: poli-(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato); PHBHHx: poli-(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato); P3HB4HB: poli-(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato). FUENTE: (Tan et al., 2017).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación en Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Escuela de Ingeniería Ambiental, perteneciente a la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo, en el distrito de Trujillo, departamento de La Libertad, Perú.

3.1. Materiales

3.1.1. Granos gastados de cervecería

Los granos gastados de cervecería se obtuvieron de la cervecería Isla Blanca Company S.A.C (Nuevo Chimbote, Áncash) donde se realiza la elaboración de cerveza artesanal con 100% granos de cebada malteada. Los granos gastados se recuperaron después de la etapa de maceración y se mantuvieron en congelación hasta su traslado al laboratorio.



Figura 13. Granos gastados de cervecería donados por la cervecería Isla Blanca Company S.A.C.

3.1.2. Levadura cervecera residual

La levadura cervecera residual se obtuvo de la cervecería Isla Blanca Company S.A.C (Nuevo Chimbote, Áncash), a partir del lodo sedimentado al final de la fermentación de un lote de cerveza. El lodo se almacenó en congelación hasta su uso.



Figura 14. Sedimento de un lote cerveza que contiene la levadura cervecera residual, donado por la cervecería Isla Blanca Company S.A.C.

3.1.3. Microorganismo

En un estudio previo durante la búsqueda exhaustiva de microorganismos capaces de producir PHA, una bacteria Gram positiva y formadora de endosporas, fue aislada a partir de suelos agrícolas. Esta cepa fue caracterizada y denominada *Bacillus* sp. B23 (Fig. 15), e inicialmente, se determinó, mediante tinción Sudan Black, que era acumuladora de PHA. Posteriormente se confirmó, mediante cromatografía líquida (HPLC) y espectroscopía de infrarrojo (FTIR), que el PHA acumulado por esta bacteria era del tipo polihidroxibutirato o PHB. Este microorganismo fue seleccionado por su gran acumulación de PHB y fue donado por el Laboratorio de Investigación en Tecnologías Limpias y/o Emergentes, para la realización de este trabajo. Según la caracterización realizada a esta bacteria, es productora de amilasas, proteasas y lipasas; y puede consumir azúcares de cinco carbonos y seis carbonos, entre ellos xilosa, arabinosa y glucosa. La cepa se mantuvo a 4°C en agar nutritivo (Atlas, 2010) con la siguiente composición (g/L): agar, 15.0; peptona, 5.0; NaCl, 5.0; extracto de levadura, 2.0; extracto de carne, 1.0; ajustado a pH 7.4.

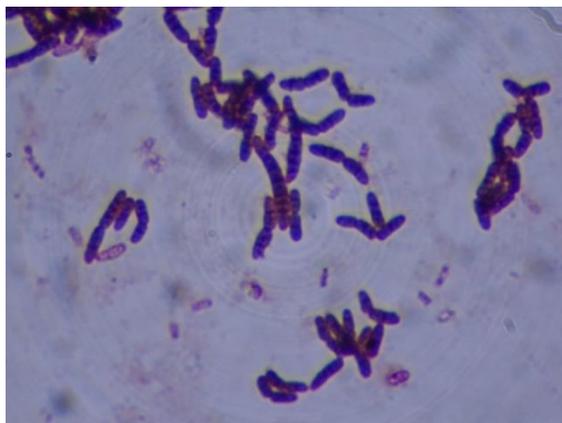


Figura 15. Micrografía de la cepa *Bacillus* sp. B23, donada por el Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes, de la Universidad Nacional de Trujillo. (Aumento: 1000x con aceite de inmersión en microscopio Zeiss Primo Star).

3.2. Métodos

3.2.1. Acondicionamiento de los granos gastados de cervecería

Los granos gastados de cervecería se lavaron con agua corriente y se secaron a 40°C por 72 horas, luego se trituraron con un molino de tornillo sin fin, hasta obtener partículas que pasen por el tamiz de malla #30 (630 µm) y que sean retenidas por el tamiz de malla

#70 (212 μm). Finalmente, se conservaron en bolsas herméticas a temperatura ambiente hasta su uso (Fig. 16). Adicionalmente, se realizó la caracterización química de los granos gastados de cervecería, para determinar su contenido de sólidos totales y humedad (Anexo 1.1), extractivos (Anexo 1.2), y holocelulosa (α , β y γ celulosa) (Anexo 1.3) según las metodologías (TAPPI, 2009) y (NREL & MRI, 1998).



Figura 16. Acondicionamiento de los granos gastados de cervecería. A) Lavado con agua corriente; B) Secado; C) Granos gastados secos; D) Molido; E) Cernido; F) Conservación.

3.2.2. Acondicionamiento de la levadura cervecera residual

La levadura cervecera residual se concentró mediante centrifugación a 5000 rpm para recuperar la biomasa de las levaduras y separarla del líquido residual. Se lavó la biomasa con agua, varias veces, centrifugando para separar el líquido de la biomasa cada vez (Fig. 17).

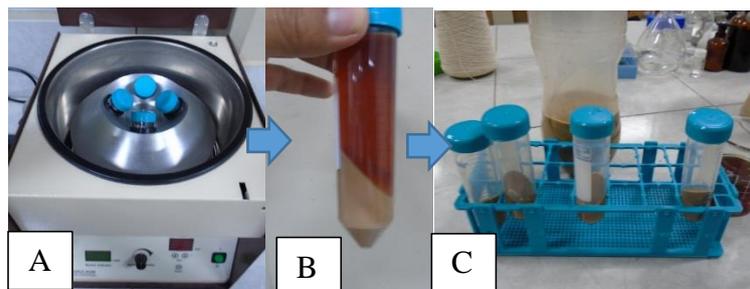


Figura 17. Acondicionamiento de la levadura cervecera residual. A) Centrifugación; B) Biomasa de levadura precipitada; C) Recuperación de la biomasa de levadura.

3.2.3. Preparación del hidrolizado de granos gastados de cervecería

El hidrolizado de granos gastados de cervecería se obtuvo mediante hidrólisis ácida de la biomasa de los granos gastados siguiendo la metodología de (Mussatto & Roberto, 2005), empleando una solución al 1.25% (peso/volumen) de ácido sulfúrico, a una razón sólido líquido de 1:8 (peso/peso), y a 120°C por 17 minutos (Fig. 18).

La hidrólisis se realizó en un frasco de vidrio de 1 L con tapa rosca. En el frasco se pesó 104 g de granos gastados de cervecería previamente molidos, tamizados (con malla #30 y #70, descrito previamente) y secados hasta un 4% de humedad. Se añadió 800 g de agua destilada y 10 g de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 cc). Luego, el frasco con la mezcla se colocó en un autoclave a 120°C por 17 minutos para realizar la hidrólisis. Después, el material sólido resultante fue separado por filtración al vacío y el filtrado (hidrolizado) fue concentrado en un rotavapor a 60°C y 100 mbar, hasta obtener una concentración de azúcares reductores equivalente a 100 g/L de glucosa. El pH del hidrolizado se ajustó a 7.0 mediante la adición de perlas de hidróxido de sodio (NaOH) y el precipitado formado se removió por centrifugación (4000 rpm x 15 min) y filtración. El hidrolizado concentrado y neutralizado se conservó en congelación hasta su uso.

El hidrolizado fue caracterizado químicamente para determinar la concentración de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959) según (Adney & Baker, 2008) (Anexo 2.1), concentración de glucosa utilizando glicemia enzimática AA líquida Wiener Lab (Wiener Lab, 2000) (Anexo 2.2), concentración de nitrógeno total empleando el Test 0-83 Nanocolor® Nitrogen Total TN_b 22 (MACHEREY-NAGEL, 2016) (Anexo 2.3), concentración de amonio con el Test 0-03 Nanocolor® Amonio 3 (MACHEREY-NAGEL, 2019) (Anexo 2.4) y compuestos inhibidores (hidroximetilfurfurales y furfurales) mediante cromatografía líquida (HPLC) (Li, Xu, Zhang, & Wang, 2017) (Anexo 2.5).

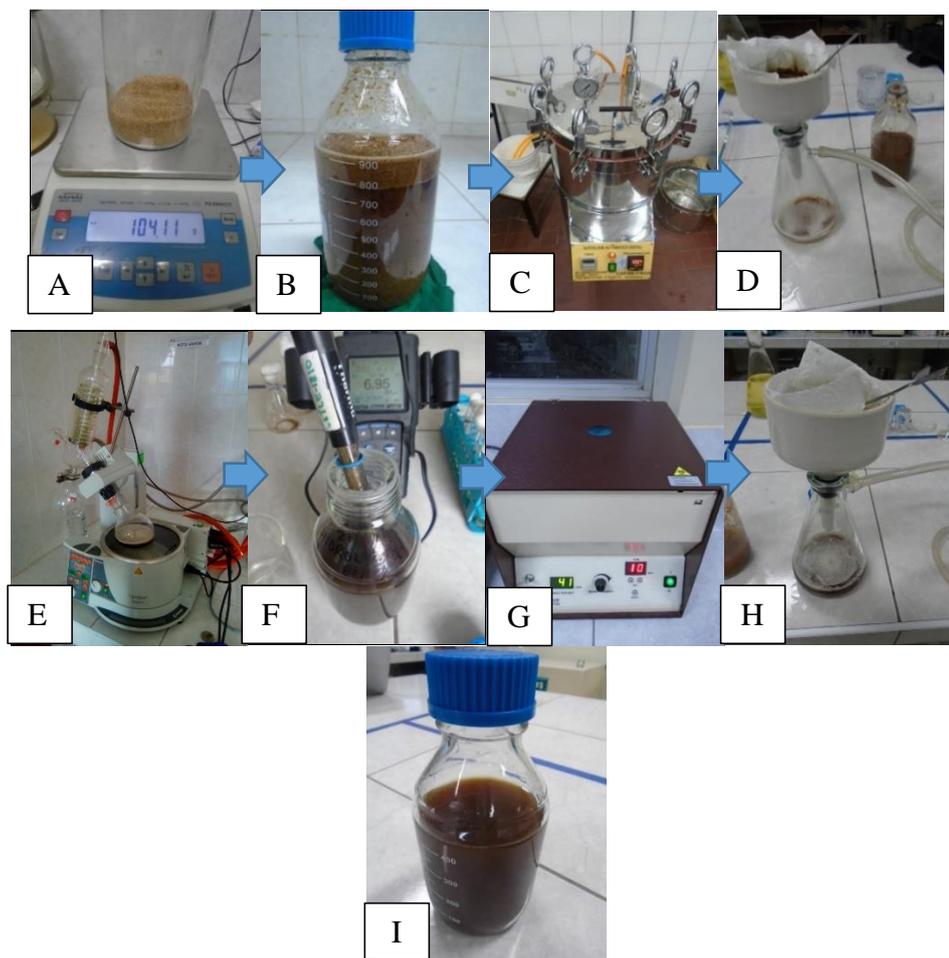


Figura 18. Preparación del hidrolizado de granos gastados de cervecería. A) Pesado de granos gastados acondicionados; B) Mezclado con agua y ácido sulfúrico; C) Autoclavado a 120°C por 17 minutos; D) Filtrado para separación de la fracción líquida (hidrolizado de granos gastados); E) Concentrado del hidrolizado en rotavapor; F) Neutralización del hidrolizado; G) Centrifugación del hidrolizado para remoción de precipitados; H) Filtración para remoción de partículas remanentes; I) Aspecto final del hidrolizado.

3.2.4. Preparación del extracto de levadura cervecera residual

El extracto de levadura se obtuvo siguiendo el protocolo de (Zarei et al., 2016). La levadura cervecera residual, aproximadamente 200 g (peso húmedo) previamente concentrada y lavada se resuspendió en 1 L de agua ultrapura. La suspensión preparada se autoclavó a 115°C por 10 minutos, seguido de un enfriamiento rápido con hielo. Luego, los restos de la biomasa se separaron por centrifugación. El sobrenadante fue recuperado y centrifugado cinco veces para asegurar la remoción de partículas insolubles remanentes. El sobrenadante final fue autoclavado nuevamente y enfriado en un baño frío. El extracto líquido producido se concentró en un evaporador y finalmente se utilizó un liofilizador

para obtener la forma sólida del extracto de levadura (Fig. 19) que se aplicó como suplemento al medio de cultivo. Antes de su uso, se preparó una solución concentrada de 30 g/L de extracto de levadura, que fue diluida según se requiera en la fermentación. El pH de esta solución se ajustó a 7.0. El extracto fue caracterizado químicamente para determinar la concentración de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959) (Anexo 2.1), la concentración de glucosa utilizando glicemia enzimática AA líquida Wiener Lab (Wiener Lab, 2000) (Anexo 2.2), la concentración de nitrógeno total empleando el Test 0-83 Nanocolor® Nitrogen Total TN_b 22 (MACHEREY-NAGEL, 2016) (Anexo 2.3), y la concentración de amonio con el Test 0-03 Nanocolor® Amonio 3 (MACHEREY-NAGEL, 2019) (Anexo 2.4).

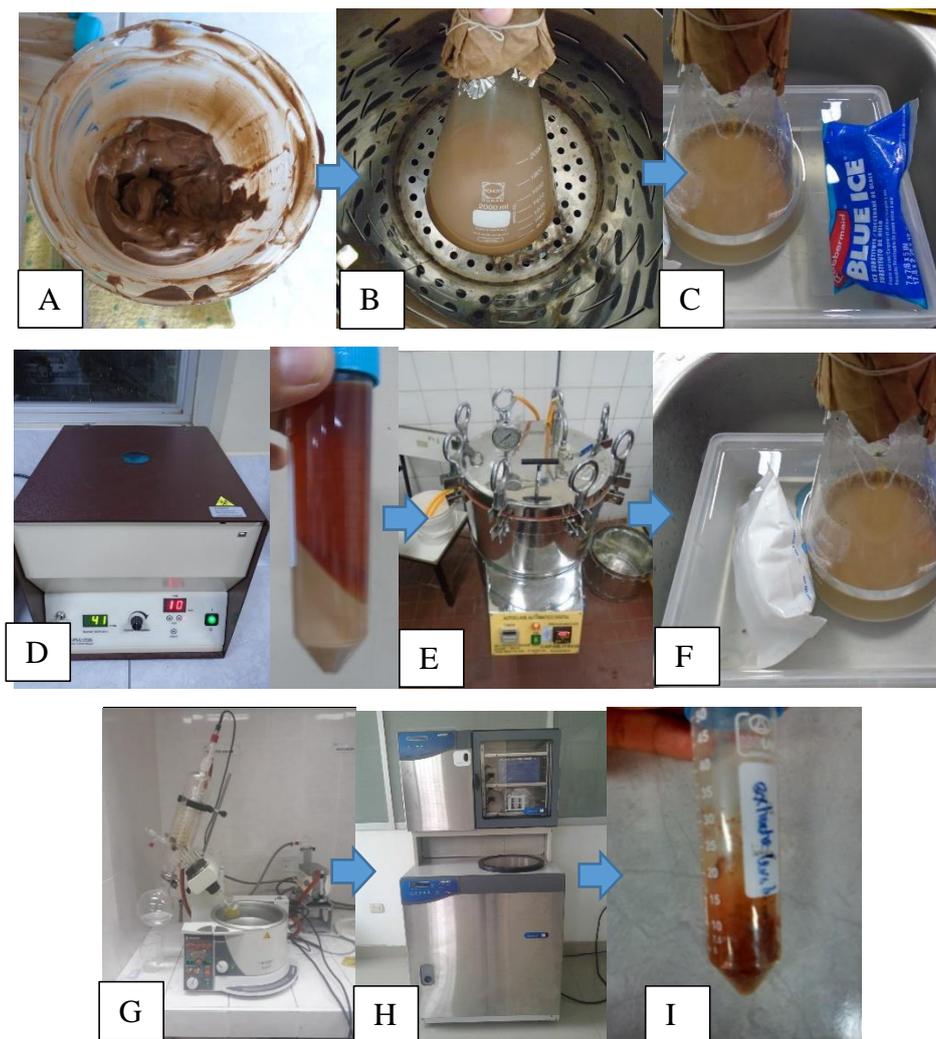


Figura 19. Preparación del extracto de levadura cervecera residual. A) Biomasa de levadura húmeda; B) Autoclavado de biomasa resuspendida en agua; C) Enfriado en baño frío; D) Centrifugado para remoción de sólidos y recuperación del sobrenadante (extracto de levadura); E) Autoclavado del extracto de levadura; F) Enfriado en baño frío; G) Concentrado en rotavapor; H) Liofilizado; I) Aspecto final del extracto de levadura en seco.

3.2.5. Cinética del microorganismo

Se evaluó la cinética de la cepa *Bacillus* sp. B23 a nivel de matraces para conocer su perfil cinético de acumulación de PHB en cultivo por lote; es decir, si acumula PHB durante su fase de crecimiento exponencial o durante su fase estacionaria. En una primera instancia se realizó una cinética exploratoria con medio definido (medio M) diseñado para 3.55 g/L de biomasa celular teórica máxima (sin considerar acumulación de polímero) (Anexo 7.1) y luego se realizó una cinética de mayor extensión, en medio complejo elaborado con los sustratos derivados de los residuos de la cervecería (medio H + EL) diseñado para 4.75 g/l de biomasa celular teórica máxima (Anexo 7.3). El procedimiento para realizar la cinética de ambos casos se describe en las siguientes secciones, y los resultados se muestran en la sección 4.2 y 4.3 del capítulo IV “Resultados y Discusión”, pág. 46 y 48, respectivamente.

3.2.5.1. Reactivación del microorganismo

Para la reactivación de la cepa B23 se inoculó una azada en caldo nutritivo (misma composición que el agar nutritivo descrito anteriormente, pero sin agar) y se incubó a 30°C por 24 horas. Se prepararon nuevos viales con agar nutritivo y se inocularon con 50 uL a partir del cultivo líquido. Se incubaron los viales a 30°C por 24 horas (Fig. 20) y se utilizaron en los ensayos o se conservaron en refrigeración.

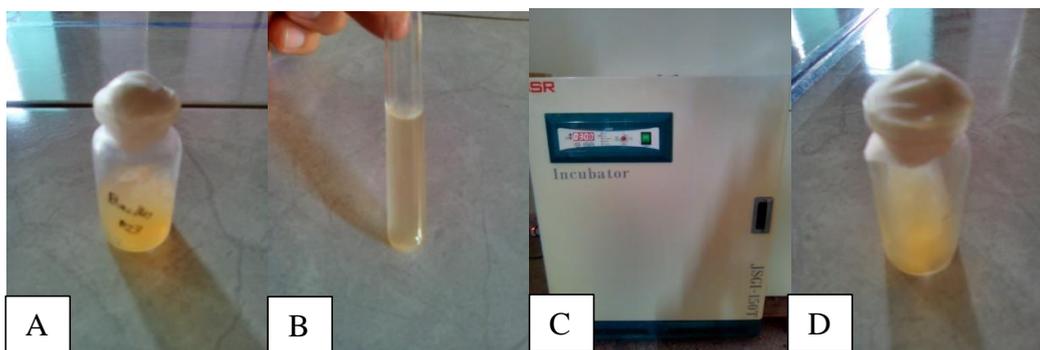


Figura 20. Reactivación de cepa *Bacillus* sp. B23. A) Vial con cepa conservada a 4°C; B) Cultivo en caldo nutritivo; C) Incubación a 30°C; D) Vial con cepa incubada por 24 horas, listo para su uso o conservación.

3.2.5.2. Preparación del inóculo

Los inóculos para la cinética se realizaron a partir de los viales preparados previamente. La cinética se realizó en medio definido y complejo, por lo que el inóculo se realizó en el

medio correspondiente. Las condiciones del inóculo fueron de 24 horas de incubación a 30°C y 200 rpm en agitación orbital, en un matraz de 125 mL con 30 mL de medio. Al finalizar la incubación, se centrifugó el caldo de cultivo y se recuperó la biomasa, la cual se lavó hasta tres veces con agua destilada estéril. Luego, se resuspendió nuevamente en agua destilada estéril y se ajustó la densidad óptica a 0.5 con agua destilada estéril, correspondiente a una concentración de biomasa de 0.26 g/L (Anexo 2.6). Finalmente se procedió a inocular los matraces con 3 ml cada uno, para así completar los 30 ml de medio de cultivo con las concentraciones requeridas.

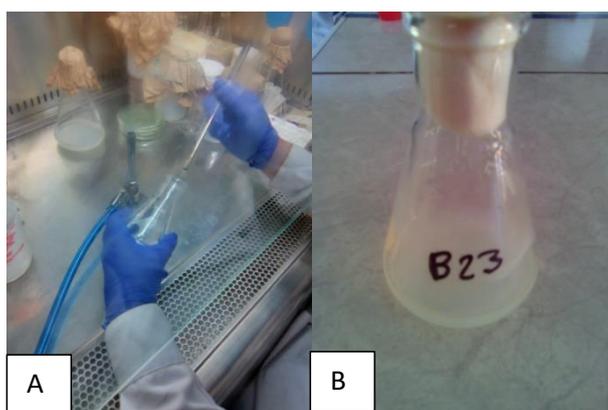


Figura 21. A) Preparación del inóculo de la cepa *Bacillus* sp. B23 en medio definido M. B) Inóculo al final de la incubación.

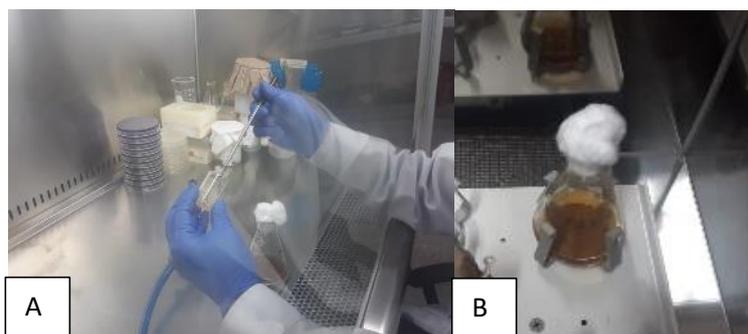


Figura 22. A) Preparación del inóculo de la cepa *Bacillus* sp. B23 en medio complejo H+EL. B) Incubación de inóculo a 200 rpm y 30°C.

3.2.5.3. Cinética en medio de cultivo definido

Se preparó el medio M (Anexo 3.1), un medio de cultivo industrial utilizado por varios autores para la producción de PHB (Atlić et al., 2011; Muhr et al., 2013; Rodríguez-Contreras et al., 2013). Este medio de cultivo se utilizó para conocer la cinética de

crecimiento microbiano, consumo de sustrato y producción de PHB de la cepa en condiciones definidas. En este caso, el medio estaba diseñado para soportar una biomasa celular teórica máxima de 3.55 g/L (asumiendo limitación por fuente de nitrógeno) (Anexo 7.1), sin considerar acumulación de metabolitos como el PHB.

La cinética con el medio definido se realizó en 6 matraces de 125 ml con 30 ml de medio M cada uno, sin control de pH, con un pH inicial de 7, a 30°C, 200 rpm y hasta las 72 horas de incubación. Cada 24 horas se tomaron dos matraces como muestra (duplicado) de un punto de la cinética. Posteriormente se analizaron las muestras para la cuantificación de glucosa, biomasa y acumulación de PHB (cuyos procedimientos de análisis se describen en la sección 3.2.6.3. de Recolección de Datos, pág. 41).

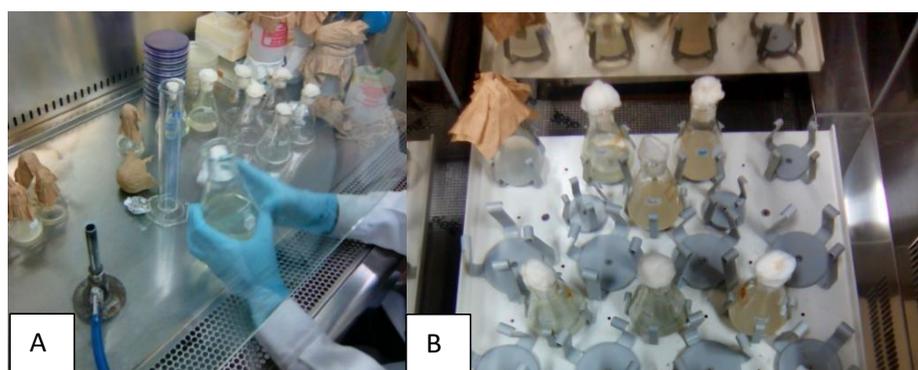


Figura 23. A) Preparación de medio de cultivo M. B) Matraces de cinética en incubación a 200 rpm y 30°C.

3.2.5.4. Cinética en medio de cultivo complejo

Este medio de cultivo denominado “H + EL” (por las iniciales de “Hidrolizado y Extracto de Levadura”) se utilizó para conocer la cinética de crecimiento microbiano, consumo de sustrato y producción de PHB de la cepa en medio complejo. Este medio se elaboró a partir del hidrolizado de granos gastados de cervecera y se suplementó con extracto de levadura cervecera residual. En este caso se ajustó el medio de cultivo a una concentración inicial de 20 g/L de azúcares reductores y se suplementó con una concentración inicial de 2 g/L de extracto de levadura, diseñado para 4.75 g/l de biomasa celular teórica máxima (Anexo 7.3). Para la formulación del medio se diluyeron las soluciones previamente elaboradas del hidrolizado de granos gastados de cervecera (con una concentración de azúcares reductores equivalente a 100 g/L de glucosa, ver sección de Preparación del hidrolizado de granos gastados de cervecera, pág. 32) y del extracto de levadura

cervecera residual (solución a 30 g/L, ver sección 3.2.4 de Preparación del extracto de levadura cerveza residual, pág. 33). El medio se autoclavó a 115°C por 30 minutos.

La cinética con el medio complejo se realizó en 12 matraces de 125 ml con 30 ml de medio cada uno, sin control de pH, con un pH inicial de 7, a 30°C, 200 rpm, hasta ~85 horas de incubación. Cada 12 horas aproximadamente, se tomaron dos matraces como muestra (duplicado) de un punto de la cinética (en total se realizaron 6 puntos). Posteriormente se analizaron las muestras para la cuantificación de azúcares reductores, biomasa y acumulación de PHB (cuyos procedimientos de análisis se describen en la sección 3.2.6.3 de Recolección de Datos, pág. 41).

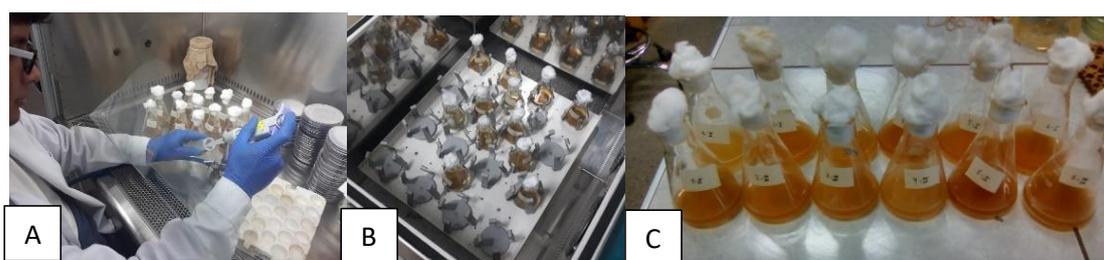


Figura 24. A) Inoculación de cultivos para la cinética en medio complejo. B) Incubación de matraces de cinética en medio complejo H+EL. C) Matraces de cinética después de incubación.

3.2.6. Diseño experimental para optimización de la producción de PHB

Una vez conocida la cinética del microorganismo se procedió a la ejecución del diseño experimental para la evaluación de la influencia de las variables y la optimización de la producción de PHB. En estos ensayos se empleó el medio H + EL como única fuente de nutrientes, variando la concentración de los azúcares reductores y el extracto de levadura mediante dilución de las soluciones concentradas elaboradas previamente.

Se usó un diseño central compuesto rotatable 2^2 con cinco niveles codificados, incluyendo 4 réplicas en el punto central, 4 puntos axiales ($\alpha=\pm 1.41421$), y 4 puntos factoriales, haciendo un total de 12 unidades experimentales (Cuadro 7). El experimento se realizó por duplicado para los puntos factoriales y axiales, y los valores respuesta se reportaron como el promedio.

Con este diseño se evaluó el efecto de las variables independientes: concentración inicial de azúcares reductores (X_1) del medio (cuya fuente es hidrolizado de granos gastados de cervecera) y la concentración inicial del extracto de levadura cerveza residual (X_2)

(Cuadro 8) sobre las variables dependientes o respuestas: productividad volumétrica de PHB (Q_p) (g de PHB/L de medio de fermentación * h) y el contenido de PHB ($\%PHB$) (g de PHB * 100%/g de biomasa total) a las 24 horas de cultivo. El $\%PHB$ es equivalente al rendimiento $Y_{p/x}$ o rendimiento de producto respecto a la biomasa total, pero multiplicado por 100%.

Se buscó optimizar el medio de cultivo para maximizar las variables respuesta, por lo que se aplicó un criterio de deseabilidad para determinar las concentraciones iniciales ideales de las mismas. Así mismo se pudo obtener modelos de segundo orden a partir de los datos recolectados con este diseño experimental.

Cuadro 7. Diseño experimental factorial central compuesto rotatable 2^2

Ensayo	Variables ^a			
	Nivel codificado		Nivel original	
	x_1	x_2	X_1 (g/L)	X_2 (g/L)
1	-1	-1	10	1
2	-1	+1	10	5
3	+1	-1	30	1
4	+1	+1	30	5
5	$-\alpha$	0	5.86	3
6	$+\alpha$	0	34.14	3
7	0	$-\alpha$	20	0.17
8	0	$+\alpha$	20	5.83
9	0	0	20	3
10	0	0	20	3
11	0	0	20	3
12	0	0	20	3

^a X_1 : concentración inicial de azúcares reductores; X_2 : concentración inicial de extracto de levadura.

Cuadro 8. Valores de las variables independientes a los diferentes niveles del diseño experimental.

Variables independientes	Símbolo	Niveles codificados				
		-1.4142	-1	0	+1	+1.4142
Azúcares reductores (g/L)	X_1	5.86	10	20	30	34.14
Extracto de levadura (g/L)	X_2	0.17	1	3	5	5.83

3.2.6.1. Preparación del inóculo

Para el inóculo de los ensayos se ajustó el medio de cultivo H + EL a concentraciones iniciales de 20 g/L de azúcares reductores y 2 g/L de extracto de levadura. El medio se autoclavó a 115°C por 30 minutos y posteriormente se ajustó el pH a 7 con NaOH 1M estéril. Se tomó una azada de viales con biomasa microbiana con 24 horas de incubación y se inocularon en el medio de cultivo. Las condiciones del inóculo fueron de 24 horas de incubación a 30°C y 200 rpm en agitación orbital, en un matraz de 125 ml con 30 ml de volumen de trabajo. Al finalizar la incubación, se centrifugó el caldo y se recuperó la biomasa, la cual se lavó hasta tres veces con agua destilada estéril. Luego, se resuspendió nuevamente en agua destilada estéril y se ajustó la densidad óptica a 1 (OD_{600nm}), aproximadamente 0.5 g/L de biomasa (peso seco). Una vez ajustada la densidad óptica se procedió a inocular los matraces del diseño experimental, con 3 ml cada uno, para así completar los 30 ml de medio de cultivo con las concentraciones requeridas.



Figura 25. A) Soluciones concentradas para la preparación del medio complejo "H + EL" del inóculo. B) Preparación del inóculo. C) Inóculo a al finalizar la incubación.

3.2.6.2. Fermentación

La ejecución del diseño experimental se realizó en matraces de 125 mL con 30 mL de volumen de trabajo. El medio de cultivo se elaboró a partir de las soluciones concentradas del hidrolizado de granos gastados de cervecería (solución concentrada a 100 g/L de azúcares reductores equivalentes a glucosa) y del extracto de levadura (solución concentrada a 30 g/L de extracto de levadura), diluyendo con agua destilada apropiadamente para alcanzar las concentraciones indicadas en el Cuadro 7. Las diferentes versiones del medio soportan diferentes concentraciones de biomasa celular teórica como máximo, como se muestra en el Anexo 7.4. El medio de cultivo se autoclavó a 115°C por 30 minutos, luego se ajustó el pH a 7 con NaOH 1 M estéril. Posteriormente se adicionó 3 mL del inóculo a los 27 ml de medio de cultivo autoclavado y enfriado, haciendo una relación de inóculo de 10%. Finalmente, los matraces se colocaron en una incubadora de agitación orbital a 200 rpm y 30°C por 24 horas.

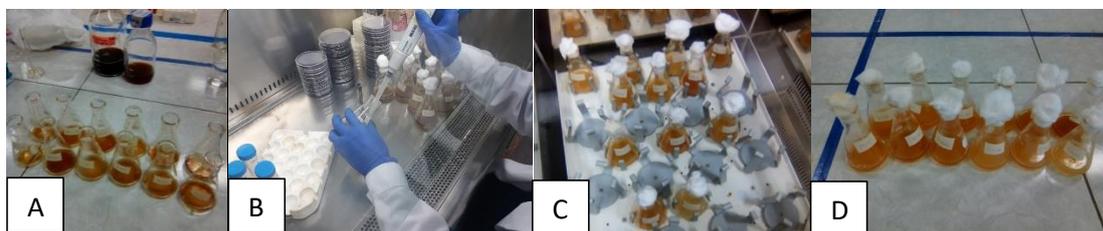


Figura 26. A) Preparación de los matraces para la fermentación del diseño experimental. B) Inoculación de los matraces. C) Incubación a 200 rpm y 30°C. D) Matraces luego de la incubación.

3.2.6.3. Recolección de datos

Una vez terminada la incubación (24 horas), se retiraron los matraces, y se analizó a punto final para la cuantificación de azúcares reductores, nitrógeno total, biomasa y acumulación de PHB.

3.2.6.3.1. Cuantificación de biomasa

Finalizada la fermentación, se vertió el contenido de los matraces en tubos Falcon de 50 ml y se separó la biomasa mediante centrifugación del caldo (4400 rpm por 10 min a T° ambiente). Se separó el sobrenadante para otros análisis y se lavó la biomasa añadiendo agua destilada, se agitó y se volvió a centrifugar nuevamente. Este procedimiento se repitió 3 veces en total. Al final, la biomasa se colocó en un crisol previamente pesado, y

se secó en la estufa a 105°C por 24 horas. La biomasa se cuantificó por el método de peso seco (Anexo 2.6).

3.2.6.3.2. Cuantificación de azúcares reductores

Del sobrenadante recuperado en el procedimiento anterior, se diluyó apropiadamente con agua destilada antes de aplicar el método DNS (Miller, 1959) según (Adney & Baker, 2008) (Anexo 2.1).

3.2.6.3.3. Cuantificación de nitrógeno total

Del sobrenadante recuperado también se analizó la concentración de nitrógeno total remanente en el caldo de cultivo. Para la cuantificación de nitrógeno total se empleó el Test 0-83 Nanocolor® Nitrogen Total TN_b 22 (Anexo 2.3)

3.2.6.3.4. Cuantificación de PHB

Se utilizó la biomasa seca recuperada para cuantificar el contenido de PHB por HPLC como ácido crotónico (Díaz-Barrera, Andler, Martínez, & Peña, 2016). En este caso se hidroliza el PHB a ácido crotónico directamente de la biomasa (Anexo 2.7).

3.2.6.4. Análisis de Datos

Los datos obtenidos se graficaron y analizaron utilizando el programa Microsoft Excel 2016 y el programa “Statistica” (Statsoft, USA) versión 8.0. Las significancias estadísticas de los coeficientes de regresión se determinaron mediante la prueba t de Student, la significancia estadística de la ecuación del modelo de segundo orden se determinó mediante la prueba de Fischer, análisis de varianza (ANOVA) y coeficiente de determinación múltiple, R^2 . Los valores óptimos de las variables se obtuvieron mediante el análisis gráfico y numérico utilizando el programa “Statistica v8.0” basado en el criterio de deseabilidad.

3.2.7. Ensayo de verificación

Una vez determinados los valores óptimos para las concentraciones iniciales de las variables, se realizó un ensayo de verificación (por triplicado), en el que se preparó el medio de cultivo teniendo esos valores en cuenta y manteniendo el resto de condiciones constante.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de la materia prima

Se determinaron los componentes principales de los sustratos empleados para la producción de PHB, el hidrolizado de los granos gastados de cervecería y el extracto de levadura cervecera residual. Las concentraciones de los componentes más importantes se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Caracterización química del hidrolizado de granos gastados de cervecería y el extracto de levadura cervecera residual

Composición	Hidrolizado de granos gastados de cervecería (*)	Extracto de levadura cervecera residual (**)
Azúcares reductores (g/L)	104.2	1.32
Glucosa (g/L)	6.19	0.108
Nitrógeno Total (g/L)	1.96	2.90
C/N (mol/mol)	24.81	0.21
Amonio NH ₄ -N (g/L)	0.186	0.256
Furfural (mg/L)	nd	-
Hidroximetilfurfural (mg/L)	50	-

nd: no detectable.

*concentrado a ~100 g/L de azúcares reductores mediante rotavaporación.

**en solución a 30 g/L de extracto de levadura en agua ultrapura.

Los granos gastados de cervecería y la levadura cervecera residual derivan de un proceso industrial bien establecido. Debido a esto, su composición es de esperarse que sea constante en el proceso de elaboración de un determinado tipo de cerveza, ya que de ello depende un producto homogéneo y con características específicas. Esto es beneficioso desde el punto de vista de variabilidad de lote a lote, si la materia residual es empleada en procesos fermentativos.

En el hidrolizado de granos gastados de cervecería (elaborado a partir de 104 g de granos gastados de cervecería en 0.8 L de 1.25% H₂SO₄, ver sección 3.2.3 de Materiales y Métodos) se llegó a obtener una solución con ~45 g/L de azúcares reductores, que luego

se concentró mediante rotavaporación hasta ~100g/L de azúcares reductores equivalentes a glucosa, de forma similar a (Mussatto & Roberto, 2008).

Según los ensayos de cuantificación de glucosa, se determinó que este monosacárido sólo representaba aproximadamente el 6% de los azúcares reductores, ya que sólo se cuantificó 6.19 g/L de glucosa, en comparación a los 104.2 g/L de azúcares reductores totales (Cuadro 9). Por su parte, la concentración de azúcares reductores y glucosa en el extracto de levadura (disuelto a razón de 30 g en 1 litro de agua) es despreciable, considerando que éste se diluiría entre 0.17 y ~6 g/L para los ensayos de optimización. De esta forma se asume que la fuente de azúcares principal del medio de cultivo elaborado con los dos sustratos es el hidrolizado. Esto es de esperarse, ya que el contenido de azúcares libres en el extracto de levadura es mínimo, y lo poco que se pudo cuantificar probablemente sea remanente del proceso de producción de la cerveza, que no se eliminaron durante el lavado de la biomasa de levadura, como parte de su procesamiento para la elaboración del extracto.

Adicionalmente se caracterizó, de forma cualitativa, la composición de azúcares del hidrolizado de granos gastados de cervecería (Anexo 6.1, Fig. 54), mediante HPLC, con un método en etapa de desarrollo, implementación y estandarización al momento de realizar los ensayos, pero que permitió conocer la composición principal de azúcares, aunque no se pudieron cuantificar los mismos. Mediante este método solo se pudo confirmar la presencia de tres azúcares principales: glucosa, xilosa y arabinosa, típicos de los hidrolizados lignocelulósicos (Obruca, 2015). También se observaron picos de celobiosa y fructosa, pero en cantidades aparentemente menores (Anexo 6.1, Fig. 54). Probablemente había otros azúcares, disacáridos y oligosacáridos, a juzgar por la presencia de otros picos en los cromatogramas, de los cuales no se tenían estándares y por lo tanto no se pudieron identificar (Anexo 6.1, Fig. 54). Debido a la baja reproducibilidad del método, no se pudo emplear para cuantificar los azúcares presentes en el hidrolizado, ni en las muestras de los ensayos, por lo que se empleó la cuantificación de azúcares reductores por el método DNS para monitorear el consumo de los mismos.

Adicionalmente, se caracterizó la composición de la biomasa de los granos gastados de cervecería para conocer el origen de los azúcares reductores presentes en el hidrolizado. Se determinó que los granos gastados de cervecería estaban compuestos por un 22.77%

(% peso seco) de celulosa (alfa-celulosa), y un 77.23 % de hemicelulosa (73.43% de beta-celulosa y un 3.8% de gamma-celulosa) (Anexo 1). Composición similar se observó en otros estudios con granos gastados de cervecería (Mussatto & Roberto, 2005). Esto explicaría la presencia de azúcares como la xilosa, arabinosa y glucosa en el análisis cualitativo por HPLC (Anexo 6.1, Fig. 54).

Por otro lado, se cuantificó una concentración de nitrógeno total de 1.96 g/L en el hidrolizado concentrado (solución a ~ 100 g/L azúcares reductores), lo que evidencia que los granos gastados de cervecería son también una buena fuente de nitrógeno, ya que poseen un contenido de proteínas moderado, como también se observó en otros estudios (Mussatto & Roberto, 2008). Esto se evidenció al momento de procesar el hidrolizado, con la generación de abundante espuma y precipitados cuando se filtraba la solución o se exponía a temperaturas altas y cambios de pH. En el caso del extracto de levadura cervecera residual (solución a 30 g/L), se cuantificó una concentración de nitrógeno total de 2.90 g/L. Esto significa que casi el 10% (peso seco) del extracto de levadura es nitrógeno, lo que concuerda con la concentración de nitrógeno total de extracto de levadura comerciales, que fluctúa entre el 8 y 12%, correspondiente a un contenido de proteínas de 50 a 75% (BD Biosciences, s/f; EURASYP, s/f), y lo reportado por otros investigadores para la levadura cervecera residual (Mathias, Alexandre, Cammarota, Mello, & Sérvulo, 2015). Por otra parte, la concentración de amonio en el hidrolizado y el extracto de levadura fue baja (Cuadro 9), lo que indica que la mayor parte del nitrógeno orgánico se encuentra en formas complejas como proteínas o péptidos, ya que solo se cuantifica el extremo $\text{NH}_4\text{-N}$ de las mismas por el método utilizado (Anexo 2.4).

La relación carbono/nitrógeno de 25 del hidrolizado es la ideal para la producción de PHB según algunos autores (Singh Saharan et al., 2014). Por su parte, el extracto de levadura es una buena fuente de nitrógeno y otros nutrientes (Zarei et al., 2016), que puede mejorar el crecimiento y la producción de PHB (Babruwad et al., 2015; Getachew & Woldeesenbet, 2016; Quillaguamán et al., 2007).

Finalmente se cuantificó la presencia de los principales compuestos inhibidores en los hidrolizados: furfural e hidroximetilfurfural (HMF), en el hidrolizado de granos gastados de cervecería. El hidrolizado se obtuvo mediante un proceso de hidrólisis ácida débil con ácido sulfúrico. El principal problema de la hidrólisis ácida es que la descomposición de

los azúcares monoméricos producidos durante la reacción tiene lugar simultáneamente con la hidrólisis de los polisacáridos (la xilosa y la arabinosa se descomponen en furfural y la glucosa en HMF (Mussatto & Roberto, 2005). Estos compuestos pueden tener efectos inhibitorios en microorganismos productores de PHA (Dietrich, Illman, & Crooks, 2013; Koller, Maršálek, de Sousa Dias, & Braunegg, 2017). En este caso se cuantificó una concentración de 50 mg/L de HMF en el hidrolizado concentrado, mientras que el furfural no se detectó (Cuadro 9), teniendo menos de 0.25 mg/L, según los límites de detección para furfural empleados en este trabajo (Anexo 2.5). En un estudio utilizando granos gastados de cervecía para la producción de un hidrolizado ácido, se alcanzó una concentración de furfural y de HMF de 138.6 mg/L y 93.7 mg/L, respectivamente (Mussatto & Roberto, 2008). En contraste, las concentraciones de inhibidores cuantificadas en este trabajo fueron bajas o indetectables.

4.2. Cinética de producción de PHB en medio definido

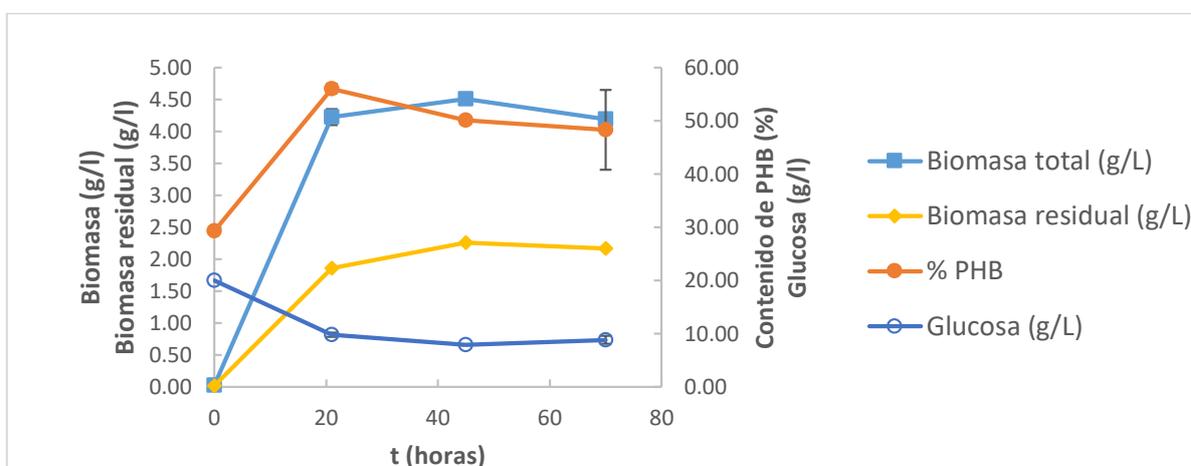


Figura 27. Cinética de la cepa *Bacillus* sp. B23 en medio definido M.

En un primer ensayo se evaluó la cinética de producción de la cepa *Bacillus* sp. B23 hasta las 72 horas (Fig. 27), en el medio definido conocido como “medio M”, utilizado para la producción de PHB a escala industrial (Küng, 1982; Rodríguez-Contreras et al., 2013).

Según (Rodríguez-Contreras et al., 2013), el medio de cultivo M agota su fuente de nitrógeno primero, por lo que se asumió que estaba limitado por nitrógeno. Por supuesto, esto depende de las necesidades del microorganismo empleado en la fermentación. Un análisis teórico (Anexo 7.1), asumiendo una composición estándar para las bacterias, reveló que el medio de cultivo podría estar limitado por nitrógeno en cuanto a los

macronutrientes. Sin embargo, respecto a otros nutrientes, se revelaron deficiencias en el suministro de hierro, entre otros metales considerados como trazas (Anexo 7.1). Esto significa que estos metales podrían limitar el crecimiento de los microorganismos, incluso antes que el consumo del nitrógeno sea total. En esta cinética no se analizó el consumo de nitrógeno por limitaciones en los materiales necesarios para el análisis, con lo cual se podría verificar si es que el medio de cultivo “M” efectivamente estaba limitado por nitrógeno. Al no ser determinante para la continuación del trabajo, se prefirió emplear los insumos para los ensayos posteriores, específicamente para cuantificar el nitrógeno total al inicio de la fermentación en los ensayos de optimización con el medio de cultivo complejo. Esta información es más relevante porque permite deducir la relación C/N que afecta la acumulación de PHB en muchos microorganismos.

De las muestras tomadas durante la cinética en medio definido (Fig. 27), se observó un máximo de producción de PHB a las 21 horas de cultivo, con 55.97% (p/p) de contenido de PHB acumulado en la biomasa. Así mismo, se alcanzó una biomasa total de 4.22 g/L. Siendo la biomasa residual de 1.86 g/L. La biomasa residual en este caso se refiere a la biomasa total menos el polímero acumulado, es decir a la biomasa celular como tal. Según cálculos previos (Anexo 7.1) el medio teóricamente debería soportar una biomasa celular de 3.55 g/L, asumiendo limitación por nitrógeno con una composición promedio de una bacteria con 12% de contenido de nitrógeno elemental (Egli, 2009). El hecho que la biomasa celular haya alcanzado un máximo de 2.25 g/L a las 45 horas de cultivo (Fig. 27), indica que en el caso de *Bacillus* sp. B23 el medio de cultivo probablemente no esté limitado por nitrógeno, o bien, que el porcentaje de nitrógeno en bacteria, asumido para el cálculo teórico, no es el correcto, ya que esta composición es variable especialmente en medios con limitación de nutrientes (Folsom & Carlson, 2015). Sin embargo, de ser así, el porcentaje correcto estaría cerca del 18% de contenido de nitrógeno, lo cual es improbable para una bacteria en un medio pobre en este elemento. De hecho el porcentaje de nitrógeno debería ser menor (Folsom & Carlson, 2015; Heldal, Norland, Fagerbakke, Thingstad, & Bratbak, 1997). Lo más plausible entonces es que el medio de cultivo para el caso específico de esta cepa sea deficiente en algún otro nutriente como puede ser el hierro u otro elemento traza. Estas deficiencias se suelen encontrar en muchos medios de cultivo mínimos en la literatura (Egli, 2015).

En el trabajo de (Rodríguez-Contreras et al., 2013) empleando el medio M con una cepa de *Bacillus megaterium* uyuni S29 se alcanzó una biomasa residual ligeramente mayor (> 4 g/L) a la teórica calculada en 25 horas, lo que tiene sentido si la composición elemental del microorganismo es menor al 12% empleado en el cálculo teórico. También se indica que para este caso el medio sí estuvo limitado por nitrógeno ya que se verificó con mediciones durante la cinética. Esto permite deducir decir que el microorganismo de ese estudio era menos exigente en cuanto a otros nutrientes que podrían limitar el crecimiento y por ende la acumulación de PHB como pasó en el caso de *Bacillus* sp. B23, ya que esta última no logró crecer (biomasa residual) al mismo nivel que la primera.

Continuado con el análisis de la cinética de *Bacillus* sp. B23 en el medio M, a partir de las 21 horas se asumió que el microorganismo ingresó a la fase estacionaria ya que no se observó un crecimiento significativo (zona de limitación por nutriente), además la acumulación de PHB empezó a disminuir ligeramente y el consumo de carbono (glucosa) a partir de ese momento fue mínimo. La disminución en el contenido de PHB durante la fase estacionaria es un comportamiento típico de microorganismos del género *Bacillus* en general, ya que el polímero acumulado sirve como fuente de carbono y energía en el proceso de esporulación que ocurre durante esta fase de su desarrollo (Castro-Sowinski et al., 2010), justo después de finalizar la fase exponencial. Esta es una de las desventajas principales de usar cepas *Bacillus* para la producción de PHB (Mohapatra, Maity, et al., 2017).

En base a lo observado en el primer ensayo (Fig. 27), es probable que la producción de PHB esté asociada al crecimiento, ya que no se observó un aumento en la acumulación de PHB durante la fase estacionaria, y considerar que esta fase inicie antes de las 24 horas no parece razonable.

El conocimiento de la cinética del proceso fermentativo es muy importante para la mejora de un proceso por lote (Mahmoudi, Baei, Najafpour, Tabandeh, & Eisazadeh, 2010). La producción industrial de PHB se realiza principalmente como lotes o lotes alimentados, ya que la producción en procesos largos y en continuo es susceptible a contaminación y degeneración de las cepas (Enrico Grothe, Moo-Young, & Chisti, 1999). Por este motivo se escogió la modalidad de cultivo por lote para este trabajo. Sin embargo, la producción de PHB en este tipo de proceso, puede consumir mucho tiempo, en algunos casos más de 100 horas (Braunegg, Lefebvre, Renner, Zeiser, & Haage, 1995). En este aspecto, es

esencial reducir el tiempo para minimizar costos, y un estudio exploratorio de la cinética de producción permite conocer el tiempo necesario para detener el proceso.

Las bacterias del género *Bacillus* pueden requerir o no una limitación por nutrientes (junto a un exceso de carbono) para la acumulación de PHB de forma significativa (Mohapatra, Maity, et al., 2017). La mayoría de bacterias investigadas para la producción de PHB requieren de un desbalance en las condiciones nutricionales que limite su crecimiento, para poder acumular cantidades significativas de PHB (Braunegg et al., 1995). El requerir de una limitación del crecimiento implica que el polímero se acumule durante la fase estacionaria, lo cual prolonga el tiempo del proceso. Por este motivo, en muchos casos se deben tolerar largas etapas de acumulación si se espera obtener altas concentraciones del polímero en procesos discontinuos (Braunegg et al., 1995). Con ciertos microorganismos, como *Alcaligenes latus* o *Azotobacter vinelandii* esto no es necesario, ya que la biosíntesis de PHB no depende de una limitación del crecimiento y son capaces de producir el polímero durante su crecimiento activo (Quillaguamán et al., 2007). La consecuencia de este comportamiento es que el tiempo de fermentación para la producción de PHB por lotes, puede ser reducido sustancialmente (Braunegg et al., 1995) ya que el proceso se detendría al alcanzar el crecimiento máximo. En este aspecto, la cepa *Bacillus* sp. B23 podría ser muy atractiva para la producción de PHB si su crecimiento es rápido y la acumulación de PHB está asociada al crecimiento, sin requerir de una limitación por nutrientes.

4.3. Cinética de producción de PHB en medio complejo

4.3.1. Ensayos previos con hidrolizado de granos gastados de cervecería

Antes de realizar la cinética en medio complejo (con los sustratos derivados de los residuos de la cervecería), se comprobó que el hidrolizado por sí mismo (denominado medio H) podía soportar un crecimiento y producción de PHB con la cepa *Bacillus* sp. B23, alcanzando hasta 44.5% de acumulación (Cuadro 10). Esto era de esperarse ya que tiene una relación inicial C/N (mol/mol) de ~25 (Cuadro 9), que es suficiente para obtener un alto contenido de PHB en cepas de este género y otros microorganismos (Faccin et al., 2009; Singh Saharan et al., 2014). Para este ensayo, el hidrolizado concentrado se diluyó hasta 20 g/L de azúcares reductores. El contenido proteico del hidrolizado es fácilmente aprovechable por las cepas del género *Bacillus* ya que secretan proteasas (Sangkharak & Prasertsan, 2012) y de esta forma pueden aprovecharlo también como fuente de nitrógeno.

La capacidad metabólica de la cepa *Bacillus* sp. B23 la convierte en una candidata para valorizar residuos ricos en proteínas. Por otra parte, el hidrolizado contenía bajas concentraciones de inhibidores furfural y HMF. Los microorganismos del género *Bacillus* tienen una concentración mínima inhibitoria de 6.00 g/L y >6.00 g/L para furfural y HMF, respectivamente (Dietrich et al., 2013), por lo que no se esperaban problemas de inhibición por estos compuestos. En base a estos hallazgos, el hidrolizado elaborado en este trabajo podría ser empleado para la producción de PHA como única fuente de nutrientes. A pesar de este potencial, la productividad fue baja porque la concentración de biomasa residual fue de solo 0.88 g/L (Cuadro 10), probablemente por la falta de un medio más enriquecido, ya que el contenido de nitrógeno del medio soportaba una producción de biomasa celular de hasta 3.13 g/L (Anexo 7.2).

Cuadro 10. Resultados de ensayo inicial con hidrolizado de granos gastados.

Parámetros	Medio H	Teórico esperado
Biomasa total (g/L)	1.58*	3.13**
Biomasa residual (g/L)	0.88	-
%PHB	44.48	-
Productividad (g/L.h)	0.029	-

*Biomasa total, incluyendo acumulación de PHB.

**Biomasa celular sin incluir acumulación de PHB.

Para aprovechar la levadura residual de la industria cervecera, en este punto, se elaboró un extracto de la misma, con la finalidad de utilizarlo como suplemento de nutrientes para el hidrolizado. Por esta razón se decidió estudiar el extracto de levadura residual de cervecería como suplemento al medio H (hidrolizado de granos gastados a 20 g/L de azúcares reductores), y evaluar la cinética de producción de PHB con la cepa *Bacillus* sp. B23 en este nuevo medio “H + EL”. Muchos autores sugieren que las fuentes de nitrógeno complejas como la peptona, el extracto de levadura o el licor de maíz, pueden ser suplementados para mejorar el crecimiento, así como también la acumulación de polímero de los microorganismos, especialmente si lo acumulan durante su crecimiento (Albuquerque & Malafaia, 2017; Borah, Thakur, & Nigam, 2002; Koller, Atlíć, Dias, Reiterer, & Braunegg, 2010).

4.4. Cinética de producción de PHB en medio complejo H + EL

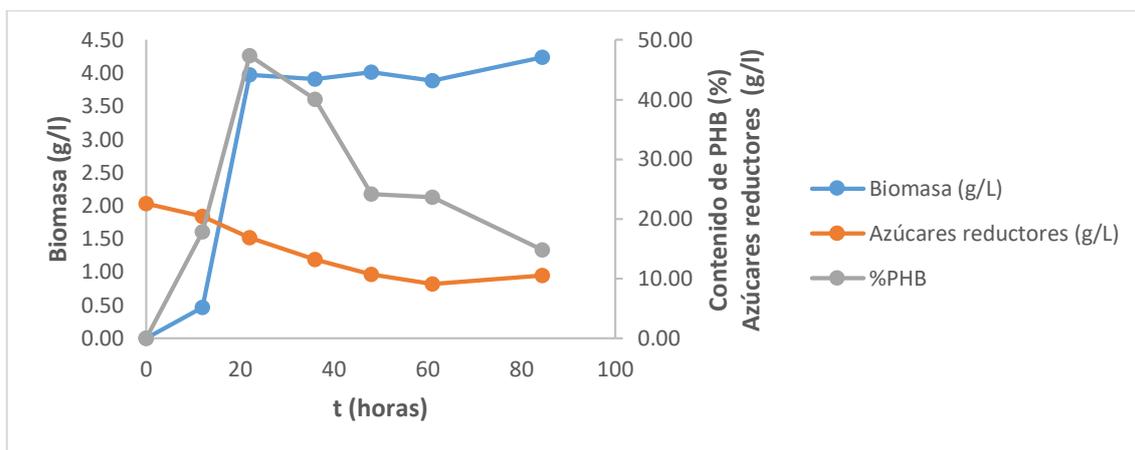


Figura 28. Cinética cepa *Bacillus* sp. B23 en el medio H + EL

Para verificar si la producción de PHB estaba asociada o no al crecimiento de la cepa *Bacillus* sp. B23, se realizó otra cinética, pero esta vez empleando el medio complejo, “H + EL”. El medio de cultivo se elaboró únicamente con un hidrolizado ácido de los granos gastados de cervecera, que sirvió como fuente principal de carbono, y un extracto de levadura cervecera residual, que sirvió como fuente principal de nitrógeno y otros nutrientes. En esta ocasión se consideró tomar una muestra adicional a las 12 horas de cultivo para cuantificar la producción de PHB y el crecimiento en ese tiempo. Como se puede observar en la Fig. 28, el contenido de PHB a las 12 horas fue proporcional a la concentración de biomasa hasta las 22 horas de cultivo, que es cuando se observó una caída en el contenido de PHB (%PHB) y una concentración constante de la biomasa, típicos de la fase estacionaria en *Bacillus* (Castro-Sowinski et al., 2010). En este caso se observó un máximo de producción de PHB a las 22 horas de cultivo, siendo de 47.40% (peso/peso) el contenido de PHB acumulado en la biomasa. Así mismo, se alcanzó una biomasa total de 3.97 g/L en ese tiempo.

Utilizando el medio de cultivo H se logró obtener una acumulación de 44.48% de PHB, sin suplemento de extracto de levadura (Cuadro 10) a las 24 horas de cultivo. En contraste, cuando se suplementó el hidrolizado con 2 g/L de extracto de levadura se logró obtener una acumulación de 47.40 % de PHB y una biomasa total de 3.97 g/L (peso seco) (Fig. 29), lo que equivale a un aumento en la productividad de cerca del 300% en comparación con la obtenida sin suplementación (Cuadro 11). Esto se debe al suplemento en nutrientes

que representa el extracto de levadura, especialmente como fuente de nitrógeno y microelementos.

Cuadro 11. Comparación de producción de PHB en medio H y H + EL a las 24 y 22 horas de cultivo, respectivamente.

Parámetros	Medio H	Medio H + EL
Biomasa (g/L)	1.58	3.97
%PHB	44.48	47.40
Productividad (g/L.h)	0.029	0.086

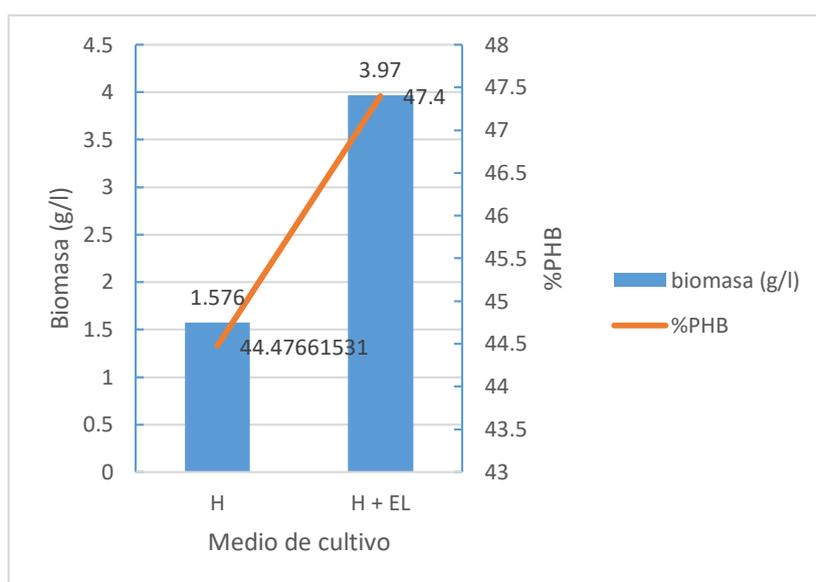


Figura 29. Comparación de la biomasa y el %PHB alcanzados en los medios de cultivo H y H + EL.

Para que la aplicación de los PHA sea común, los costos de producción del polímero deben ser minimizados. Muchos aspectos a considerar para alcanzar estos objetivos tienen que ver con el microorganismo productor. Algunas de las características ideales son: debe crecer rápido en sustratos baratos y de preferencia debe acumular el polímero de manera asociada al crecimiento (Braunegg et al., 1995). En este trabajo, la cepa *Bacillus* sp. B23 creció rápidamente y a la vez acumuló de forma paralela a su crecimiento, en menos de 24 horas, un máximo contenido de PHB, lo cual es ideal para un proceso de producción de PHB en lote, y mejor aún a partir de sustratos residuales.

Muchas cepas de bacterias Gram negativas o Gram positivas pueden acumular PHA (Babruwad et al., 2015). Sin embargo, la producción a escala de estos polímeros suele realizarse con bacterias Gram negativas, ya que en general acumulan un mayor contenido de PHB en su biomasa. Una desventaja del uso de este tipo de microorganismos es que contienen lipopolisacáridos (LPS), un tipo de endotoxina que puede estar asociado con los PHA después de purificarse y provocar fuertes respuestas inmunológicas, lo que es indeseable en aplicaciones médicas o alimentarias (Babruwad et al., 2015; López et al., 2012; Santimano et al., 2009). Las bacterias Gram positivas como las del género *Bacillus* tienen características ideales para un proceso de producción de PHA ya que carecen de endotoxinas (Santimano et al., 2009). Además, las bacterias de este género crecen muy rápido, poseen varias enzimas hidrolíticas y pueden producir co-polímeros a partir de diferentes fuentes de carbono (Santimano et al., 2009). Esto las destaca como candidatas potenciales para la producción de PHB a partir de sustratos baratos como los residuos agroindustriales. La cepa *Bacillus* sp. B23 demostró muchas de estas características en los ensayos, por lo que es un buen prospecto para continuar con estudios de optimización.

A pesar de que un medio complejo proporciona muchos más nutrientes que un medio definido, en los ensayos de cinética de producción en diferentes medios de cultivo, se tuvo un crecimiento y producción de PHB ligeramente menores en el medio complejo (Cuadro 12). Esto significa que la cepa de *Bacillus* sp. B23 no es exigente en cuanto a los requerimientos nutricionales para la producción de PHB. De hecho, el medio definido M tenía una concentración de nitrógeno total inicial 27% menor (0.43 g/L N) en comparación a la concentración de nitrógeno total inicial del medio complejo (0.59 g/L N); sales y minerales en concentraciones mínimas, y no se adicionaron vitaminas ni aminoácidos que en otros casos es esencial para un buen desempeño en las fermentaciones.

El hecho de que el crecimiento y la producción de PHB haya sido ligeramente menor en el medio complejo, podría significar que algún componente estaba en menor concentración, o bien, que existía algún inhibidor en el mismo, que afectó la actividad de esta cepa. Sin embargo, después de analizarlo para presencia de compuestos como los furfurales e hidroximetilfurfurales, se encontró que la concentración de los mismos era muy baja para afectar el comportamiento de la cepa. Probablemente haya otros compuestos que no se evaluaron, como el ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico,

entre otros inhibidores, que podrían estar afectando el crecimiento (Koller, 2017; Sindhu et al., 2013). O simplemente el nitrógeno en forma de sal de amonio en el medio definido M, es más fácil de asimilar respecto al nitrógeno que se encuentra en forma de proteínas y péptidos principalmente en el medio complejo, los cuales tiene que ser hidrolizados en primer lugar. Por ejemplo, (Borah et al., 2002) mencionan que obtuvieron un máximo crecimiento y acumulación de PHB con *Bacillus mycoides* RLJ B-017 empleando 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno inorgánico, que es el mismo compuesto a la misma concentración, que se emplea como parte del medio M. De igual forma, se obtuvieron resultados prometedores con el medio complejo H + EL, por lo que es posible utilizar este medio para la producción de PHB, tal como se emplea el medio definido M para la producción a otras escalas (Rodríguez-Contreras et al., 2013).

Cuadro 12. Comparación de los parámetros de producción obtenidos en medio definido (medio M) y medio complejo (H + EL) a las 24 y 22 horas de cultivo, respectivamente.

Parámetros	Medio M	Medio H + EL
Biomasa total (g/L)	4.22	3.97
%PHB	55.97	47.40
Productividad (g/L.h)	0.113	0.086

La cepa *Bacillus* sp. B23 tiene la capacidad de consumir azúcares de 5 y 6 carbonos según las pruebas bioquímicas realizadas en estudios previos. En base a esto, se evaluó el consumo de estos azúcares en el medio H + EL, haciendo el seguimiento a las muestras de la cinética y analizándolas por HPLC. Aunque no fue posible cuantificar las concentraciones de estos azúcares (el método está en etapa de estandarización y validación), se evidenció la disminución secuencial del área y la altura de los picos de los azúcares glucosa, xilosa y arabinosa, en ese orden (Anexo 6.2, Fig. 55), lo que equivale a la disminución en la concentración de estos azúcares durante la cinética. Esto es evidencia que la cepa *Bacillus* sp. B23 consume preferentemente glucosa, lo cual es común en los microorganismos (L. F. Silva et al., 2004). De hecho, es solo durante el consumo de este azúcar cuando se produce PHB, ya que luego de las 22 horas de la cinética se observó una disminución en el contenido de PHB (Fig. 28), a pesar que los otros azúcares se seguían consumiendo (Anexo 6.2, Fig. 55). La habilidad de las cepas

para consumir la glucosa en poco tiempo y producir un máximo de PHB, deja abierta la posibilidad de reutilizar el caldo de fermentación, enriquecido en azúcares de 5 carbonos como la xilosa y arabinosa, para otros procesos como la producción de xilitol, arabitol u otros compuestos de alto valor (Dávila, Rosenberg, & Cardona, 2016; Mussatto et al., 2006; Mussatto & Roberto, 2008).

Como se mencionó anteriormente, solo un 6% de los azúcares reductores presentes en el hidrolizado corresponden a la glucosa, y a juzgar por los cromatogramas obtenidos para la identificación de los azúcares presentes en el hidrolizado, la xilosa y arabinosa deberían estar en concentraciones similares (Anexo 6.2, Fig. 55). Sin embargo, cuando se diluye, de 104 g/L a ~20 g/L de azúcares reductores, sólo 1.2 g/L es glucosa y esta concentración no es suficiente para explicar la concentración de biomasa y PHB alcanzadas en los ensayos con el medio H + EL. Por ejemplo, en la cinética (Fig. 28) se puede observar que la concentración de azúcares reductores disminuye de 22 g/L iniciales hasta 16.8 g/L a las 22 horas, siendo la diferencia mayor a la concentración de glucosa en el hidrolizado en este caso (1.32 g/L). Probablemente otros azúcares además de la glucosa (y diferentes de la xilosa y arabinosa), disacáridos u oligosacáridos cuantificados como azúcares reductores deben estar siendo consumidos simultáneamente como fuente de carbono para el crecimiento y la producción de PHB.

4.5. Optimización del medio complejo H + EL

En base a los resultados anteriores se continuó con un diseño experimental con la finalidad de optimizar la composición inicial del medio de cultivo “H + EL” para la producción de PHB. La composición del medio se modificó en función a la concentración inicial de azúcares reductores (donde la fuente de los mismos es el hidrolizado) y la concentración inicial del extracto de levadura (fuente de nitrógeno principalmente) suplementado al medio.

La optimización de las condiciones de fermentación se ha utilizado sustancialmente para mejorar productividades en muchos bioprocesos (Enrico Grothe et al., 1999). El método de superficie de respuesta es uno de los métodos más eficientes y es una herramienta comúnmente usada para este fin (Osman, Elrazak, & Khater, 2016) ya que provee una predicción de datos más sistemática y capacidad de validación para numerosos procesos fermentativos (Mohandas et al., 2018). En este trabajo, los efectos de las variables

experimentales: concentración inicial de azúcares reductores (equivalentes a glucosa) y concentración inicial de extracto de levadura cervecera residual, fueron investigados simultáneamente usando un diseño estadístico compuesto central rotatable. Este tipo de diseño es uno de los más populares para estudiar el efecto de varios parámetros para la optimización de la producción de PHA usando diferentes microorganismos (Mohandas et al., 2018). Los experimentos fueron planeados para obtener modelos cuadráticos capaces de describir la productividad volumétrica de PHB (Q_{PHB}) y el contenido de PHB ($\%PHB$). Estos parámetros se consideraron como las variables respuesta ya que son los más importantes en la producción de PHB si se busca obtener altas producciones y minimizar los costos del proceso (Wang & Lee, 1997). El diseño experimental junto con los resultados obtenidos se muestra en el Cuadro 13.

Adicionalmente se calculó la concentración de biomasa total (X), la concentración de PHB (P) y, el rendimiento de PHB respecto al sustrato (Y_{ps}), en este caso, azúcares reductores equivalentes a glucosa. Si bien, el rendimiento Y_{ps} es otro parámetro que determina el precio del producto PHB (Choi & Lee, 1997), para el caso de la optimización no es práctico incluir este parámetro como otra respuesta ya que como se puede observar en el Cuadro 13, un alto Y_{ps} , que es ideal, no necesariamente está alineado con una alta productividad o una alta acumulación de PHB.

Para optimizar múltiples respuestas, en este caso maximizarlas, se necesita encontrar un compromiso entre las variables independientes. Sin embargo, al incluir el rendimiento Y_{ps} , se reducirían los valores de las respuestas consideradas más importantes, Q_{PHB} y $\%PHB$, en aras de una mayor eficiencia en el uso de los azúcares reductores. Al ser azúcares obtenidos a partir de residuos agroindustriales, su valor no debería ser más significativo que el obtener mayores cantidades de producto. Por esta razón no se incluyó Y_{ps} como respuesta dentro de los análisis de optimización y se prefirió darle prioridad a Q_{PHB} y $\%PHB$ en este trabajo; pero sí se calcularon los valores de este parámetro para ser tenidos en cuenta y posteriormente buscar mejorarlos.

Los resultados experimentales del Cuadro 13 fueron usados para estimar los efectos principales (lineales y cuadráticos) de las variables y sus interacciones (lineales) con el programa Statistica v8.0.

Cuadro 13. Matriz del diseño central compuesto rotatable con las variables independientes en forma codificada y natural.

Ensayo	Variables ^a				Respuestas ^b				
	Nivel codificado		Nivel original		Q_{PHB}	$\%PHB$	X	P	Y_{ps}
	x_1	x_2	X_1 (g/L)	X_2 (g/L)	(g/L*h)	(% p/p)	(g/L)	(g/L)	(g/g)
1	-1	-1	10	1	0.0123 ± 0.0015	22.001 ± 2.031	1.337 ± 0.0367	0.295 ± 0.0352	0.0305± 0.0038
2	-1	+1	10	5	0.0445 ± 0.0019	31.038 ± 1.054	3.438 ± 0.0317	1.068 ± 0.0461	0.1389± 0.0072
3	+1	-1	30	1	0.0817 ± 0.024	47.957 ± 1.666	4.087 ± 0.0200	1.959 ± 0.0585	0.2935± 0.0359
4	+1	+1	30	5	0.1219 ± 0.0018	51.385 ± 0.989	5.692 ± 0.0250	2.924 ± 0.0434	0.2035± 0.0009
5	-α	0	5.86	3	0.0063 ± 0.0011	12.384 ± 2.327	1.227 ± 0.0133	0.152 ± 0.0269	0.0340± 0.0069
6	+α	0	34.14	3	0.1141 ± 0.0045	54.274 ± 1.762	5.043 ± 0.0333	2.738 ± 0.1070	0.1930± 0.0045
7	0	-α	20	0.17	0.0274 ± 0.0034	24.444 ± 3.051	2.690 ± 0.0067	0.657 ± 0.0804	0.0904± 0.0133
8	0	+α	20	5.83	0.1119 ± 0.0010	48.018 ± 0.087	5.593 ± 0.0600	2.686 ± 0.0239	0.2016± 0.0053
9	0	0	20	3	0.0921	44.693	4.947	2.211	0.1754
10	0	0	20	3	0.0815	40.965	4.773	1.955	0.1587
11	0	0	20	3	0.0913	45.647	4.800	2.191	0.1732
12	0	0	20	3	0.0801	40.558	4.740	1.923	0.1603

^a X_1 : concentración inicial de azúcares reductores; X_2 : concentración inicial de extracto de levadura. ^b Q_{PHB} : productividad volumétrica de PHB; $\%PHB$: contenido de PHB en biomasa; X : concentración de biomasa celular total; P : concentración de PHB; Y_{ps} : Rendimiento de PHB respecto a glucosa.

En las Fig. 30 y 31, se ilustra una gráfica de Pareto para cada respuesta (Q_{PHB} y $\%PHB$), con todos los efectos estandarizados, a un nivel de significancia de 0.05. Se observó que la concentración inicial de azúcares reductores (efecto lineal) tuvo la mayor influencia sobre el $\%PHB$, seguido de la concentración inicial de extracto de levadura (efecto lineal) (Fig. 30). El mayor efecto sobre la Q_{PHB} fue también la concentración inicial de azúcares reductores (efecto lineal), seguido de la concentración inicial de extracto de levadura

(efecto lineal), concentración inicial de azúcares reductores (efecto cuadrático), y finalmente, la concentración inicial de extracto de levadura (efecto cuadrático) (Fig. 31).

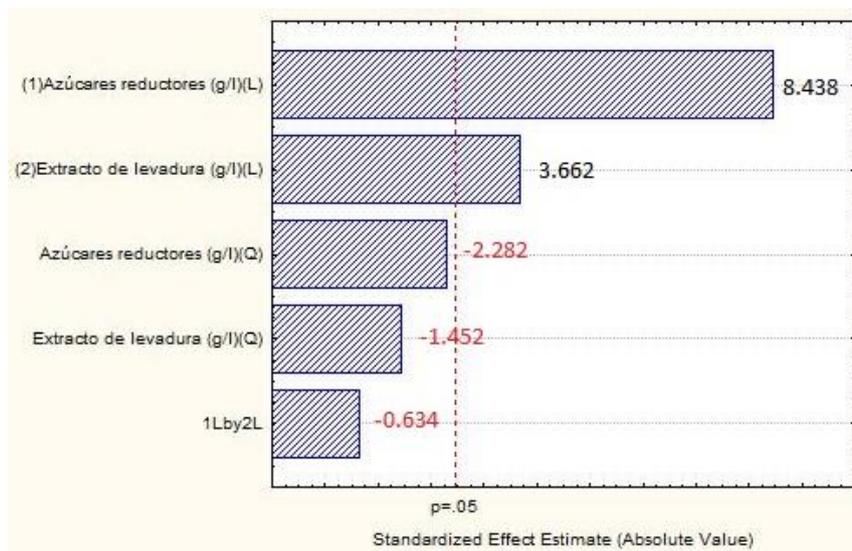


Figura 30. Gráfica de Pareto para el contenido de PHB (% PHB). (L): lineal, (Q): cuadrático. 1Lby2L: interacción lineal. Gráficos obtenidos con Statistica v8.0.

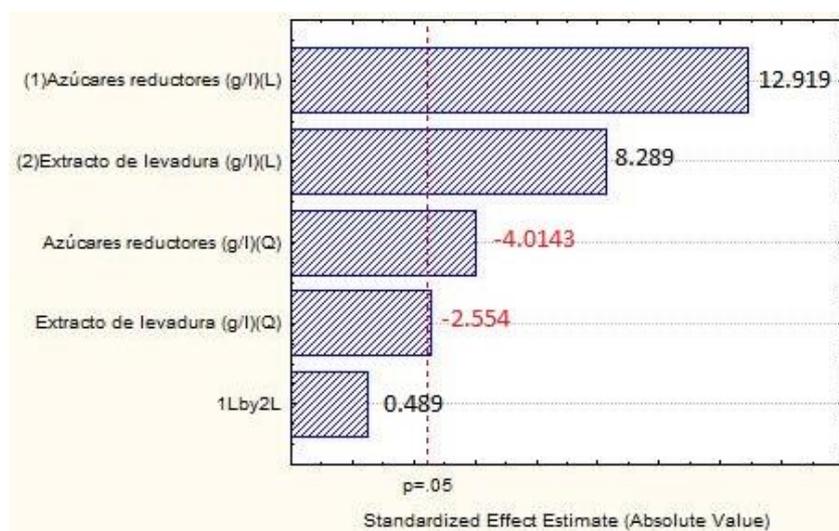


Figura 31. Gráfica de Pareto para la productividad de PHB (Q_{PHB}). (L): lineal, (Q): cuadrático. 1Lby2L: interacción lineal. Gráficos obtenidos con Statistica v8.0.

4.5.1. Efecto de la concentración inicial de azúcares reductores

Los gráficos de Pareto (Fig. 30 y 31) revelaron un efecto principal lineal fuertemente positivo de la concentración inicial de azúcares reductores para todas las respuestas estudiadas (Q_{PHB} y %PHB). Esto significa que el valor de todas las respuestas se

incrementa cuando la concentración inicial de azúcares reductores en el medio incrementa.

El %*PHB* máximo alcanzado fue de 54% para una concentración de azúcares reductores de 34.14 g/L y 3 g/L de extracto de levadura. Por otra parte, la Q_{PHB} máxima fue de 0.1218 g/L.h para una concentración de azúcares de 30 g/L y 5 g/L de extracto de levadura (Cuadro 13). Sin embargo, el efecto de la concentración de azúcares reductores no es puramente lineal para la Q_{PHB} dado que el efecto cuadrático fue también significativo y negativo (aunque esta influencia era menor) (Fig. 31). Esto quiere decir que, las concentraciones iniciales de azúcares reductores muy bajas o muy elevadas no son las más adecuada para una producción eficiente de PHB, pero probablemente haya una región entre 30 y 35 g/L de azúcares reductores donde la productividad de PHB pueda ser maximizada. Desde el punto de vista del crecimiento, el comportamiento de esta variable tiene sentido, ya que la concentración de biomasa es menor a concentraciones de azúcares reductores iniciales bajas porque no permite mucho crecimiento, y también es menor a altas concentraciones iniciales probablemente por efectos de inhibición por sustrato (Mussatto & Roberto, 2008).

La variable concentración inicial de azúcares reductores fue empleada para modificar la concentración del hidrolizado en el medio, es decir, cuán concentrado o diluido está como parte del medio de cultivo. El hidrolizado no solo es una fuente de azúcares, también funciona como una fuente de nitrógeno y otros nutrientes (Mussatto & Roberto, 2008). Como se pudo observar en un ensayo preliminar, este hidrolizado, diluido a una concentración de azúcares de 20 g/L puede soportar una producción de biomasa y PHB determinadas (Cuadro 10). Al estar más concentrado, para tener concentraciones de azúcares reductores más elevadas, no solo la concentración de azúcares será mayor, sino también la de los demás componentes. Dado que los azúcares reductores son el principal componente del hidrolizado, se decidió modificar la composición del medio en base a esta variable. Esta misma estrategia la han empleado otros autores que trabajan con hidrolizados como fuente principal de carbono (Mussatto & Roberto, 2008; Sindhu et al., 2013), refiriéndose a la concentración de azúcares en el hidrolizado como variable independiente que influencia en la producción de PHB. En realidad, no se puede modificar de forma independiente esta concentración, a menos que se añadan azúcares como la glucosa, xilosa, etc. (Pejin, Radosavljević, Kocić-Tanackov, Djukić-Vuković, &

Mojović, 2017). De otra forma, la concentración de los azúcares se puede modificar únicamente mediante dilución o concentración del hidrolizado, como se realizó en este trabajo. Hay que tener en cuenta que al concentrar el hidrolizado para alcanzar concentraciones de azúcares reductores iniciales más elevadas, todos sus componentes aumentan en concentración, entre ellos los potenciales inhibidores. El incremento en la concentración de otros compuestos inhibitorios en el medio puede causar dificultades a los microorganismos (Mussatto & Roberto, 2008). Afortunadamente, los principales inhibidores estaban en concentraciones muy bajas como para afectar el proceso.

La concentración de azúcares en el medio determina el crecimiento y la producción de PHB (Narayanan & Ramana, 2012). Por ejemplo, a través de la razón C/N (Ahn, Jho, & Nam, 2015). Al aumentar la fuente de carbono del medio, se incrementa la relación carbono/nitrógeno (C/N (mol/mol), lo que tiene un efecto positivo sobre el %PHB en muchos microorganismos (Getachew & Woldesenbet, 2016). Los azúcares también pueden influenciar en la producción mediante su concentración, que puede llegar a ser inhibitoria si es muy elevada (Mussatto & Roberto, 2008), afectando negativamente el proceso.

En el caso de *Bacillus* sp. B23, que acumula PHB con el crecimiento y, de un hidrolizado con una concentración moderada de azúcares y sin presencia significativa de inhibidores, los azúcares tienen efecto en la medida que el nutriente limitante del hidrolizado esté disponible. Es decir, los azúcares no se consumirán significativamente si el nutriente limitante se consume primero, probablemente solo se utilizaría el carbono con fines de mantenimiento llegado ese punto. Si el nutriente limitante se termina, las cepas de *Bacillus* entran en fase estacionaria y se ha demostrado que en esta etapa generalmente el PHB se consume (Castro-Sowinski et al., 2010; Ramadas et al., 2009; Valappil, Rai, Bucke, & Roy, 2008). Claramente quedan azúcares reductores en grandes cantidades en el medio de cultivo (Cuadro 14), probablemente por un nutriente limitante no identificado. Otra opción para explicar estos remanentes es que a medida que se da la fermentación, se produzcan subproductos, incluidos ácidos, que ocasionan cambios en parámetros como el pH, que afecten la actividad de las células y las indispongan para seguir consumiendo los nutrientes del hidrolizado, a la vez que favorecen que los microorganismos entren en una fase estacionaria cuando el medio aún no está del todo gastado. La producción de inhibidores o ácidos orgánicos puede afectar el crecimiento y

la performance del microorganismo productor (Faccin et al., 2009). Por eso sería importante poder descartar el pH, por ejemplo, como limitante de la fermentación. Esto se podría hacer en un biorreactor con control de pH (Faccin et al., 2009). Así mismo, la aireación puede ser otro limitante. Quizá la densidad celular, para las condiciones del matraz, agitación y volumen del medio, es la máxima. Esto también se podría evaluar realizando el proceso a diferentes velocidades de agitación, para descartar limitación por oxígeno (Faccin et al., 2009). Con el medio de cultivo optimizado, se podrían revisar estos aspectos en estudios posteriores con esta cepa, para continuar mejorando el proceso de producción de PHB a partir de los residuos de la cervecería.

Cuadro 14. Resultados de consumo de azúcares reductores a las 24 horas de cultivo.

Variables		Azúcares reductores residuales (g/L)	% Azúcares consumidos	Q_{PHB} (g/L*h)	%PHB (% p/p)
X_1 (g/L)	X_2 (g/L)				
10	1	5.575	44.25	0.0123 ± 0.0015	22.001 ± 2.031
10	5	2.766	72.34	0.0445 ± 0.0019	31.038 ± 1.054
30	1	22.766	24.11	0.0817 ± 0.024	47.957 ± 1.666
30	5	17.936	40.21	0.1219 ± 0.0018	51.385 ± 0.989
5.86	3	1.706	70.90	0.0063 ± 0.0011	12.384 ± 2.327
34.14	3	19.497	42.89	0.1141 ± 0.0045	54.274 ± 1.762
20	0.17	13.49	32.55	0.0274 ± 0.0034	24.444 ± 3.051
20	5.83	9.055	54.72	0.1119 ± 0.0010	48.018 ± 0.087
20	3	9.697	51.51	0.0862 ± 0.0031	42.966 ± 1.2901

X_1 : concentración inicial de azúcares reductores; X_2 : concentración inicial de extracto de levadura

Para aumentar el aprovechamiento de los nutrientes del hidrolizado, incluidos los azúcares reductores, para la producción de PHB, se evaluó el efecto de suplementar el medio con extracto de levadura.

4.5.2. Efecto de la concentración inicial de extracto de levadura

La variable concentración inicial de extracto de levadura presentó un efecto principal lineal positivo (significativo a un nivel de confianza de 95%) para todas las respuestas estudiadas (Q_{PHB} y %PHB) (Fig. 31). La influencia lineal del extracto sobre el %PHB no

es tan grande como la de los azúcares reductores, y esto podría deberse a que, una mayor concentración inicial de extracto de levadura supone una mayor concentración de nitrógeno. Esto disminuye la relación C/N, lo que no es muy favorable para alcanzar %PHB altos en muchos casos (Ahn et al., 2015; Cui, Shi, & Gong, 2017; Faccin et al., 2009; Getachew & Woldesenbet, 2016). A pesar de esto, se observó un incremento del %PHB con el incremento de la concentración inicial de extracto de levadura en los niveles empleados en este trabajo. Resultados similares se obtuvieron con extracto de levadura y otras fuentes de nitrógeno complejas como la peptona, extracto de carne, etc. (Babruwad et al., 2015; Page, 1992b; Quillaguamán et al., 2007).

La proporción C/N inicial estuvo en un rango de 6.99 a 23.78 en el medio de cultivo (Anexo 3.2, Cuadro 20). Se observó que, si C/N era menor de 10, la acumulación de PHB no se veía favorecida. Por otro lado, si C/N era mayor de 10, la acumulación era mayor, pero dependía de la concentración inicial de azúcares reductores. Fue necesario que hubiese una concentración inicial de azúcares reductores mayores a 20 g/L para tener acumulación del polímero alrededor del 50% con esta cepa (Anexo 3.2 Fig. 52). Por su parte, una concentración inicial de extracto de levadura entre 1 y 5.83 g/L era favorable siempre que se cumpliera con el requerimiento anterior de los azúcares.

De las gráficas de Pareto (Fig. 30 y 31) también se observó que el comportamiento de la variable concentración inicial de extracto de levadura era fuertemente lineal para la Q_{PHB} , lo que tiene sentido para un microorganismo que acumula PHB con el crecimiento, como la cepa *Bacillus* sp. B23. Según esta relación, una mayor concentración inicial de extracto de levadura en el medio aumenta la productividad de PHB porque la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento y la acumulación aumenta (Borah et al., 2002; López et al., 2012). En un cultivo por lote, una alta productividad de PHB es proporcional a una alta concentración de biomasa si el crecimiento no está limitado por nutrientes (Koller, 2018a). Además de este comportamiento lineal, se observó que el efecto cuadrático de la concentración inicial de extracto de levadura también era significativo y negativo para la Q_{PHB} (a un nivel de confianza de 95%). Esto quiere decir que la concentración de extracto de levadura más baja no es la más adecuada para una alta Q_{PHB} , pero tampoco concentraciones muy altas, por lo que existe una región entre 3 y 6 g/L de extracto de levadura donde la Q_{PHB} puede ser maximizada.

Adicionalmente se cuantificó el consumo del nitrógeno total remanente en el medio a las 24 horas. Los resultados se muestran en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Resultados del consumo de nitrógeno a las 24 horas de cultivo.

Variables		Nitrógeno total inicial (mg/L)	Nitrógeno total final (mg/L)	% N consumido	Q_{PHB} (g/L*h)	%PHB (% p/p)
X_1 (g/L)	X_2 (g/L)					
10	1	285	210	26.3	0.0123 ± 0.0015	22.001 ± 2.031
10	5	671	480	28.5	0.0445 ± 0.0019	31.038 ± 1.054
30	1	661	408	38.3	0.0817 ± 0.024	47.957 ± 1.666
30	5	1048	720	31.3	0.1219 ± 0.0018	51.385 ± 0.989
5.86	3	400	308	23.0	0.0063 ± 0.0011	12.384 ± 2.327
34.14	3	930	402	56.8	0.1141 ± 0.0045	54.274 ± 1.762
20	0.17	393	252	35.9	0.0274 ± 0.0034	24.444 ± 3.051
20	5.83	940	366	61.1	0.1119 ± 0.0010	48.018 ± 0.087
20	3	666	369	44.6	0.0862 ± 0.0031	42.966 ± 1.2901

X_1 : concentración inicial de azúcares reductores; X_2 : concentración inicial de extracto de levadura

Se observó que el consumo del nitrógeno fue parcial, siendo entre 23 y 61 % de la concentración inicial. Por tanto, hay una gran probabilidad de que otro nutriente estuviese actuando como limitante a las 24 horas del cultivo, que impidió a las células seguir consumiendo el nitrógeno del medio para el crecimiento y la producción de PHB. Otra opción es que el tiempo de fermentación no haya sido lo suficientemente largo para completar el consumo del nitrógeno y azúcares disponibles. Se decidió realizar el estudio a un solo tiempo puesto que hacer el seguimiento requiere recursos, tiempo y trabajo, como puntos de seguimiento se hagan de las fermentaciones. Al seleccionar un tiempo de 24 horas de fermentación, en base a los ensayos previos, se están comparando las condiciones del medio en las que un mismo microorganismo puede producir PHB más

rápido, por lo que es razonable emplear esta estrategia. Otros investigadores han analizado sus resultados de la misma manera (Ahn et al., 2015; Faccin et al., 2009).

Una vez seleccionadas las condiciones que promueven una mayor producción de PHB a las 24 horas se puede realizar un seguimiento por más tiempo en estas condiciones óptimas. Por otro lado, también se debe considerar que en el caldo de cultivo hay compuestos nitrogenados producidos por los microorganismos como enzimas u otras proteínas (Ramadas et al., 2009) que no se precipitan por la centrifugación al momento de remover la biomasa y que pueden contribuir a la concentración de nitrógeno total remanente. En los sustratos empleados, el nitrógeno se encuentra en forma orgánica, como parte de aminoácidos, factores de crecimiento (purinas, pirimidinas), péptidos y proteínas, que deberían ser fácilmente asimilables por el microorganismo empleado en este trabajo, por lo que se descartaría la presencia de compuestos nitrogenados no asimilables.

Del Cuadro 13 de consumo de azúcares, se observó que efectivamente un incremento en la concentración de extracto de levadura aumentaba el consumo de los azúcares, aprovechándose mejor los nutrientes del hidrolizado. Esto tuvo un impacto beneficioso en el crecimiento y acumulación de PHB, como se preveía. Y también confirma que la limitación probablemente no tenga que ver con parámetros como el pH o la aireación, al menos en las condiciones de los ensayos, sino de una limitación por algún nutriente en el hidrolizado. Identificar este nutriente requiere un trabajo de prospección más amplio, con un diseño experimental apropiado ya que se tendrían que probar múltiples nutrientes a diferentes concentraciones. Por ejemplo, se podría emplear un diseño Plackett-Burman para conocer cómo afectan diferentes suplementos nutricionales, como elementos traza, fuentes de fósforo, nitrógeno, azufre, etc. (Grothe et al., 1999). Incluso se podría evaluar el caldo de cultivo remanente del proceso de fermentación descrito, reutilizándolo en un nuevo lote, donde se suplemente con otros nutrientes mediante un diseño Plackett-Burman, ya que, si en algún ensayo se observa crecimiento y producción de PHB, el nutriente añadido en ese ensayo vendría a ser el nutriente limitante, porque permite que se continúe el consumo de los demás nutrientes del medio, que de otra forma no podrían ser utilizados por los microorganismos.

4.5.3. Optimización estadística de la producción de PHB

Con los datos experimentales del Cuadro 13, se realizaron análisis de regresión para ajustar las respuestas (Q_{PHB} y $\%PHB$). Para minimizar la determinación de errores, el efecto cuadrático de la concentración de extracto de levadura (X_2) y las interacciones de las dos variables independientes (X_1X_2), que no eran significativas (a un nivel de confianza de 95%) para la respuesta $\%PHB$ y Q_{PHB} , se mantuvieron en los modelos. Los modelos expresados por las ecuaciones 1 y 2, donde las variables tomaron sus valores codificados, representan la productividad de PHB (Q_{PHB}) y el contenido de PHB ($\%PHB$), respectivamente, en función de la concentración de azúcares reductores (x_1) y la concentración de extracto de levadura (x_2).

$$Q_{PHB}(g/L \cdot h) = 0.086245 + 0.03739x_1 + 0.023991x_2 - 0.012988x_1^2 - 0.008263x_2^2 + 0.002001x_1x_2 \quad (\text{ecuación 1})$$

$$\%PHB = 42.96575 + 13.19308x_1 + 5.72556x_2 - 3.98966x_1^2 - 2.53866x_2^2 - 1.40237x_1x_2 \quad (\text{ecuación 2})$$

La significancia de los coeficientes de las variables codificadas fue determinada por la prueba T de Student y los valores p, que se muestran en los Cuadros 39 y 40 (Anexo 5.1). Un análisis de varianza (ANOVA) de los modelos fue requerido para confirmar los resultados obtenidos por el método gráfico de Pareto, y para determinar si los modelos eran adecuados. Para ello se evaluaron mediante la prueba F y el coeficiente de determinación (R^2) del ANOVA.

El ANOVA para el modelo de segundo orden de la respuesta $\%PHB$ (Anexo 5.2, Cuadro 41) indicó que el efecto lineal de la concentración de azúcares reductores y extracto de levadura eran términos significativos ($p < 0.05$). El valor-p más alto (1.5×10^{-4}) de los efectos significativos fue el de la concentración de azúcares reductores. La falta de ajuste en este modelo no fue significativa ($p = 1.13 \times 10^{-1}$). Esto indica que el modelo refleja la relación real entre la concentración de los sustratos en los niveles elegidos. El R^2 para este modelo fue de 0.938. Aproximadamente el 93.8% de la variabilidad en la respuesta puede ser explicada por el modelo ajustado en forma codificada de la ecuación 1. El valor de R^2 siempre está entre 0 y 1 (Myers, Montgomery, & Anderson-Cook, 2016), y un valor de >0.70 indica la aptitud del modelo según (Bora, 2013; Narayanan & Ramana, 2012).

Adicionalmente se determinó el coeficiente de determinación R^2 ajustado. Este valor asegura el ajuste satisfactorio del modelo polinomial a los datos experimentales. El valor ajustado de R^2 corrige el R^2 para el tamaño de la muestra y el número de términos en el modelo. En este caso, el valor ajustado de R^2 fue de 0.887. Cuando los valores de R^2 y R^2 ajustado difieren dramáticamente, hay una gran probabilidad de que se hayan incluido términos no significativos al modelo (Myers et al., 2016). Los términos cuadráticos y la interacción lineal se incluyeron al modelo, y al ser no significativos, explican la disminución del R^2 ajustado.

El ANOVA para el modelo de segundo orden de la respuesta Q_{PHB} (Anexo 5.2, Cuadro 42) indicó que el efecto lineal y cuadrático de la concentración de azúcares reductores y extracto de levadura eran términos significativos ($p < 0.05$). El valor-p más alto (1.3×10^{-5}) de los efectos significativos fue el de la concentración de azúcares reductores. La falta de ajuste en este modelo no fue significativa ($p = 2.52 \times 10^{-1}$), indicando que el modelo refleja la relación real entre la concentración de los sustratos en los niveles elegidos. El R^2 para este modelo fue de 0.977. Aproximadamente el 97.7% de la variabilidad en la respuesta puede ser explicada por el modelo ajustado en forma codificada de la ecuación 2. Para este modelo el valor ajustado de R^2 fue de 0.958, muy similar al R^2 ya que solo se incluyó un término no significativo (la interacción lineal).

En las Fig. 32 y 33 se muestran los gráficos de superficie de respuesta de Q_{PHB} y $\%PHB$ para las variables concentración inicial de azúcares reductores y concentración inicial de extracto de levadura. Los gráficos de contorno 2D y los gráficos de superficie de respuesta 3D generalmente son representaciones gráficas de la ecuación de regresión, y se puede inferir la interacción entre las variables a partir de la forma de la superficie (Narayanan & Ramana, 2012). Nótese que ambas superficies ajustadas tienen una región donde los valores de Q_{PHB} y $\%PHB$ pueden ser maximizados, los límites de estas regiones se visualizan más claramente en los gráficos de contorno. Esta región corresponde, en ambos casos, a concentraciones de azúcares reductores entre 30 y 40 g/L, y a concentraciones de extracto de levadura entre 5 y 7 g/L para la respuesta de Q_{PHB} y entre 3 y 6 g/L para la respuesta de $\%PHB$. Como era de esperarse, una menor concentración inicial de extracto de levadura promueve un incremento en $\%PHB$, mientras que una mayor concentración promueve un incremento en la productividad. Al disminuir la concentración del extracto de levadura, aumenta la relación C/N, lo que tiende a mejorar la acumulación de PHB en

los microorganismos (Ahn et al., 2015; Cui et al., 2017; Faccin et al., 2009; Getachew & Woldesenbet, 2016).

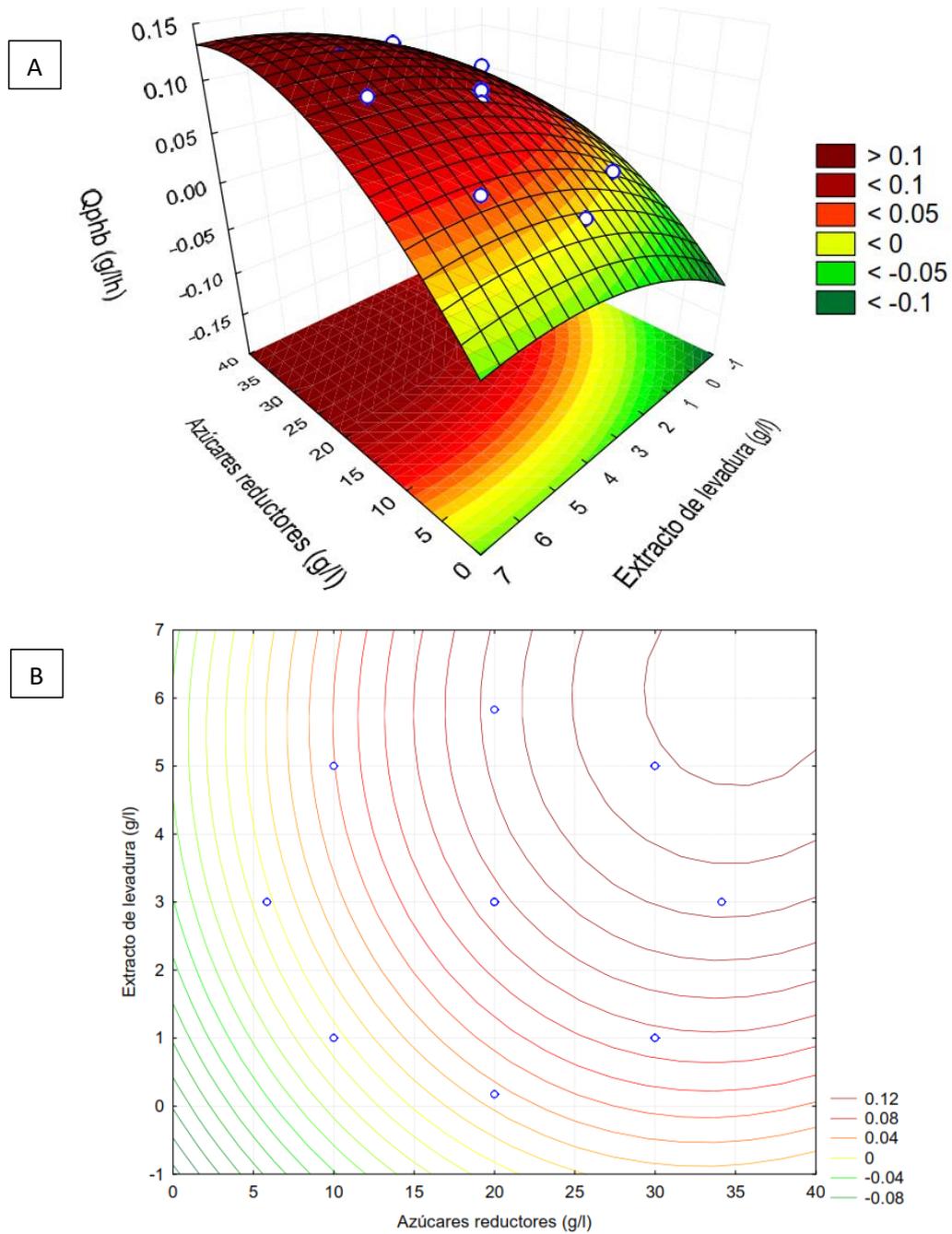


Figura 32. (A) Gráfico de superficie de respuesta y (B) gráfico de contorno para la productividad (Q_{PHB}) en función de la concentración inicial de azúcares reductores y concentración inicial de extracto de levadura (Gráficos realizados con el software Statistica v 8.0).

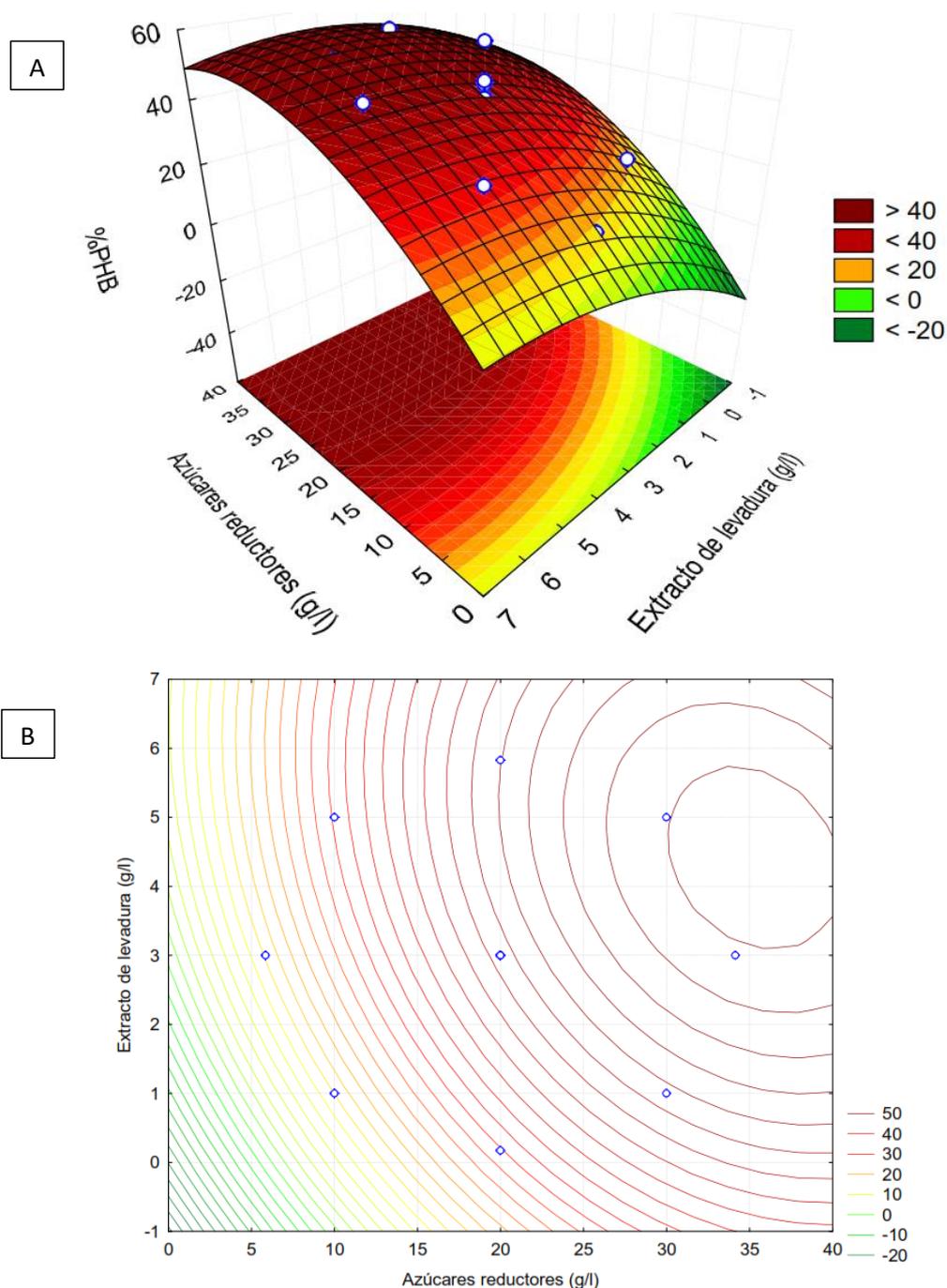


Figura 33. (A) Gráfico de superficie de respuesta y (B) gráfico de contorno para el contenido de PHB (%PHB) en función de la concentración inicial de azúcares reductores y concentración inicial de extracto de levadura (Gráficos realizados con el software Statistica v 8.0).

Para optimizar múltiples respuestas, como en el caso del presente estudio, se suele emplear la técnica de optimización simultánea popularizada por Derringer y Suich, que hace uso de funciones de deseabilidad (Montgomery, 2017). En este caso, para obtener las condiciones óptimas de las variables independientes, se usó una función de

deseabilidad global. Básicamente de lo que se trataba era encontrar un compromiso entre las dos respuestas, Q_{PHB} y $\%PHB$, de forma que ambas pudieran ser maximizadas para una determinada concentración inicial de azúcares reductores y extracto de levadura óptimas. De acuerdo al programa Statistica v8.0, las concentraciones óptimas de las variables independientes fueron 34.14 g/L de azúcares reductores y 4.41 g/L de extracto de levadura (Anexo 5.3, Fig. 53), prediciendo una Q_{PHB} de 0.12798 y un $\%PHB$ de 55.021.

4.5.4. Validación del modelo

Los valores predichos por los modelos se confirmaron usando los valores óptimos de las concentraciones de azúcares reductores y extracto de levadura iniciales. El valor experimental fue 0.1245 ± 0.0007 para la productividad (Q_{PHB}) y 55.179 ± 0.258 para el contenido de PHB ($\%PHB$). Los valores experimentales comparados a los valores predichos fueron 97.33 % y 100.29 %, respectivamente. Los resultados del experimento de validación demostraron que, en promedio, hubo un aumento de aproximadamente 22% en $\%PHB$ respecto al valor obtenido en el punto central del diseño (Cuadro 16), y un aumento del 14% en el $\%PHB$ respecto al valor obtenido en otros ensayos (Cuadro 16). Así mismo, (Q_{PHB}) aumentó, en promedio, en un 31% (Cuadro 16) respecto a los ensayos no optimizados.

Cuadro 16: Comparación de ensayos no optimizados y el ensayo optimizado.

Ensayo	$\%PHB$ (g PHB*100% / g biomasa)	Q_{PHB} (g/L.h)	X (g/L)	P (g/L)
Punto central*	42.96	0.086	4.82	2.07
H + EL**	47.4	0.086	3.97	1.88
Optimizado***	55.18	0.1245	5.41	3.00

*Punto central del diseño experimental con 20 g/L de azúcares reductores y 3 g/L de extracto de levadura. Los valores están promediados entre los cuatro puntos centrales. **Ensayo realizado en medio H + EL con 20 g/L de azúcares reductores y 2 g/L de extracto de levadura. (resultados en el Cuadro 11 para el medio H + EL). ***Ensayo realizado en medio H + EL con 34.14 g/L de azúcares reductores y 4.41 g/L de extracto de levadura. (resultados en el Cuadro 11 para el medio H + EL).

En comparación a otros trabajos, en este caso se alcanzaron %PHB relativamente altos (G.-Q. Chen et al., 1991; Valappil, Misra, et al., 2007; Yilmaz, Soran, & Beyatli, 2005). Algunos autores han reportado acumulaciones de PHB superiores al 50% en *Bacillus* (Borah et al., 2002; Mohapatra, Sarkar, et al., 2017; Santimano et al., 2009; Sindhu et al., 2013), sin embargo, en muchos casos el tiempo de fermentación es muy largo o el crecimiento muy pobre, lo que reduce la productividad dramáticamente.

Varios autores han sugerido el uso de residuos agroindustriales para la producción de PHB (Nielsen et al., 2017; Pakalapati et al., 2018). Los residuos lignocelulósicos son una materia prima para la elaboración de hidrolizados ricos en azúcares y otros nutrientes que pueden ser aprovechados por los microorganismos para la producción de PHA (Obruca, 2015). Se han reportado algunas investigaciones con residuos de la cervecería como fuente de nutrientes para la producción de PHB (Fuentes Olivera, 2013; Tamang, Banerjee, Köster, & Nogueira, 2019; Yu, Chua, Huang, Lo, & Chen, 1998). Sin embargo, no se encontraron reportes que usen dos de los residuos más abundantes como parte del mismo medio de cultivo. En este estudio se evaluó la producción de PHB empleando un hidrolizado de granos gastados de cervecería y un extracto de levadura cervecera residual, como única fuente de nutrientes. La cepa *Bacillus* sp. B23 no es exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales, y puede aprovechar los residuos de la industria de la cervecería gracias a la producción de numerosas enzimas hidrolíticas (Mohapatra, Sarkar, et al., 2017). (Mohapatra, Maity, et al., 2017) mencionan que la esporulación es el principal problema para la producción de PHB con *Bacillus*, sin embargo, el hecho que la cepa empleada en este estudio acumule PHB con el crecimiento, la hace atractiva para producir PHB en procesos por lote en poco tiempo. También se podrían realizar otras modalidades de cultivo como la de lote alimentado o cultivo continuo para extender la fase de crecimiento, y mejorar las productividades.

Otros investigadores han evaluado escenarios similares a los de este trabajo, variando los componentes de medios de cultivo complejos, principalmente la fuente de carbono y nitrógeno, para mejorar la producción de PHA (Aljuraifani, Berekaa, & Ghazwani, 2019; Narayanan & Ramana, 2012). Los resultados de este estudio demuestran que los residuos baratos y abundantes de la industria cervecera pueden ser empleados para la producción de PHB con la cepa *Bacillus* sp. B23, obteniendo más de 50% de PHB acumulado en la biomasa. Sin embargo, será necesario desarrollar nuevas estrategias para incrementar

mucho más la productividad de PHB de esta cepa, dado que los resultados no son lo suficientemente competitivos en comparación con cepas establecidas (Dey & Rangarajan, 2017; E. Grothe & Chisti, 2000; Koller & Braunegg, 2018; Wang & Lee, 1997).

V. CONCLUSIONES

- Se optimizó el medio de cultivo elaborado a partir de un hidrolizado de granos gastados de cervecería y suplementado con un extracto de levadura cervecera residual, para la producción de PHB por lote a nivel de matraces, con *Bacillus* sp. B23 como cepa productora. Las concentraciones iniciales de azúcares reductores y extracto de levadura óptimas para la producción de PHB fueron 34.14 g/L y 4.41 g/L, respectivamente. En estas condiciones se obtuvo una acumulación de 55% de PHB en biomasa y una productividad de 0.1245 g/L.h en 24 horas. A través de la optimización, se incrementó el contenido de PHB en un 22%, y la productividad volumétrica en un 31%, comparado con ensayos no optimizados.
- En las condiciones de los ensayos, un incremento en la concentración inicial de azúcares reductores promueve una mayor acumulación de PHB y una mayor productividad volumétrica al aumentar la relación C/N del medio. Así mismo, un incremento en la concentración inicial de extracto de levadura tiende a promover una mayor acumulación de PHB y productividad volumétrica a pesar de reducir la relación C/N del medio.
- La cepa *Bacillus* sp. B23 acumula PHB en asociación a su crecimiento. La degradación del PHB inicia al finalizar la fase exponencial y durante la fase estacionaria, por tanto, el tiempo de fermentación debe ser controlado alrededor de las 24 horas para prevenir pérdidas del PHB producido en un cultivo por lote.
- La cepa *Bacillus* sp. B23 puede utilizar los sustratos residuales de la cervecería como única fuente de nutrientes con resultados comparables a los obtenidos en medios definidos.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la cinética completa de producción de PHB de *Bacillus* sp. B23 en las condiciones óptimas de este estudio.
- Comprobar la escalabilidad de las condiciones óptimas de este estudio a nivel de biorreactor en lote, con control de pH y otras modalidades de cultivo, como lote alimentado.
- Evaluar otros parámetros de la fermentación como la agitación, aireación, control de pH, pH inicial, y la concentración inicial de otros nutrientes, para mejorar la productividad volumétrica de PHB con la cepa *Bacillus* sp. B23 y los residuos de la cervecería, mediante diseños experimentales de screening y factoriales.
- Identificar el nutriente limitante del medio H + EL suplementando diferentes compuestos según un diseño experimental Plackett-Burman o similar, para aumentar la productividad de PHB y mejorar el aprovechamiento de los sustratos.
- Cuantificar y estudiar el consumo de los azúcares principales presentes en el medio de cultivo H + EL (glucosa, xilosa y arabinosa) durante la producción de PHB con *Bacillus* sp. B23.
- Evaluar la posibilidad de reusar el medio de cultivo parcialmente gastado para un nuevo ciclo de producción adicionando nutrientes según un diseño experimental Plackett-Burman o similar.
- Evaluar condiciones más severas de hidrólisis ácida para aumentar la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado de granos gastados de cervecería.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

- Adney, B., & Baker, J. (2008). *Measurement of Cellulase Activities*. Recuperado de <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42628.pdf>
- Ahluwalia, V. K., & Raghav, S. (1997). *Comprehensive Experimental Chemistry*. New Age International (P) Limited.
- Ahn, J., Jho, E. H., & Nam, K. (2015). Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. *Environmental Engineering Research*, 20(3), 246–253. <https://doi.org/10.4491/eer.2015.055>
- Albuquerque, P. B. S., & Malafaia, C. B. (2017). Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026>
- Aljuraifani, A. A., Berekaa, M. M., & Ghazwani, A. A. (2019). Bacterial biopolymer (polyhydroxyalkanoate) production from low-cost sustainable sources. *MicrobiologyOpen*, 8(6), 7. <https://doi.org/10.1002/mbo3.755>
- Amirul, A. A., Huong, K. H., Ramachandran, H., & Kannusamy, S. (2015). *Microbial-based polyhydroxyalkanoates: Upstream and downstream processing*.
- Atlas, R. (2010). *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1201/EBK1439804063>
- Atlić, A., Koller, M., Scherzer, D., Kutschera, C., Grillo-Fernandes, E., Horvat, P., ... Braunegg, G. (2011). Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(2), 295–304. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3260-0>
- Babruwad, P. R., Prabhu, S. U., Upadhyaya, K. P., & Hungund, B. S. (2015). Production and characterization of thermostable polyhydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PW3A. *Journal of Biochemical Technology*, 6(3), 990–995. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/8ae7/cd7267193c2a3d01dfa407b3b6c1dc98aa4a.pdf>

- Backus. (2011). Reporte de Desarrollo Sostenible 2011. Recuperado de <http://backus.pe/pdf/Reporte-Desarrollo-Sostenible-2011-Backus.pdf>
- Backus. (2017). Memoria anual 2017. Recuperado de <http://backus.pe/pdf/Memoria-Anual-2017-Backus.pdf>
- BD Biosciences. (s/f). *Animal-Free Peptones and Yeast Extracts*. Recuperado de https://www.bdbiosciences.com/documents/tat_animalfree_peptones.pdf
- Bhagowati, P., Pradhan, S., Dash, H. R., & Das, S. (2015). Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 79(9), 1454–1463. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1034651>
- Blunt, W., Levin, D., Cicek, N., Blunt, W., Levin, D. B., & Cicek, N. (2018). Bioreactor Operating Strategies for Improved Polyhydroxyalkanoate (PHA) Productivity. *Polymers*, 10(11), 1197. <https://doi.org/10.3390/polym10111197>
- Bora, L. (2013). Polyhydroxybutyrate Accumulation in *Bacillus megaterium* and Optimization of Process Parameters Using Response Surface Methodology, 415–420. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0529-z>
- Borah, B., Thakur, P. S., & Nigam, J. N. (2002). The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 776–783. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01590.x>
- Braunegg, G., Lefebvre, G., Renner, G., Zeiser, A., & Haage, G. (1995). Kinetics as a tool for polyhydroxyalkanoate production optimization. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(Suppl. 1), 239–248.
- Bunk, B., Biedendieck, R., Jahn, D., & Vary, P. S. (2010). *Bacillus Megaterium* and Other Bacilli: Industrial Applications. En *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* (pp. 1–15). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib063>
- Byrom, D. (1987). Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends in Biotechnology*, 5(9), 246–250. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(87\)90100-4](https://doi.org/10.1016/0167-7799(87)90100-4)

- Carvalho, F., Esteves, M. P., Parajó, J. C., Pereira, H., & Gírio, F. M. (2004). Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*, *91*(1), 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00148-2)
- Castro-Sowinski, S., Burdman, S., Matan, O., & Okon, Y. (2010). Natural Functions of Bacterial Polyhydroxyalkanoates (pp. 39–61). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_3
- Chen, G.-Q. (2010). Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates (pp. 17–37). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_2
- Chen, G.-Q., König, K.-H., & Lafferty, R. M. (1991). Occurrence of poly-d(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *Fems Microbiology Letters*, *84*(2), 173–176. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04592.x>
- Chen, G.-Q., & Patel, M. K. (2012). Plastics derived from biological sources: Present and future: A technical and environmental review. *Chemical Reviews*, *112*(4), 2082–2099. <https://doi.org/10.1021/cr200162d>
- Chen, H. (2014). *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Springer.
- Choi, J., & Lee, S. Y. (1997). Process analysis and economic evaluation for Poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*, *17*(6), 335–342. <https://doi.org/10.1007/s004490050394>
- Cui, Y.-W., Shi, Y.-P., & Gong, X.-Y. (2017). Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. *RSC Adv.*, *7*(31), 18953–18961. <https://doi.org/10.1039/C7RA02131C>
- Dávila, J. A., Rosenberg, M., & Cardona, C. A. (2016). A biorefinery approach for the production of xylitol, ethanol and polyhydroxybutyrate from brewer's spent grain. *AIMS Agriculture and Food*, *1*(1), 52–66. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2016.1.52>
- Dey, P., & Rangarajan, V. (2017). Improved fed-batch production of high-purity PHB (poly-3 hydroxy butyrate) by *Cupriavidus necator* (MTCC 1472) from sucrose-

- based cheap substrates under response surface-optimized conditions. *3 Biotech*, 7(5), 310. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0948-6>
- Díaz-Barrera, A., Andler, R., Martínez, I., & Peña, C. (2016). Poly-3-hydroxybutyrate production by *Azotobacter vinelandii* strains in batch cultures at different oxygen transfer rates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(4), 1063–1071. <https://doi.org/10.1002/jctb.4684>
- Dietrich, D., Illman, B., & Crooks, C. (2013). Differential sensitivity of polyhydroxyalkanoate producing bacteria to fermentation inhibitors and comparison of polyhydroxybutyrate production from *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas pseudoflava*. *BMC Research Notes*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-219>
- Egli, T. (2009). Nutrition, Microbial. En *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 308–324). <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00083-3>
- Egli, T. (2015). Microbial growth and physiology: A call for better craftsmanship. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00287>
- EURASYP. (s/f). *Yeast Extract*. Recuperado de http://hefeextrakt.info/public/documents/yeast-products/yeast_extract.pdf
- European Bioplastics. (2017). What are bioplastics? Recuperado de http://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP_FS_What_are_bioplastics.pdf
- Faccin, D. J. L., Martins, I., Cardozo, N. S. M., Rech, R., Ayub, M. A. Z., Alves, T. L. M., ... Secchi, A. R. (2009). Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(12), 1756–1761. <https://doi.org/10.1002/jctb.2240>
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., & Tavarela, J. G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 21(2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.008>

- Folsom, J. P., & Carlson, R. P. (2015). Physiological , biomass elemental composition and proteomic analyses of *Escherichia coli* ammonium- limited chemostat growth , and comparison with iron- and glucose-limited chemostat growth. *Microbiology*, *161*(8), 1659–1670. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000118>
- Fuentes Olivera, A. J. (2013). Influencia de la concentración inicial de azúcares reductores y la temperatura de fermentación en el rendimiento de un bioplástico a partir del hidrolizado de granos usados de cervecería empleando *Pseudomonas aeruginosa*.
- Gao, X., Chen, J. C., Wu, Q., & Chen, G.-Q. (2011). Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(6), 768–774. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.06.005>
- Getachew, A., & Woldeesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, *3*(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Gilbert, M. (2016). *Brydson's Plastics Material*. (M. Gilbert, Ed.) (8th ed.). Elsevier.
- Giourieva, V. S., Papi, R. M., & Pantazaki, A. A. (2019). Polyhydroxyalkanoates: New browsing the PHA biosynthesis insights in native and recombinant strains. En Harvey; Williams & P. Kelly (Eds.), *Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis, Chemical Structures and Applications*.
- Grothe, E., & Chisti, Y. (2000). Poly(β -hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: Behavior of fed-batch cultures. *Bioprocess Engineering*, *22*, 441–449. <https://doi.org/10.1007/s004490050757>
- Grothe, Enrico, Moo-Young, M., & Chisti, Y. (1999). Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, *25*(1–2), 132–141. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00023-X)
- Halami, P. M. (2008). Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native

isolate *Bacillus cereus* CFR06, 805–812. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9543-z>

Halevas, E. G., & Pantazaki, A. A. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Chemical Structure. In Harvey Williams & P. Kelly (Eds.), *Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis, Chemical Structures and Applications*. Nova Science Publishers, Inc.

Hamieh, A., Olama, Z., & Holail, H. (2013). Microbial production of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic using agro-industrial waste. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 2(3), 54–64.

Hartley Yee, L., & Ray Foster, L. J. (2014). CHAPTER 8. Polyhydroxyalkanoates as Packaging Materials: Current Applications and Future Prospects (pp. 183–207). <https://doi.org/10.1039/9781782622314-00183>

Hausman, J., Strauss, J., Ertan, H., & Siddiqui, K. S. (2016). Lignocellulosic biomass : Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Engineering in Life Sciences*, 16, 1–16. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400196>

Heldal, M., Norland, S., Fagerbakke, K. M., Thingstad, F., & Bratbak, G. U. N. N. A. R. (1997). The Elemental Composition of Bacteria : a Signature of Growth Conditions ?, 33(97).

Isikgor, F. H., & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/c5py00263j>

Israni, N., & Shivakumar, S. (2013). Combinatorial screening of hydrolytic enzyme/s and PHA producing *Bacillus* spp., for cost effective production of PHAs. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(3), 934–945.

Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes), 191(10), 3195–3202. <https://doi.org/10.1128/JB.01723-08>

Jendrossek, D., & Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly (3-hydroxybutyrate), 16, 2357–2373. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356>

- Kanauchi, O., Mitsuyama, K., Araki, Y., Kanauchi, O., Ctr, A. B., Corporated, R., ... Co, K. B. (2001). The Science of Beer Development of a Functional Germinated Barley Foodstuff from Brewer ' s Spent Grain for the Treatment of Ulcerative Colitis Development of a Functional Germinated Barley Foodstuff from Brewer ' s Spent Grain for the Treatment of Ulcera. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 59(2), 59–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/ASBCJ-59-0059>
- Kaur, G. (2015). Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 157–172. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2255>
- Kaur, G., Uisan, K., Ong, K. L., & Ki Lin, C. S. (2018). Recent Trends in Green and Sustainable Chemistry & Waste Valorisation: Rethinking Plastics in a circular economy. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 9, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2017.11.003>
- Kaur, L., Khajuria, R., Parihar, L., & Singh, G. D. (2017). Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis To Commercial Production: a Review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(4), 1098–1106. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.4.1098-1106>
- Koller, M. (2017). Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*, 4(4), 88. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4040088>
- Koller, M. (2018a). A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters, (March), 1–26. <https://doi.org/10.20944/preprints201803.0189.v1>
- Koller, M. (2018b). *Advances in polyhydroxyalkanoate (PHA) production*. (M. Koller, Ed.). MDPI. Recuperado de www.mdpi.com/journal/bioengineering
- Koller, M. (2018c). Biodegradable and biocompatible polyhydroxyalkanoates (PHA): Auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. *Molecules*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/molecules23020362>
- Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., & Braunegg, G. (2010). Microbial PHA Production from Waste Raw Materials (pp. 85–119). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_5

- Koller, M., & Braunegg, G. (2018). Advanced approaches to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable and economic fashion. *Bioprocess Engineering*, 2(2), 89–103. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2018-0013>
- Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Braunegg, G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*, 37, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. M. (2017). Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*, 4(2), 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>
- Krueger, C. L., & Radetski, C. M. (2012). Bioconversion of cassava starch by-product into *Bacillus* and related bacteria polyhydroxyalkanoates, 15. <https://doi.org/10.2225/vol15-issue3-fulltext-6>
- Kucera, D., Pernicová, I., Kovalcik, A., Koller, M., Mullerova, L., Sedlacek, P., ... Mullerova, L. (2018). Characterization of the promising poly (3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.062>
- Küng, W. (1982). *Growth and poly[(R)-3-hydroxybutyrate] accumulation by Alcaligenes latus*. Graz University of Technology.
- Lee, S. Y. (2000). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1), 1–14. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P)
- Li, J., Xu, Y., Zhang, M., & Wang, D. (2017). Determination of Furfural and 5 - Hydroxymethylfurfural in Biomass Hydrolysate by High-Performance Liquid Chromatography. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b02827>
- López, J. A., Naranjo, J. M., Higueta, J. C., Cubitto, M. A., Cardona, C. A., & Villar, M. A. (2012). Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(2), 250–258. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0448-1>

- MACHEREY-NAGEL. (2016). *NANOCOLOR® Nitrógeno total TNb 22*. Düren - Alemania. Recuperado de http://ftp.mn-net.com/espanol/hoja_de_instrucciones/NANOCOLOR/985083es.pdf
- MACHEREY-NAGEL. (2019). *NANOCOLOR® Amonio 3*. Düren-Alemania. Recuperado de http://ftp.mn-net.com/espanol/hoja_de_instrucciones/NANOCOLOR/985003es.PDF
- Mahmoudi, M., Baei, 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. <https://doi.org/10.5897/AJB10.020>
- Mathias, T. R. dos S., Alexandre, V. M. F., Cammarota, M. C., Mello, P. P. M., & Sérvulo, E. F. C. (2015). Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), 400–404. <https://doi.org/10.1002/jib.229>
- Mathias, T. R. dos S., de Aguiar, P. F., Silva, J. B. de A., de Mello, P. P. M., & Sérvulo, E. F. C. (2017). Brewery Wastes Reuse for Protease Production by Lactic Acid Bacteria Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 55(2), 218–224. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4378>
- Meneses, N. G. T., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.015>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mohandas, S. P., Balan, L., Jayanath, G., Anoop, B. S., Philip, R., Cubelio, S. S., & Bright Singh, I. S. (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. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.07.044>

- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C., & Samantaray, D. (2017). Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *12*(2017), 206–213.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>
- Mohapatra, S., Sarkar, B., Samantaray, D. P., Daware, A., Maity, S., Pattnaik, S., & Bhattacharjee, S. (2017). Bioconversion of fish solid waste into PHB using *Bacillus subtilis* based submerged fermentation process. *Environmental Technology*, *38*(24), 3201–3208. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1291759>
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments* (9th ed.). Wiley.
- Możejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, *192*, 271–282.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>
- Muhr, A., Rechberger, E. M., Salerno, A., Reiterer, A., Malli, K., Strohmeier, K., ... Koller, M. (2013). Novel Description of mcl-PHA Biosynthesis by *Pseudomonas chlororaphis* from Animal-Derived Waste. *Journal of Biotechnology*, *165*(1), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.02.003>
- Mussatto, S. I. (2009). Biotechnological potential of brewing industry by-products. En *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (pp. 313–326). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_16
- Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(7), 1264–1275.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2012). Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. En *Industrial Waste*.
<https://doi.org/10.5772/36310>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, *43*(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2005). Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,

85(14), 2453–2460. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2276>

- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2006). Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *81*(3), 268–274. <https://doi.org/10.1002/jctb.1374>
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2008). Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry*, *43*(5), 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.013>
- Mussatto, S. I., & Teixeira, J. A. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. En A. Méndez-Vilas (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (pp. 897–907). Formatex.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (4th ed.). Wiley.
- Nakajima, H., Dijkstra, P., & Loos, K. (2017). The Recent Developments in Biobased Polymers toward General and Engineering Applications: Polymers that are Upgraded from Biodegradable Polymers, Analogous to Petroleum-Derived Polymers, and Newly Developed. *Polymers*, *9*(12), 523. <https://doi.org/10.3390/polym9100523>
- Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higuera, J. C., & Cardona, C. A. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, *133*, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.129>
- Narayanan, A., & Ramana, K. V. (2012). Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters. *3 Biotech*, *2*(4), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0054-8>
- Nehra, K., Jamdagni, P., & Lathwal, P. (2017). Bioplastics: A Sustainable Approach Toward Healthier Environment. En *Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments* (pp. 297–314). Singapore: Springer Singapore.

https://doi.org/10.1007/978-981-10-4732-9_15

Nielsen, C., Rahman, A., Rehman, A. U., Walsh, M. K., & Miller, C. D. (2017). Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. *Microbial Biotechnology*, 0. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12776>

NREL, & MRI. (1998). *Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures*.

Obruca, S. (2015). Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 135–144. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2253>

Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Krzyzanek, V., Nebesarova, J., Samek, O., ... Marova, I. (2017). The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology*, 39, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.008>

Osman, Y., Elrazak, A. A., & Khater, W. (2016). Bioprocess Optimization of Microbial Biopolymer Production. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 10(April), 1–10. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2016.1582>

Page, W. J. (1992a). Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 117–121. <https://doi.org/10.1007/BF00169430>

Page, W. J. (1992b). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. *FEMS Microbiology Letters*, 103(2–4), 149–157. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90304-7](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90304-7)

Pakalapati, H., Chang, C., Show, P. L., Arumugasamy, S. K., & Lan, J. C. (2018). Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>

Pejin, J., Radosavljević, M., Kocić-Tanackov, S., Djukić-Vuković, A., & Mojović, L. (2017). Lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate by *Lactobacillus rhamnosus* with yeast extract addition and pH control. *Journal of the*

- Institute of Brewing*, 123(1), 98–104. <https://doi.org/10.1002/jib.403>
- Plastics Europe. (2017). *Plastics – the Facts 2017: An analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data*. Recuperado de https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website_one_page.pdf
- Podpora, B., Świdorski, F., Sadowska, A., Rakowska, R., & Wasiak-Zys, G. (2016). Spent brewer's yeast extracts as a new component of functional food. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(No. 6), 554–563. <https://doi.org/10.17221/419/2015-CJFS>
- Pollet, E., & Avérous, L. (2011). Production, Chemistry and Properties of Polyhydroxyalkanoates. En *Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings* (pp. 65–86). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119994312.ch4>
- Quillaguamán, J., Muñoz, M., Mattiasson, B., & Hatti-kaul, R. (2007). Optimizing conditions for poly (β -hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source, 981–986. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0754-2>
- Ramadas, N. V., Singh, S. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(1), 17–23. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000100003>
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126(January 2017), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>
- Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Miranda-de Sousa Dias, M., Calafell-Monfort, M., Braunegg, G., & Marqués-Calvo, M. S. (2013). High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1378–1387. <https://doi.org/10.1111/jam.12151>
- Rodríguez-Perez, S., Serrano, A., Panti6n, A. A., & Alonso-Fari6nas, B. (2018).

- Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *Journal of Environmental Management*, 205, 215–230.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>
- Rowell, R. M., Young, R. A., & Rowell, J. K. (1996). *Paper and Composites from Agro-Based Resources*. CRC Lewis Publishers.
- Salehizadeh, H., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 22(3), 261–279.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.003>
- Sangkharak, K., & Prasertsan, P. (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(3), 173–182. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.173>
- Santimano, M. C., Prabhu, N. N., & Garg, S. (2009). PHA Production Using Low-Cost Agro-Industrial Wastes by *Bacillus* sp. Strain COL1/A6. *Research Journal of Microbiology*, 4(3), 89–96. <https://doi.org/10.3923/jm.2009.89.96>
- Serafim, L. S., Lemos, P. C., Albuquerque, M. G. E., & Reis, M. A. M. (2008). Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1757-y>
- Silva, J. P., Sousa, S., Rodrigues, J., Antunes, H., Porter, J. J., Gonçalves, I., & Ferreira-Dias, S. (2004). Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains. *Separation and Purification Technology*, 40(3), 309–315.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.03.010>
- Silva, L. F., Taciro, M. K., Michelin Ramos, M. E., Carter, J. M., Pradella, J. G. C., & Gomez, J. G. C. (2004). Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31(6), 245–254. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0136-7>
- Simpson, W. G. (1995). *Plastics: Surface and Finish* (2nd ed.). The Royal Society of

Chemistry.

Sindhu, R., Silviya, N., Binod, P., & Pandey, A. (2013). Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 67–72.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.12.015>

Singh Saharan, B., Grewal, A., & Kumar, P. (2014). Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. *Chinese Journal of Biology*, 2014, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/802984>

Sukan, A., Roy, I., & Keshavarz, T. (2014). Agro-Industrial Waste Materials as Substrates for the Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 05(04), 229–240.

<https://doi.org/10.4236/jbnb.2014.54027>

Tamang, P., Banerjee, R., Köster, S., & Nogueira, R. (2019). Comparative study of polyhydroxyalkanoates production from acidified and anaerobically treated brewery wastewater using enriched mixed microbial culture. *Journal of Environmental Sciences*, 78, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.09.001>

Tan, D., Yin, J., & Chen, G.-Q. (2017). Production of Polyhydroxyalkanoates. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 655–692.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00029-4>

TAPPI. (2009). *Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp*. Recuperado de <https://research.cnr.ncsu.edu/wpsanalytical/documents/T203.PDF>

Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., & Seeger, M. (2014). Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 208–213.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001>

Valappil, S. P., Boccaccini, A. R., Bucke, C., & Roy, I. (2007, diciembre 5).

Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9095-5>

Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, T., Bucke, C., & Roy, I.

- (2007). Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*, 132(3), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.03.013>
- Valappil, S. P., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03678.x>
- Vandamme, E. J. (2009). Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products. En *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 3–11). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_1
- Verardi, A., De, I., Ricca, E., & Calabr, V. (2012). Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. *Bioethanol*. <https://doi.org/10.5772/23987>
- Wang, F., & Lee, S. Y. (1997). Poly (3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation . *Poly (3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Ba*, 63(9), 3703–3706. <https://doi.org/10.1023/a:1012222625201>
- Waters, D. M., Jacob, F., Titze, J., Arendt, E. K., & Zannini, E. (2012). Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. *European Food Research and Technology*, 235(5), 767–778. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1805-9>
- Wei, Y.-H., Chen, W.-C., Huang, C.-K., Wu, H.-S., Sun, Y.-M., Lo, C.-W., & Janarthanan, O.-M. (2011). Screening and Evaluation of Polyhydroxybutyrate-Producing Strains from Indigenous Isolate *Cupriavidus taiwanensis* Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 252–265. <https://doi.org/10.3390/ijms12010252>
- Wiener Lab. (2000). Glicemia enzimática AA para la determinación de glucosa, 3–5. Recuperado de <http://www.wiener->

lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum
espanol/glicemia_enzimatica_aa_liquida_sp.pdf

- Williams, Harvey, & Kelly, P. (2018). *Polyhydroxyalknoates*. Nova Science Publishers, Inc.
- Yilmaz, M., Soran, H., & Beyatli, Y. (2005). Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(4), 565–566. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-3274-1>
- Yu, P. H., Chua, H., Huang, A. L., Lo, W., & Chen, G.-Q. (1998). Conversion of Food Industrial Wastes into Bioplastics, *70*, 603–614.
- Zarei, O., Dastmalchi, S., & Hamzeh-Mivehroud, M. (2016). A simple and rapid protocol for producing yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* suitable for preparing bacterial culture media. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *15*(4), 907–913.
- Zhou, C., Xia, X., Lin, C., Tong, D., & Beltramini, J. (2011). Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. *Chemical Society Reviews*, *40*, 5588–5617. <https://doi.org/10.1039/c1cs15124j>

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Caracterización de granos gastados de cervecería

1.1. Determinación de Sólidos Totales y Humedad (NREL & MRI, 1998)

Este método consiste en secar una muestra a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ en un horno de convección hasta que el peso permanezca constante. En este caso, se colocaron tres muestras de granos gastados de cervecería acondicionados (biomasa).

En primer lugar, se pesaron tres papeles de aluminio en forma de plato de pesaje, previamente secados, hasta los 0.1 mg más cercanos. Se registró el peso. Luego se mezcló bien la muestra de biomasa y se pesó aproximadamente 1 gramo, hasta los 0.1 mg más cercanos, en el plato de pesaje. Se registró el peso de la muestra más el plato de pesaje. Se colocaron las muestras en un horno de convección a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y se secaron a peso constante ($\pm 0.1\%$ de cambio en la cantidad de humedad presente después de una hora de recalentamiento). Se retiró la muestra del horno y se colocó en un desecador; se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se pesó el plato que contiene la muestra secada al horno, a los 0.1 mg más cercanos y se registró el peso. Los resultados de este procedimiento se muestran en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Porcentaje de sólidos totales y humedad en los granos gastados de cervecería

Muestra	Peso de biomasa (g)	Sólidos Totales (%)	Humedad (%)
1	1.0002	93.7400	6.2600
2	1.0002	93.4200	6.5800
3	1.0002	93.8700	6.1300
PROMEDIO		93.6770	6.3230

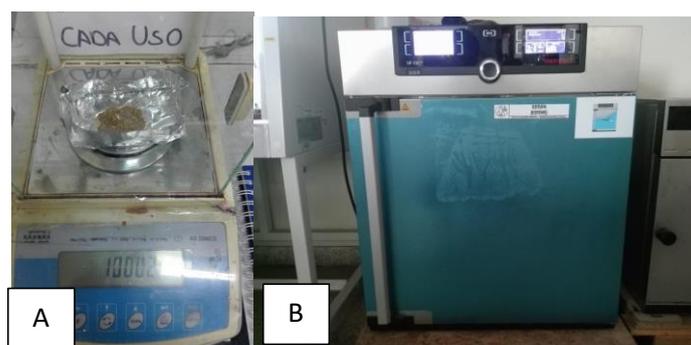


Figura 34. A) Pesado de muestra y B) Secado en horno de convección a 105°C .

1.2. Determinación de extractivos en biomasa (NREL & MRI, 1998)

Los extractivos, como se define en este procedimiento, son la fracción de una muestra de biomasa soluble en etanol y se dejan como un residuo luego de una extracción exhaustiva de Soxhlet. Los extractivos incluyen componentes no estructurales de muestras de biomasa que potencialmente podrían interferir con el análisis de la muestra de biomasa y, como tal, deben eliminarse antes del análisis de la composición.

Se pesaron 10 g de granos gastados de cervecería acondicionados, y secados por el procedimiento anterior. El pesado se realizó en un papel filtro (armado como cartucho). En un balón de ebullición se añadió 160 ml de etanol al 96%, junto con núcleos de ebullición. El cartucho se colocó dentro del Soxhlet y el balón con el solvente se conectó al equipo de extracción Soxhlet. Se encendió la plancha de calentamiento y se controló la temperatura de tal manera de que haya de 4 a 5 intercambios de disolvente por hora. Se continuó con la extracción durante 24 horas. Al finalizar se dejó enfriar el balón, luego se removió y se vertió el contenido en un balón de rotavapor previamente pesado. El contenido del cartucho se vertió en un embudo Büchner y se enjuagó con etanol al 96% para retirar cualquier solvente residual. Se dejó que la muestra seque, conectado al vacío, y se recolectó el filtrado en el balón de rotavapor. Después, se rotavaporó el solvente con extractivos a $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ de temperatura de calentamiento y con una presión de vacío de 140 mbar y $\Delta P=10$. Se dejó rotavaporando hasta que todo el disolvente fue eliminado, luego se apagó el rotavaporador y el balón con extractivo se colocó en una estufa a 45°C por 24 horas. Al finalizar el tiempo de secado, el balón se colocó en un desecador por 30 minutos, y se anotó el peso. Se repitió el proceso de secado-desechado hasta obtener un peso constante (diferencia de 0.1 mg).

Los resultados de este procedimiento se muestran en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Porcentaje de extractivos en los granos gastados de cervecería.

Muestra	EXTRACCIÓN			ROTAVAPORACIÓN		Extractivos (%)
	Peso papel filtro (g)	Peso papel filtro + biomasa (g)	Peso de biomasa, en base seca (g)	Peso balón vacío (g)	Peso balón + extractivos (g)	
1	1.2503	9.6120	8.3617	54.2963	55.9419	1.6456
2	1.2555	9.3945	8.1390	83.2373	85.0610	1.8237
3	1.2426	9.5382	8.2956	54.2768	55.9383	1.6616
PROMEDIO						1.7107

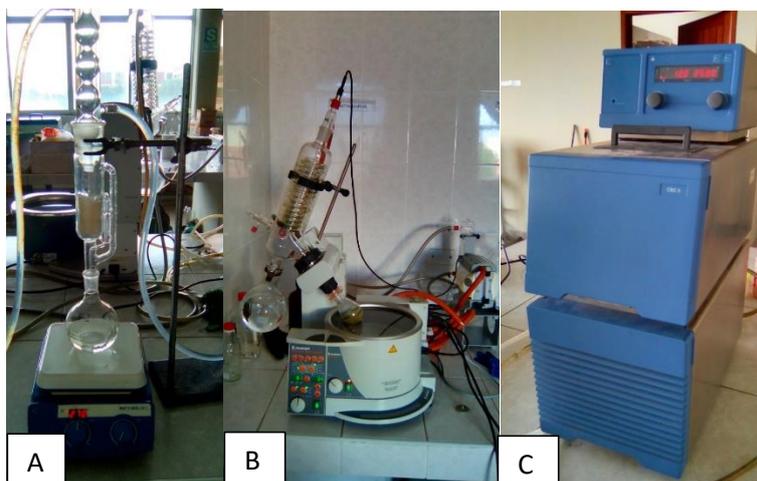


Figura 35. A) Equipo Soxhlet, B) Rotavapor C) Enfriador de agua acoplado a Soxhlet y rotavapor.

1.3. Metodología para determinación de holocelulosa en biomasa (Rowell, Young, & Rowell, 1996)

Preparación de la Holocelulosa (Clorito de Holocelulosa)

La holocelulosa es definida como la fracción de carbohidratos insoluble de los materiales lignocelulósicos. Para preparar la holocelulosa se empleó el método de clorito.

La biomasa empleada se encontraba libre de extractivos y humedad, y se obtuvo siguiendo los procedimientos anteriormente descritos.

Se pesó 1.0 g de biomasa en un matraz de 250 ml. Se agregó 80 ml de agua caliente, seguido de 0.5 ml de ácido acético glacial (HCOO_3), y se agitó. Luego se añadió 1.0 g de clorito de sodio (HOCl), se agitó y se tapó con un matraz de 50 ml boca abajo. Se colocó el matraz de 250 ml en baño maría a 70 °C. Transcurrido una hora se agregó nuevamente 0.5 ml de ácido acético y 1.0 g de clorito de sodio, y se agitó. Estas proporciones se agregaron hasta que la muestra esté blanqueada (como mínimo se agregó un total de tres veces). Después de la última adición de ácido acético y clorito de sodio, se dejó reaccionar durante 24 horas. Al concluir el tiempo, se filtró la muestra y se lavó con porciones de alcohol 96%, para remover el color y obtener la holocelulosa blanca. Se secó el sólido recuperado en el filtro, a 105°C por 24 horas, y el filtrado se descartó.

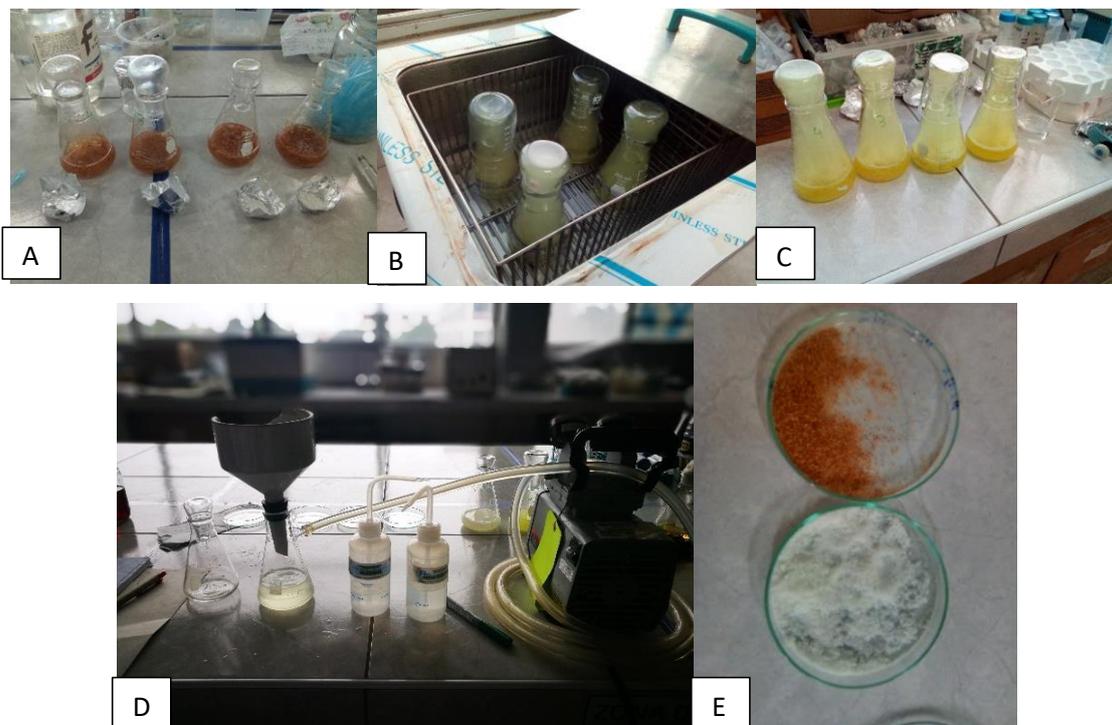


Figura 36. A) Muestras de afrecho con ácido acético y clorito de sodio. B) Incubación de las muestras en Baño María por 24 horas. C) Muestras después de 24 horas de incubación. D) Lavada de la holocelulosa. E) Muestra de afrecho original (arriba) y muestra después del tratamiento (holocelulosa blanca) (abajo).

Determinación de alfa-, beta- y gamma-celulosa

La alfa-celulosa es la fracción de pulpa resistente al 17,5% y al 9,45% de solución de hidróxido de sodio en las condiciones de la prueba. La beta-celulosa es la fracción soluble que se reprecipita en la acidificación de la solución; La gamma-celulosa es aquella fracción que queda en la solución (TAPPI, 2009).

Se pesó 0.3 g de muestra blanqueada, descrito en el procedimiento de preparación de holocelulosa. Se colocó la muestra en un vaso de precipitación de 50 ml y se agregó 15 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 17.5% (se anotó el tiempo en el que se agregó el reactivo). Se agitó con el dispersor de pulpa hasta que esté completamente dispersa (evitando el ingreso de aire a la suspensión de pulpa), luego se agregó 5 ml de NaOH al 17.5%, se agitó la suspensión con una varilla de vidrio y se colocó en baño maría a 25 °C. Se añadió 20 ml de agua destilada después de ½ hora de la primera adición de NaOH al 17.5% y se agitó con una varilla de vidrio. Se dejó la muestra por ½ hora más.

Al finalizar la hora de extracción, se agitó la suspensión con una varilla y se transfirió a un embudo de vidrio con papel filtro, se dejó que filtre por gravedad. Se desecharon los primeros 4 ml de filtrado, y se conservó el resto.

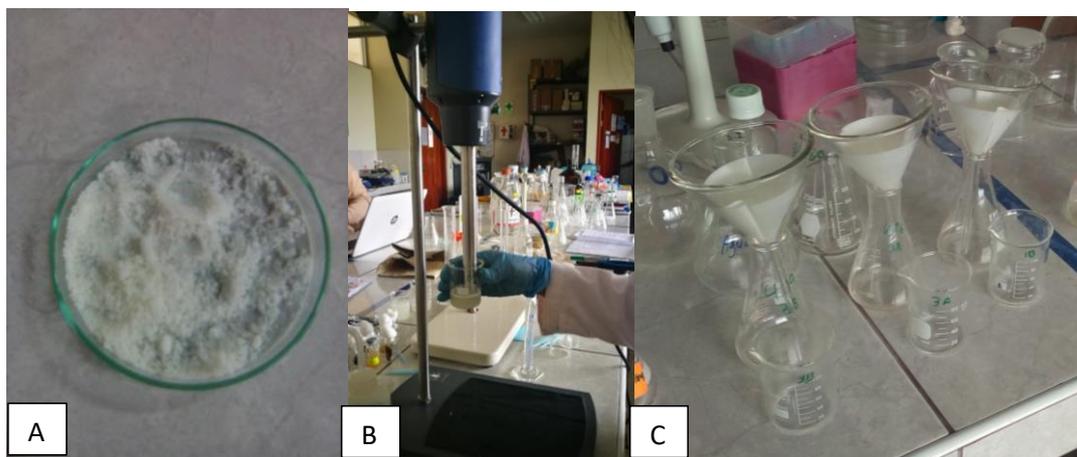


Figura 37. A) Muestra de holocelulosa blanca. B) Agitación de la muestra con dispersor de pulpa. C) Filtración de la suspensión.

Determinación de alfa-celulosa

En un matraz de 50 ml se añadió 0.25 ml del filtrado obtenido en el procedimiento anterior y 1 ml de una solución de $K_2Cr_2O_7$ 0.5 N. Se agregó 5 ml de agua destilada agitando lentamente. Se permitió que la solución permanezca caliente durante 15 min, luego se agregó 2.25 ml de agua destilada y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregó 4 gotas de ferroína (indicador) y se procedió a titular con una solución de amonio ferroso (FAS, previamente valorado a 0.1N) hasta conseguir un viraje de color verde a morado/marrón. Se midió el volumen de gasto. Finalmente se hizo una valoración en blanco, sustituyendo el filtrado de pulpa con 1.25 ml de NaOH 17.5% y 1.25 ml de agua destilada.

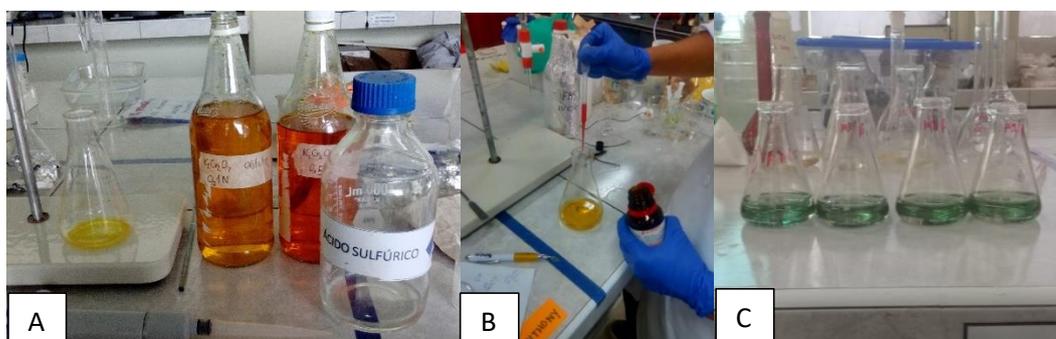


Figura 38. A) Muestra del filtrado con $K_2Cr_2O_7$ 0.5 N y H_2SO_4 cc. B) Adición de ferroína a la solución. C) Muestras después de titulación con FAS.

Determinación de beta- y gamma-celulosa

Se añadió 9 ml del filtrado de pulpa en una probeta de 50 ml, luego se agregó 9 ml de ácido sulfúrico H₂SO₄ 3N, se mezcló bien y se colocó en baño maría a 70 – 90°C, por varios minutos hasta coagular, luego se dejó reposar y se centrifugó por 10 minutos a 4000 RPM en tubos Falcon de 15 ml.

En un matraz de 50 ml se vertió 0.5 ml del sobrenadante con una micropipeta y se agregó 1 ml de dicromato de potasio 0.5 N, 9 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se permitió que la solución permanezca caliente durante 15 min, luego se agregó 2.25 ml de agua destilada y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregó 4 gotas de ferroína (indicador) y se procedió a titular con el FAS (previamente valorado a 0.1N) hasta conseguir un viraje de color verde a morado/marrón. Se midió el volumen de gasto. Finalmente se hizo una valoración en blanco, sustituyendo la solución con 1.25 ml de NaOH 17.5%, 1.25 ml de agua destilada y 2.5 ml de ácido sulfúrico 3N.

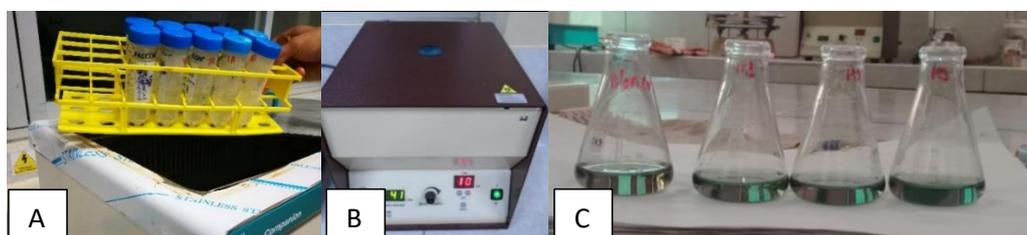


Figura 39. A) Incubación de muestras en Baño María. B) Centrifugación. C) Muestras después de la titulación con FAS.

Cálculos

Cálculo del contenido de alfa-celulosa en la pulpa:

$$\text{Alfa-celulosa, \%} = 100 - \frac{6.85 \times (V_2 - V_1) \times N \times 20}{A \times W}$$

V₁ = titulación del filtrado de pulpa, ml

V₂ = titulación del blanco, ml

N = normalidad exacta de la solución de amonio ferroso

A = volumen de filtrado de pulpa usado en la oxidación, ml

W = muestra de pulpa secada en horno, g

Cálculo del contenido de gamma-celulosa en pulpa

$$\text{Gamma-celulosa, \%} = [6.85 \times (V_4 - V_3) \times N \times 20] / [25 \times W]$$

V_3 = titulación de la solución después de la precipitación de la beta-celulosa, ml

V_4 = titulación del blanco, ml

Cálculo del contenido de beta-celulosa en la pulpa:

$$\text{Beta-celulosa, \%} = 100 - (\text{alfa-celulosa \%} + \text{gamma-celulosa \%})$$

Resultados del contenido de alfa-, beta- y gamma-celulosa

Cuadro 19: Resultados del contenido de alfa-, beta- y gamma-celulosa

Fracción de Holocelulosa	Fracción % (p/p)
Alfa-celulosa	22.77
Beta-celulosa	73.43
Gamma-celulosa	3.80

ANEXO 2: Protocolos de análisis y curvas de calibración

2.1. Determinación de azúcares reductores por método DNS según (Adney & Baker, 2008)

Procedimiento para analizar las muestras

Se tomaron 500 ul de muestra de sobrenadante diluido apropiadamente, y se añadió 1 ml de agua destilada y 3 ml de reactivo DNS en tubos tapa rosca. El blanco consistió de 500 ul de agua destilada en lugar de muestra. Se colocaron los tubos tapa rosca en Baño María a 100°C por 5 minutos, inmediatamente después se pasaron los tubos a un baño frío para detener la reacción. Una vez enfriados se separó 200 ul en un tubo de ensayo y se añadió 2.5 ml de agua destilada. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis.



Figura 40. A) Muestras analizadas para azúcares reductores por el método de DNS. B) Espectrofotómetro UV-Vis empleado en la lectura de absorbancia.

Procedimiento para la elaboración de la curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración de azúcares reductores se pesó 0.5 g de glucosa y se aforó en una fiola con 50 ml de agua. La solución obtenida tiene una concentración de 10 g/L y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas para tener un total de 4 diluciones con concentraciones desde 6.67 g/L hasta 2.0 g/L. De cada dilución se tomaron 500 μ l y se vertieron en tubos de 16x100 con tapa rosca, para luego añadirles 1 ml de agua destilada y 3 ml de reactivo DNS (preparado según método IUPAC). Se incubaron los tubos a 100°C por 5 minutos e inmediatamente después se colocaron en un baño de hielo. Se tomaron 200 μ l de cada tubo y se colocaron en nuevos tubos de ensayo de 13x100. Se añadió 2.5 ml de agua destilada, se agitó y se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, frente a un blanco con agua destilada en reemplazo de la muestra. Se realizó una regresión lineal de los datos obtenidos de absorbancia frente a concentración en g/L. La ecuación obtenida a partir de esta regresión fue, en la primera ocasión: $y = 0.087x - 0.0161$, con un $R^2 = 0.9886$. Donde “y” tiene unidades de absorbancia y “x” tiene unidades de concentración en g/L. Luego se cambió de reactivo, y se volvió a realizar una nueva curva de calibración, obteniéndose esta vez: $y = 0.0849x - 0.0053$, con un $R^2 = 1$.

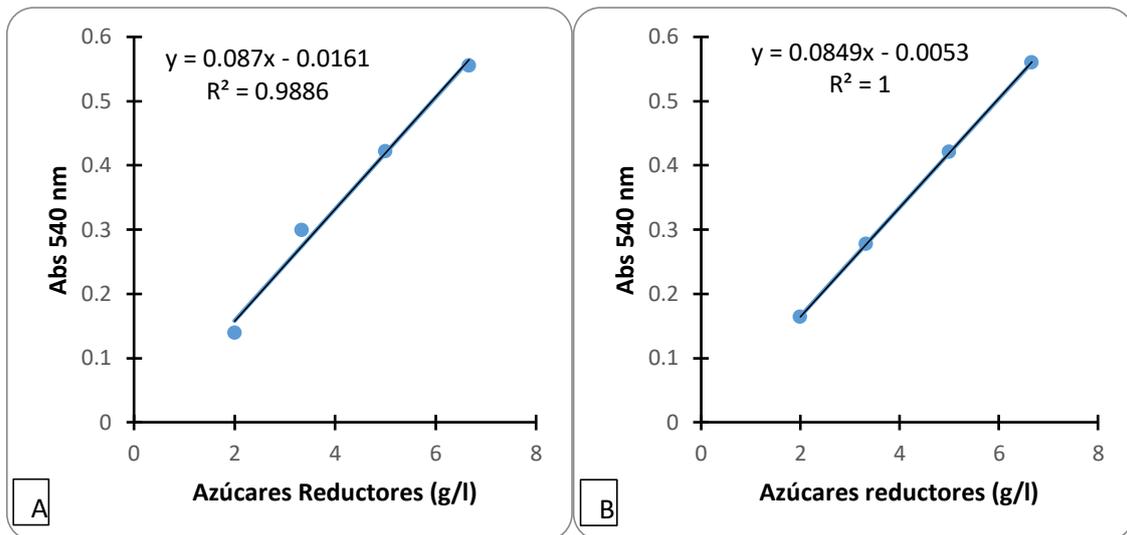


Figura 41. Curvas de calibración de azúcares reductores. A) Curva 1. B) Curva 2.

2.2. Determinación de glucosa por kit enzimático (Wiener Lab, 2000)

Procedimiento para analizar las muestras

La cuantificación de glucosa en el hidrolizado y el extracto de levadura se realizó utilizando glicemia enzimática AA líquida Wiener Lab (Fig. 42), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se diluyó apropiadamente la muestra. Se tomó 20 ul de la muestra diluida, se vertió en un tubo de vidrio y se añadió 2 ml de la solución de glicemia enzimática Wiener Lab. Se incubó el tubo a 37°C por 5 minutos y se leyó la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, frente a un blanco con 20 ul de agua destilada en reemplazo de la muestra.

Las lecturas de absorbancia se relacionaron a la concentración de glucosa en las muestras utilizando una curva de calibración.

Elaboración de curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración de glucosa se pesó 0.5 g de glucosa y se aforó en una fiola con 100 mL de agua. La solución obtenida tiene una concentración de 5 g/L y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas para tener un total de 9 diluciones con concentraciones desde 5 g/L hasta 0.032 g/L. De cada dilución se tomaron 20 uL y se vertieron en tubos de 13x100, para luego añadirles 2 mL de la solución de glicemia

enzimática Wiener Lab. Se incubaron los tubos a 37°C por 5 minutos y se leyó la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, frente a un blanco con 20 uL de agua destilada en reemplazo de la muestra. Se realizó una regresión lineal de los datos obtenidos de absorbancia frente a concentración en g/L. La ecuación obtenida a partir de esta regresión fue: $y = 0.3952x - 0.0101$, con un R^2 de 0.9998. Donde “y” tiene unidades de absorbancia y “x” tiene unidades de concentración en g/L.

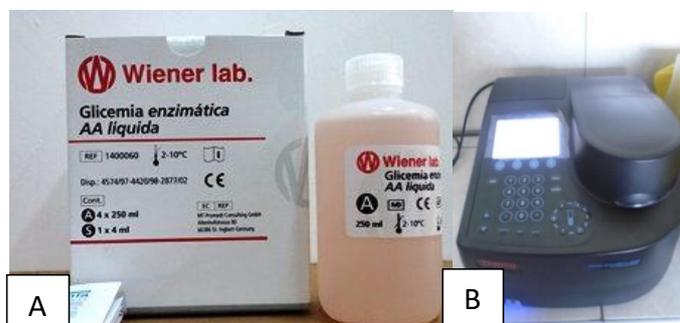


Figura 42. A) Glicemia enzimática AA líquida, utilizada para la cuantificación de glucosa. B) Espectrofotómetro UV-Vis.

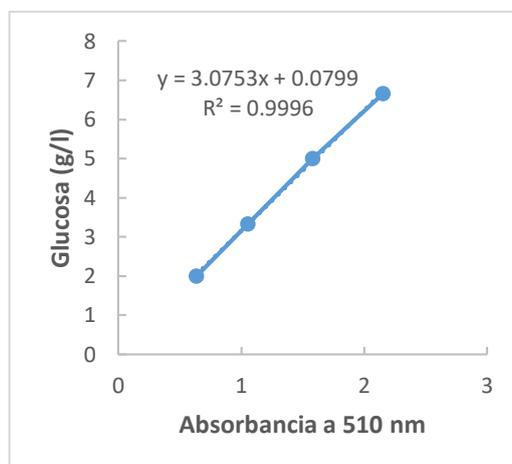


Figura 43. Curva de calibración de glucosa por el método con glicemia enzimática AA líquida Wiener Lab.

2.3. Metodología para cuantificación de nitrógeno total por el Test 0-83 Nanocolor® Nitrogen Total TN_b 22 (MACHEREY-NAGEL, 2016)

Este método se basa en la descomposición oxidativa en un digestor, con la subsecuente compensación de interferencia y determinación fotométrica con 2,6-dimetilfenol en una mezcla ácida de ácido sulfúrico/ácido fosfórico.

El rango de lectura es entre 0.5 – 22.0 mg/L N, a longitudes de onda de 350/365/385 nm. El tiempo de descomposición es 30 minutos a 120°C / 60 minutos a 100°C. El kit contiene dos cajas: La caja A contiene 20 tubos de ensayo para descomposición y 1 tubo de ensayo del reactivo de compensación NANOFIX. La caja B contiene 20 tubos de ensayo para la prueba nitrógeno total TN_b 22 y 1 tubo de ensayo con 11 ml NO₃/N R2.

El procedimiento consiste en dos etapas: Descomposición y Análisis.

Descomposición (Caja A)

Se abrió un tubo de descomposición y se añadió 5 ml de muestra (el pH de la muestra debe estar entre 5 y 9), se cerró el tubo y se agitó vigorosamente. Se colocó el tubo en el digestor y se calentó a 120°C por 30 minutos o a 100°C por 1 hora. Se removió el tubo del digestor, se agitó con cuidado y se dejó enfriar. Se abrió el tubo de descomposición nuevamente y se agregó 1 reactivo de compensación NANOFIX, se cerró y se agitó vigorosamente. Esta solución es llamada solución descompuesta.

Análisis (Caja B)

Se abrió un tubo de Nitrógeno total TN_b 22, se añadió 0.5 ml de solución descompuesta y 0.5 ml de R2, se cerró y mezcló agitando con cuidado. Se limpió el tubo por el exterior y se midió en el fotómetro después de 10 minutos de reposo.



Figura 44. Implementos y kit para realizar el test de nitrógeno total.

2.4. Cuantificación de amonio con el Test 0-03 Nanocolor® Amonio 3 (MACHEREY-NAGEL, 2019)

El método se basa en la determinación fotométrica como indofenol: a un pH de 12.6 el amonio reacciona con hipoclorito y salicilato en presencia de nitroprusiato de sodio como catalizador para formar un indofenol azul.

El rango de lectura es entre 0.04 – 2.3 mg/L $\text{NH}_4\text{-N}$ y 0.05 – 3.00 mg/L $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, a una longitud de onda de 690 nm. El tiempo de reacción es de 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). El kit contiene: 20 tubos de ensayo de *Ammonium 3*, 1 tubo NANOFIX *Ammonium 3 R2* y un tubo de ensayo con valor blanco “NULL”.

Para realizar el procedimiento, se abrió un tubo de ensayo, se añadió 4.0 ml de la muestra (el pH de la muestra debe estar entre pH 7 y 10) y 1 NANOFIX R2, se cierra y se agita. Se limpia el tubo por el exterior y se mide después de 15 minutos, empleando un fotómetro.

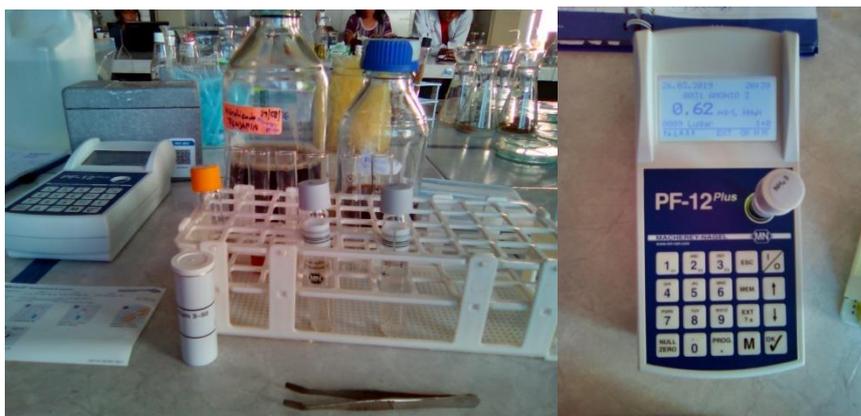


Figura 45. Implementos y kit para el test de amonio.

2.5. Cuantificación de furfural e hidroximetilfurfural por HPLC (Li et al., 2017)

Procedimiento de extracción

Para la extracción de los furfural e hidroximetilfurfural (HMF) del hidrolizado, se pesó 1.0 g del hidrolizado en un tubo de ensayo de 10 ml. Se añadió 4 ml de n-butanol saturado con agua destilada. La mezcla fue agitada por 2 minutos usando un agitador vortex y luego se centrifugó a 3000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió cuantitativamente a un frasco volumétrico de 10 ml. El procedimiento de extracción se repitió dos veces, añadiendo 3 ml de n-butanol saturado con agua destilada, cada vez. Finalmente, se añadió suficiente n-butanol saturado con agua destilada para alcanzar a 10 ml de solución. La solución fue filtrada a través de una membrana de 0.45 μm antes del análisis en el HPLC.

Análisis HPLC de Furfural e Hidroximetilfurfural

El volumen de inyección fue de 2 μ l. La columna usada fue una Accucore C18 (100 x 4.6 mm, Thermo Scientific); la fase móvil usado fue una mezcla 20/80 acetonitrilo y agua, a un flujo de 0.8 ml/min; la columna se mantuvo a 30°C; y se empleó un detector UV para detección dual a longitudes de onda de 268 nm para furfural y 277 nm para HMF. La fase móvil se degasificó por 15 minutos en un equipo de ultrasonido. La identificación de los compuestos se realizó comparando su tiempo de retención con el de los estándares. Los datos fueron recolectados y procesados utilizando un equipo UHPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation y empleando el software Chromeleon Chromatography Data System versión 7.2 SR4 (Thermo Scientific).

Cálculo del contenido de Furfural y HMF

Las cantidades de furfural y HMF en los hidrolizados fue calculada usando:

$$w = 1000 * 10 * c * m' / m$$

donde w (mg/L) es el contenido de furfural o HMF en el hidrolizado, c (mg/ml) es el contenido de furfural o HMF detectado por el HPLC con una columna C18 y un detector UV como las unidades de separación y detección, m (g) es el peso del hidrolizado usado para la extracción del furfural y HMF, m' (g) es el peso de 1 ml del hidrolizado usado para la extracción de furfural y HMF, 10 es el volumen de n-butanol usado para la extracción de furfural y HMF, 1000 es el factor de conversión de ml a litros.

Concentración de Furfural y HMF en el hidrolizado

Se calcularon las concentraciones de furfural y HMF empleando la curva de calibración elaborada con estándares de furfural e hidroximetilfurfural.

Cuadro 20: Concentración de inhibidores en el hidrolizado concentrado.

Compuesto	Concentración de (mg/L)
Furfural	Nd
Hidroximetilfurfural	50.00

nd=no detectable

Elaboración de la curva de calibración de Furfural y HMF

Las curvas de calibración se realizaron entre 0.30 mg/L y 300 mg/L para furfural, mientras que para hidroximetilfurfural se realizó entre 0.26 mg/L y 536 mg/L, a partir de estándares analíticos. Estos se diluyeron con acetonitrilo hasta obtener las concentraciones indicadas.

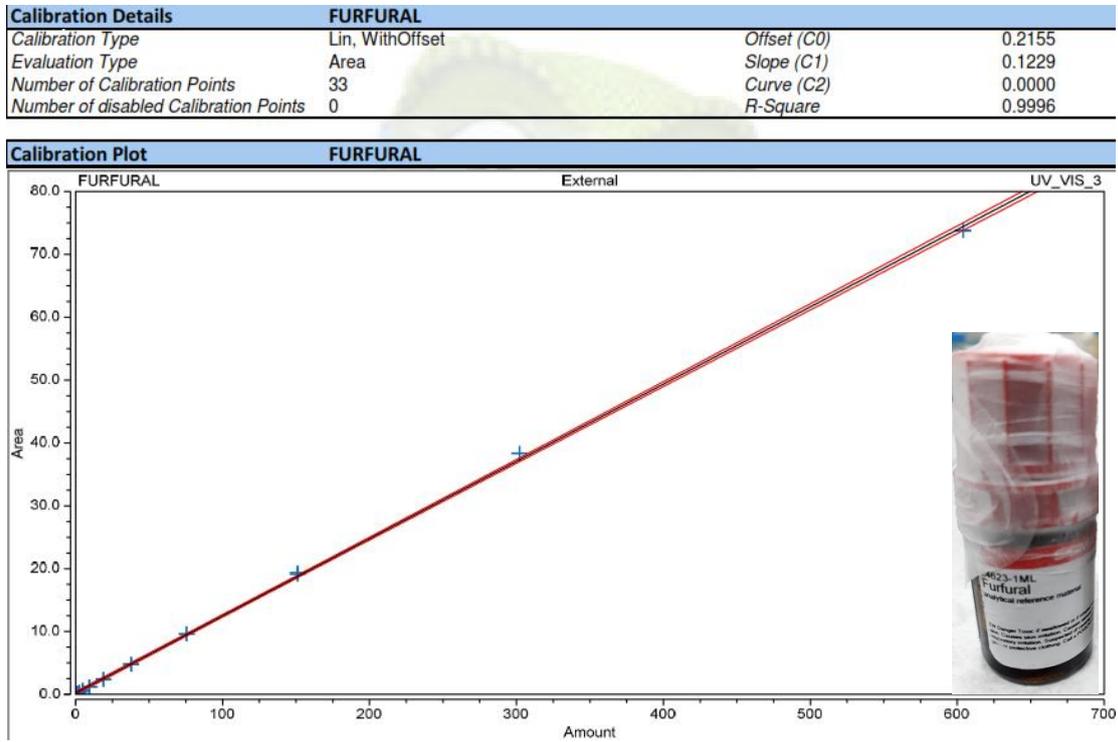


Figura 46. Curva de calibración de furfural.

Calibration Details		HIDROXIMETILFURFURAL	
Calibration Type	Lin, WithOffset	Offset (C0)	0.2706
Evaluation Type	Area	Slope (C1)	0.0836
Number of Calibration Points	36	Curve (C2)	0.0000
Number of disabled Calibration Points	0	R-Square	0.9992

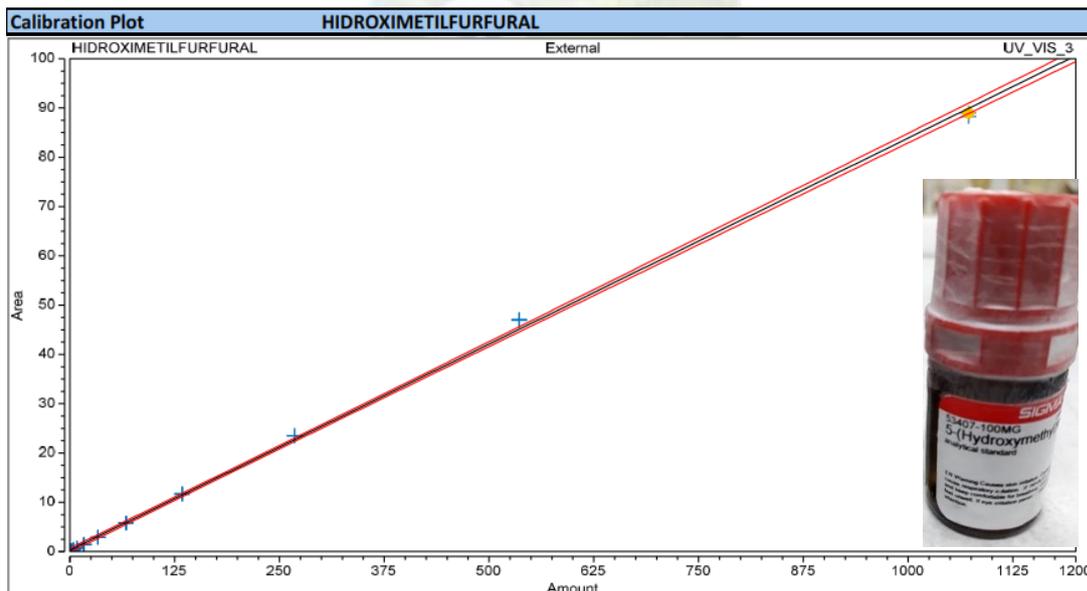


Figura 47. Curva de calibración de HMF.

2.6. Cuantificación de Biomasa por Peso Seco

Para este método se emplearon crisoles de porcelana previamente lavados y rotulados. Primero, se dejaron secar a 105°C por 24 horas en una estufa (Mettler). Luego, se dejaron enfriar en desecador, se pesaron en una balanza analítica (Radwag) y se devolvieron al desecador hasta su uso. Una vez finalizada la fermentación, se vertió el contenido de los matraces en tubos Falcon de 50 ml y se separó la biomasa mediante centrifugación del caldo (4400 rpm por 10 min a T° ambiente). Se separó el sobrenadante para otros análisis y se lavó la biomasa añadiendo agua destilada, se agitó y se volvió a centrifugar nuevamente. Este procedimiento se repitió 3 veces en total. Al final, la biomasa se colocó en un crisol previamente pesado, y se secó en la estufa a 105°C por 24 horas. Después, se pesó el crisol con la biomasa y se calculó la diferencia para determinar el peso seco de la biomasa. Los datos para la cuantificación de la biomasa se detallan en el Anexo 4.1.



Figura 48. (a) Estufa utilizada para secar la biomasa colocada en los crisoles. (b) Pesado de los crisoles con la biomasa seca.

Elaboración de curva de calibración de Biomasa

Se realizó una curva de calibración a partir de una suspensión de la cepa *Bacillus* sp. B23 de 24 horas. La suspensión fue diluida y las diluciones cuantificadas por el método descrito en la sección Recolección de Datos, Cuantificación de Biomasa.

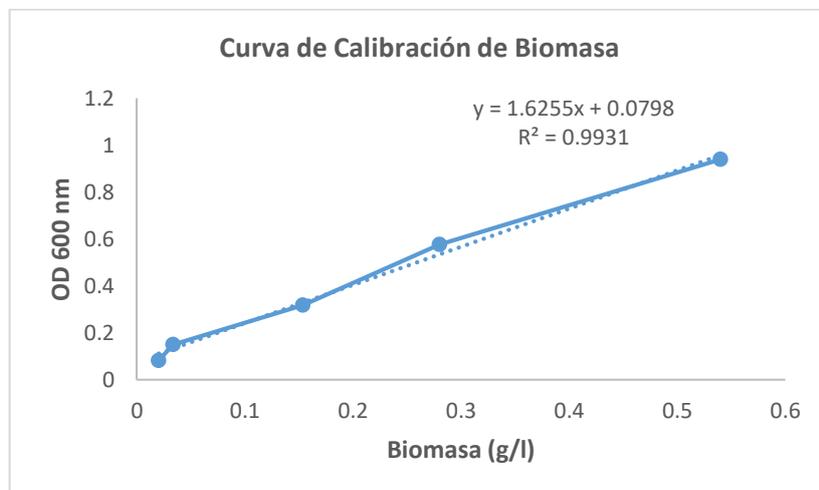


Figura 49. Curva de calibración de Biomasa (g/L) de la cepa *Bacillus* sp. B23

2.7. Cuantificación de ácido crotónico (PHB derivatizado) por HPLC

Procedimiento para analizar las muestras

Se pesó entre 3 a 5 mg de biomasa seca en un tubo Eppendorf de 2 ml, se agregó 500 ul de H_2SO_4 cc, el tubo se colocó en un digestor a $90^\circ C$ por 1 hora, y se agitó periódicamente cada 15 minutos. Se tomaron 20 ul, y se completó con 1480 ul de fase móvil, que consiste en una solución de H_2SO_4 0.01N (previamente filtrada con un filtro de Nylon de 0.45 um

y degasificada por 15 minutos en un equipo de ultrasonido). Una vez diluida la muestra, se tuvo un total de 1500 uL en un nuevo tubo Eppendorf. La muestra obtenida se filtró con un filtro de Nylon de 0.45 um, se vertió en un microvial y se analizó usando un sistema de cromatografía líquida HPLC-UV con un equipo UHPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation y una columna Shodex SUGAR SH1011. La elución se realizó con 0.01N H₂SO₄ (fase móvil) a 1 mL/min y 50°C de temperatura de la columna. La muestra inyectada fue de 10 uL. La absorbancia del ácido crotonico se midió a 210 nm con un detector UV-Vis.

La masa de PHB en la muestra se calculó a partir de una ecuación de regresión derivada de concentraciones estándar de ácido crotonico realizada previamente. El procesamiento de los datos se realizó empleando el software Chromeleon Chromatography Data System versión 7.2 SR4 (Thermo Scientific). El cálculo realizado para la determinación del porcentaje de PHB en biomasa se describe a continuación.



Figura 50. (a) Muestras pesadas de biomasa en tubos Eppendorf. (b) Aspecto inicial de las muestras con H₂SO₄ cc antes de la digestión a 90°C. (c) Digestión de muestras a 90°C. (d) Aspecto final de la muestra digerida.

Curva de calibración de ácido crotonico para cuantificación de PHB

Para la elaboración de la curva de calibración de ácido crotonico se pesó 5 mg de ácido poli-[(R)-3-hidroxi-butírico] (PHB) (ALDRICH) en un tubo de ensayo. Se añadió 1 ml de ácido sulfúrico concentrado (98%), se agitó por 1 minuto y se colocó en un digestor a 90°C por 1 hora. Se agitó periódicamente cada 15 minutos. Luego se añadió 4 ml de fase móvil que consiste en ácido sulfúrico diluido 0.01N (previamente filtrado con un filtro de Nylon de 0.45 um y sonicada por 15 minutos). La solución obtenida tiene una concentración de 1000 ppm de PHB como ácido crotonico (solución stock) (1 ppm= 1 mg/L). Se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución stock, tomando

inicialmente 2 ml de la misma y añadiendo 2 ml de fase móvil, para hacer un total de 4 ml (con una concentración de 500 ppm de PHB). De la nueva solución obtenida se tomó 2 ml y se diluyó con otros 2 ml de fase móvil, y así sucesivamente, hasta tener una concentración de 0.61 ppm de PHB como ácido crotónico. Una vez preparadas las diluciones se tuvieron un total de 14 tubos con las diluciones de 5000 ppm, 2500 ppm, 1250 ppm, 625 ppm, ..., 1.22 ppm, y 0.61 ppm; se filtraron con un filtro de Nylon de 0.45 um y se vertieron en microviales para HPLC. Las condiciones y parámetros del HPLC fueron los mismos que para el tratamiento de las muestras. El procesamiento de los datos se realizó empleando el software Chromeleon Chromatography Data System versión 7.2 SR4 (Thermo Scientific), con el que se elaboró la curva de calibración considerando los nanogramos (ng) de ácido crotónico presentes en el volumen de muestra inyectado y el área integrada bajo la curva del pico del ácido crotónico, que tiene un tiempo de retención de alrededor de 17.6 minutos. El análisis de cada muestra tomaba 20 minutos. La cantidad de ng de ácido crotónico es proporcional a la cantidad de ng de PHB. La curva obtenida permite obtener las cantidades de PHB en las muestras. La ecuación de regresión obtenida fue: $y=0.8427x + 1.3513$, con un R^2 de 0.9999. Donde “y” tiene unidades de área en mAU*min y “x” tiene unidades de masa en ng.

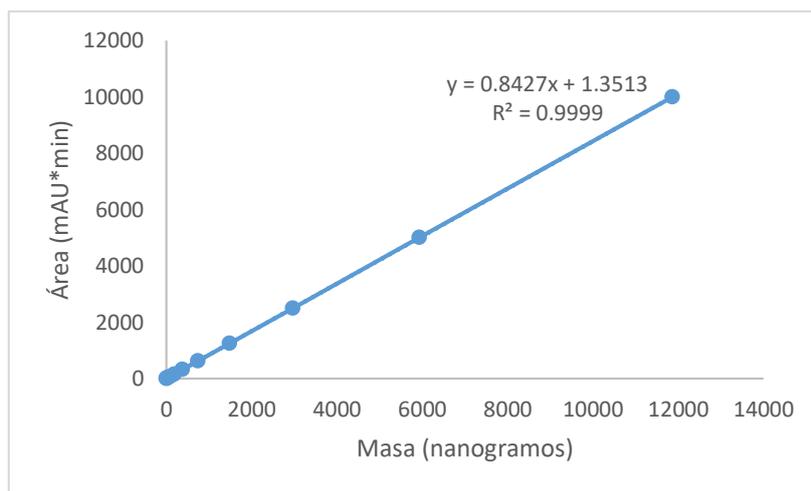


Figura 51. Curva de calibración de ácido crotónico.

Para cuantificar el contenido de PHB en la biomasa, se pesó entre 3 a 5 mg de biomasa seca en un tubo Eppendorf de 2 ml, se agregó 500 ul de H_2SO_4 cc, el tubo se colocó en un digestor a 90°C por 1 hora. Se tomaron 20 ul, y se completó con 1480 ul de fase móvil, para hacer un total de 1500 ul en un nuevo tubo Eppendorf. Después de pasar por el HPLC, el software calcula el área del pico obtenido y empleando la curva de calibración

calcula los ng de PHB presentes en el volumen de muestra inyectado. Con esta masa, y empleando la siguiente ecuación, se calcula el %PHB en biomasa:

$$\%PHB = \left(\frac{\left(\frac{x * y}{a} \right) * \frac{b}{c}}{\frac{1000000}{d}} \right) * 100\%$$

Donde x = masa (ng), y= 1500 ul (volumen de muestra diluido), a=10 ul (volumen de inyección), b=500 ul (volumen de H₂SO₄), c=20 ul (volumen de muestra sin diluir), d= biomasa (mg). Los datos de la cuantificación de PHB de los ensayos se encuentran en el Anexo 4.6.

ANEXO 3: Medio de cultivo y cálculo de razón C/N

3.1. Composición del medio de cultivo definido “medio M”

La composición del medio se adaptó de la siguiente manera (g/L): Na₂HPO₄, 3.59; KH₂PO₄, 1.5; NaCl, 1; (NH₄)₂SO₄, 2; NH₄Fe-citrato, 0.05; CaCl₂, 0.015; MgSO₄*7H₂O, 0.2; solución de elementos traza SL6 10X, 0.1 mL; glucosa anhidra, 20 g; con un pH final de 7.0. Los componentes susceptibles a precipitación se autoclavaron por separado a 121°C por 15 minutos. La solución traza SL6 10X estaba compuesta por (g/L): ZnSO₄*7H₂O, 1; H₃BO₃, 3; CoCl₂*6H₂O, 2; CuSO₄*5H₂O, 0.094; NiCl₂*6H₂O, 0.2; Na₂MoO₄*2H₂O, 0.3, MnCl₂*4H₂O, 0.31, preparada en una solución de HCl 1N.

3.2. Cálculo de la razón C/N (mol/mol) del medio de cultivo

Debido a la importancia del C/N inicial del medio, esta se calculó a partir de la composición de azúcares reductores y nitrógeno del hidrolizado y el extracto de levadura. Para el cálculo de número de moles de carbono, se asumió que los azúcares reductores eran equivalentes a la glucosa.

Cuadro 21. Datos necesarios para el cálculo de la relación C/N.

Componente	Azúcares reductores (g/L)	Nitrógeno total (g/L)	Peso Molecular (g/mol)
Hidrolizado concentrado	104.2	1.96	-
Extracto de levadura (30 g/L)	1.32	2.9	-
Glucosa	-	-	180
Carbono	-	-	12
Nitrógeno	-	-	14

Las ecuaciones que se emplearon fueron las siguientes:

$$\# \text{ moles de C} = ((M_{AR} * 6) + (M_{EL} * EL_{AR} / EL_C) * 6) / 180$$

$$\# \text{ moles de N} = ((M_{AR} * H_N / H_{AR}) + (EL_M * EL_N / EL_C)) / 14$$

$$C/N \text{ (mol/mol)} = \# \text{ moles de C} / \# \text{ moles de N}$$

Donde:

M_{AR} : concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo

M_{EL} : concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo

EL_{AR} : concentración de azúcares reductores en la solución de extracto de levadura

EL_C : concentración de extracto de levadura (solución concentrada)

H_N : concentración de nitrógeno total en el hidrolizado concentrado

H_{AR} : concentración de azúcares reductores en el hidrolizado concentrado

EL_N : concentración de nitrógeno total en la solución de extracto de levadura

6: número de carbonos en una molécula de glucosa

14: peso molecular del nitrógeno

180: peso molecular de la glucosa.

Los valores de C/N se muestran en el Cuadro 19.

Cuadro 22: Razón molar carbono/nitrógeno inicial (mol/mol) del medio a los diferentes niveles de las variables independientes, y su relación con la respuesta %PHB.

Variables		C/N (mol/mol)	%PHB
X_1 (g/L)	X_2 (g/L)		(% p/p)
10	1	16.46	22.001 ± 2.031
10	5	7.10	31.038 ± 1.054
30	1	21.21	47.957 ± 1.666
30	5	13.46	51.385 ± 0.989
5.86	3	6.99	12.384 ± 2.327
34.14	3	17.16	54.274 ± 1.762
20	0.17	23.78	24.444 ± 3.051
20	5.83	10.06	48.018 ± 0.087
20	3	14.10	42.966 ± 1.290

X_1 : concentración inicial de azúcares reductores, y X_2 : concentración inicial de extracto de levadura

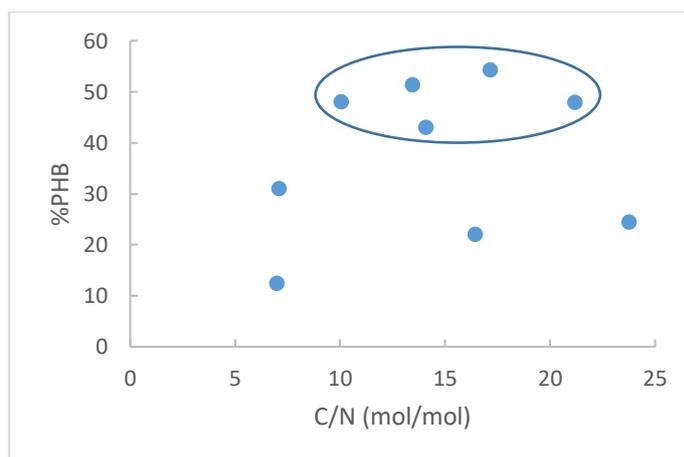


Figura 52. Correlación entre C/N y %PHB. Encerrado en una elipse están los ensayos realizados a concentración de azúcares reductores ≥ 20 g/L.

ANEXO 4: Datos de gráficos y análisis de muestras

4.1. Datos de cuantificación de biomasa por peso seco

Cinética en medio definido

Cuadro 23: Resultados de biomasa para la cinética de la cepa *Bacillus* sp. B23 en el medio definido M.

Cultivo	Tiempo (h)	Vol. (ml)	Peso inicial crisol (g)	Peso final crisol (g)	Diferencia (g)	Biomasa (g/L)	Biomasa Promedio (g/L)
B23	0	18	17.5868	17.5993	0.0125	0.694	0.694
	21	25	17.4578	17.5612	0.1034	4.136	4.224
		25	17.3498	17.4576	0.1078	4.312	
	45	25	14.7712	14.8848	0.1136	4.544	4.508
		25	17.3785	17.4903	0.1118	4.472	
	70	25	15.303	15.4072	0.1042	4.168	4.188
		25	17.5273	17.6325	0.1052	4.208	

Cinética en medio complejo

Cuadro 24: Resultados de biomasa para la cinética de la cepa *Bacillus* sp. B23 en el medio complejo H + EL.

Cultivo	Tiempo (h)	Vol. (ml)	Peso inicial crisol (g)	Peso final crisol (g)	Diferencia (g)	Biomasa (g/L)
B23	0	-	-	-	-	0.015
	12	30	19.0389	19.0529	0.014	0.4667
	22	30	17.3469	17.4661	0.1192	3.9733
	36	30	18.6261	18.7434	0.1173	3.9100
	48	30	17.5236	17.6441	0.1205	4.0167
	61	30	17.3751	17.4916	0.1165	3.8833
	84.5	30	16.0206	16.1477	0.1271	4.2367

Diseño Experimental

Cuadro 25: Resultados de biomasa para la cinética de la cepa *Bacillus* sp. B23 del diseño experimental

Variabes		Vol. (ml)	Peso inicial crisol (g)	Peso final crisol (g)	Diferencia (g)	Biomasa (g/L)
X_1 (g/L)	X_2 (g/L)					
5.86	3	30	17.602	17.639	0.037	1.240
5.86	3	30	17.392	17.428	0.036	1.213
10	1	30	14.768	14.807	0.039	1.300
10	1	30	18.198	18.239	0.041	1.373
10	5	30	17.454	17.558	0.104	3.470
10	5	30	17.387	17.489	0.102	3.407
20	0.17	30	15.317	15.398	0.081	2.697
20	0.17	30	17.347	17.428	0.081	2.683
20	3	30	17.347	17.495	0.148	4.947
20	3	30	17.392	17.534	0.142	4.740
20	3	30	17.524	17.667	0.143	4.773
20	3	30	18.198	18.342	0.144	4.800
20	5.82	30	15.538	15.704	0.166	5.533
20	5.82	30	17.377	17.546	0.170	5.653
30	1	30	16.021	16.144	0.123	4.107
30	1	30	17.454	17.576	0.122	4.067
30	5	30	0.146	0.318	0.172	5.717
30	5	30	17.524	17.694	0.170	5.667
34.14	3	30	17.603	17.755	0.152	5.077
34.14	3	30	15.063	15.213	0.150	5.010

Validación

Cuadro 26: Resultados de biomasa para la cinética de la cepa *Bacillus* sp. B23 de la validación

Variables		Vol. (ml)	Peso inicial crisol (g)	Peso final crisol (g)	Diferencia (g)	Biomasa (g/L)
X_1 (g/L)	X_2 (g/L)					
34.14	4.41	30	17.3471	17.5090	0.1619	5.3967
34.14	4.41	30	15.0615	15.2235	0.1620	5.4000
34.14	4.41	30	17.3742	17.5376	0.1634	5.4467

4.2. Datos de gráfica de cinética en medio complejo H + EL

Cuadro 27: Datos para la cinética de la cepa *Bacillus* sp. B23 en el medio complejo H + EL

T (horas)	Biomasa (g/L)	Azúcares reductores (g/L)	%PHB	Biomasa residual (g/L)	PHB (g/L)
0	0.01	22.57	0.00	0.00	0.00
12	0.47	20.41	17.80	0.38	0.08
22	3.97	16.83	47.40	2.09	1.88
36	3.91	13.20	40.08	2.34	1.57
48	4.02	10.65	24.18	3.05	0.97
61	3.88	9.11	23.67	2.96	0.92
84.5	4.24	10.52	14.82	3.61	0.63

4.3. Datos de cuantificación de azúcares reductores por método DNS

Concentración de azúcares reductores en Hidrolizado de granos gastados de cervecería

Empleando la curva de calibración de azúcares reductores y el método de DNS se determinó que el hidrolizado de granos gastados de cervecería tenía una concentración de azúcares reductores de 104 g/L aprox.

Cuadro 28: Resultados de la cuantificación de azúcares reductores en el hidrolizado por método DNS

Absorbancia	Factor de dilución	Concentración de azúcares reductores (g/L)
0.3465	25	104.20

Concentración de azúcares reductores en el Extracto de levadura cervecera residual

Empleando la curva de calibración de azúcares reductores y el método de DNS se determinó que el extracto de levadura cervecera residual tenía una concentración de azúcares reductores de 1.32 g/L, a una concentración de extracto de levadura de 30 g/L en solución.

Cuadro 29: Resultados de la cuantificación de azúcares reductores en el extracto de levadura por método DNS

Absorbancia	Factor de dilución	Concentración de glucosa (g/L)
0.140	1	1.32

4.4. Datos de cuantificación de glucosa

Concentración de glucosa en Hidrolizado de granos gastados de cervecería

Empleando la curva de calibración de glucosa y el kit de glicemia enzimática se determinó que el hidrolizado de granos gastados de cervecería tenía una concentración de glucosa de 6.19 g/L, a una concentración de azúcares reductores de 100 g/L.

Cuadro 30: Resultados de la cuantificación de glucosa en el hidrolizado por método DNS

Absorbancia	Factor de dilución	Concentración de glucosa
1.987	1	6.19

Concentración de glucosa en el Extracto de levadura cervecera residual

Empleando la curva de calibración de glucosa y el kit de glicemia enzimática se determinó que el extracto de levadura cervecera residual tenía una concentración de glucosa de 0.108 g/L, a una concentración de extracto de levadura de 30 g/L.

Cuadro 31: Resultados de la cuantificación de glucosa en el extracto de levadura por método DNS

Absorbancia	Factor de dilución	Concentración de glucosa
0.009	1	0.108

4.5. Datos de cuantificación de nitrógeno total

Cuadro 32: Resultados de la cuantificación de nitrógeno total en hidrolizado (solución a 100 g/L azúcares reductores).

Lectura (mg/L)	Factor de dilución	N total (mg/L)	Promedio N total (mg/L)
8.0	250	2000	1960
12.8	150	1920	

Cuadro 33: Resultados de la cuantificación de nitrógeno total en extracto de levadura (solución a 30 g/L extracto de levadura).

Lectura (mg/L)	Factor de dilución	N total (mg/L)	Promedio N total (mg/L)
4.8	600	2880	2900
14.6	200	2920	

Cuadro 34: Resultados de la cuantificación de nitrógeno total en el diseño experimental

Variables		Nitrógeno total inicial* (mg/L)	Nitrógeno total residual** (mg/L)	% N consumido
X_1 (g/L)	X_2 (g/L)			
10	1	285	210	26.3
10	5	671	480	28.5
30	1	661	408	38.3
30	5	1048	720	31.3
5.86	3	400	308	23.0
34.14	3	930	402	56.8
20	0.17	393	252	35.9
20	5.83	940	366	61.1
20	3	666	369	44.6

X_1 : concentración inicial de azúcares reductores; X_2 : concentración inicial de extracto de levadura

*calculado a partir del contenido de nitrógeno del hidrolizado y el extracto de levadura.

** cuantificado con el kit de nitrógeno total.

4.6. Datos de cuantificación de PHB

Cuadro 35: Resultados de cuantificación de PHB para la cinética de la cepa *Bacillus* sp. B23 en el medio definido M.

Tiempo (h)	Biomasa pesada (mg)	Masa (ng) de PHB en volumen inyectado*	Masa (mg) De PHB en muestra	mg PHB/mg Biomasa	%PHB	%PHB promediado
Inóculo	5.1	398.484	1.494	0.293	29.300	29.300
21	5.3	782.536	2.935	0.554	55.368	55.972
	3.5	528.034	1.980	0.566	56.575	
45	3.6	475.857	1.784	0.496	49.568	50.024
	3.9	524.994	1.969	0.505	50.480	
70	4.3	492.652	1.847	0.430	42.964	48.258
	3.8	542.660	2.035	0.536	53.552	

*Volumen inyectado = 10 ul

Cuadro 36: Resultados de cuantificación de PHB para la cinética de la cepa *Bacillus* sp. B23 en el medio complejo H + EL.

Tiempo (h)	Biomasa pesada (mg)	Masa (ng) de PHB en volumen inyectado*	Masa (mg) De PHB en muestra	mg PHB/mg Biomasa	%PHB
12	4.8	227.7817	0.8542	0.178	17.7954
22	5.7	720.4173	2.7016	0.474	47.3959
36	5	534.4175	2.0041	0.4008	40.0813
48	4.9	315.9251	1.1847	0.2418	24.1779
61	5.3	334.4834	1.2543	0.2367	23.6663
84.5	6.2	245.0622	0.919	0.1482	14.8223

*Volumen inyectado = 10 ul

Cuadro 37: Resultados de cuantificación de PHB para el diseño experimental.

Variables		Biomasa pesada (mg)	Masa (ng) de PHB en volumen inyectado*	Masa (mg) de PHB en muestra	%PHB**	%PHB promediado
X_1 (g/L)	X_2 (g/L)					
5.86	3	3.8	114.49	0.4293	10.056	12.3844
5.86	3	4.3	189.524	0.7107	14.711	
10	1	3.7	221.366	0.8301	19.969	22.001
10	1	3.8	273.596	1.0260	24.032	
10	5	4.4	386.286	1.4486	29.985	31.038
10	5	4.3	413.435	1.5503	32.092	
20	0.17	4.4	282.009	1.0575	21.393	24.444
20	0.17	4.9	403.635	1.5136	27.495	
20	3	4.3	575.774	2.4103	44.693	44.693
20	3	3.8	466.377	2.1591	40.965	40.965
20	3	4.7	642.767	1.7771	45.647	45.647
20	3	3.9	473.900	1.7489	40.558	40.558
20	5.82	4.1	590.904	2.2159	48.105	48.018
20	5.82	3.9	560.038	2.1001	47.930	
30	1	4.4	610.214	2.2883	46.290	47.957

continuación

30	1	4.0	594.682	2.2301	49.623	
30	5	3.7	558.648	2.0949	50.396	51.385
30	5	4.3	674.723	2.5302	52.374	
34.14	3	3.8	597.836	2.2419	52.512	54.274
34.14	3	3.7	621.167	2.3294	56.036	

*volumen inyectado = 10 ul

**valores corregidos con estándares de contenido conocido con un factor de 1.1235. Es decir, el contenido de PHB se sobreestimaba (12.35%), por lo que se tuvo que corregir dividiendo entre el factor de corrección.

Cuadro 38: Resultados de cuantificación de PHB para la validación

Variables		Biomasa pesada (mg)	Masa (ng) de PHB en volumen inyectado*	Masa (mg) de PHB en muestra	%PHB
X_1 (g/L)	X_2 (g/L)				
34.14	4.41	4.6	681.6643	2.5562	55.570
34.14	4.41	4.8	700.0491	2.6252	54.691
34.14	4.41	5.1	751.7339	2.8190	55.275

* volumen inyectado = 10 ul

ANEXO 5: Análisis estadístico y pruebas estadísticas

5.1. Cuadros de Efectos Estimados

Cuadro 39: Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta de Productividad (Q_{PHB}).

Factor	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-95.% Limite de Conf.	+95.% Limite de Conf.	Coeff.	Err. Est.Coef.	-95.% Limite de Conf.	+95.% Limite de Conf.
Interacción	0.086247	0.004093	21.07105	0.000001	0.076232	0.096263	0.086247	0.004093	0.076232	0.096263
(1)Azúcares reductores (g/L)(L)	0.074781	0.005789	12.91864	0.000013	0.060617	0.088945	0.037391	0.002894	0.030308	0.044473
Azúcares reductores (g/L)(Q)	-0.025980	0.006472	-4.01428	0.007004	-0.041816	-0.010144	-0.012990	0.003236	-0.020908	-0.005072
(2)Extracto de levadura (g/L)(L)	0.047982	0.005789	8.28895	0.000167	0.033817	0.062146	0.023991	0.002894	0.016909	0.031073
Extracto de levadura (g/L)(Q)	-0.016528	0.006472	-2.55385	0.043266	-0.032364	-0.000692	-0.008264	0.003236	-0.016182	-0.000346
1(L) x 2(L)	0.004004	0.008186	0.48914	0.642109	-0.016027	0.024035	0.002002	0.004093	-0.008013	0.012018

Significancia para valores $p \leq 0.05$

Cuadro 40: Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta de contenido de PHB (%PHB).

Factor	Effect	Std.Err.	t(6)	p	-95.% Limite de Conf.	+95.% Limite de Conf.	Coeff.	Err. Est.Coeff.	-95.% Limite de Conf.	+95.% Limite de Conf.
Interacción	42.96591	2.211142	19.43154	0.000001	37.5554	48.37638	42.96591	2.211142	37.55544	48.37638
(1)Azúcares reductores (g/L)(L)	26.38593	3.127027	8.43802	0.000151	18.7344	34.03749	13.19297	1.563514	9.36719	17.01875
Azúcares reductores (g/L)(Q)	-7.97947	3.496123	-2.28238	0.062595	-16.5342	0.57524	-3.98973	1.748061	-8.26708	0.28762
(2)Extracto de levadura (g/L)(L)	11.45114	3.127027	3.66199	0.010554	3.7996	19.10270	5.72557	1.563514	1.89979	9.55135
Extracto de levadura (g/L)(Q)	-5.07749	3.496123	-1.45232	0.196623	-13.6322	3.47722	-2.53874	1.748061	-6.81610	1.73861
1(L) x 2(L)	-2.80467	4.422284	-0.63421	0.549342	-13.6256	8.01627	-1.40234	2.211142	-6.81281	4.00813

Significancia para valores $p \leq 0.05$

5.2. Cuadros de ANOVA

Cuadro 41: Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la respuesta %PHB.

Factor	SS	df	MS	F	p
Azúcares reductores (g/L) (X_1)	1392.435	1	1392.435	71.20027	0.000151 ^a
Azúcares reductores (g/L)(X_1^2)	101.875	1	101.875	5.20924	0.062595
Extracto de levadura (g/L) (X_2)	262.257	1	262.257	13.41017	0.010554 ^a
Extracto de levadura (g/L) (X_2^2)	41.249	1	41.249	2.10923	0.196623
(X_1) x (X_2)	7.866	1	7.866	0.40223	0.549342
Error Total	117.340	6	19.557		
Falta de ajuste	97.366	3	32.455	4.8747	0.112938 [#]
Error Puro	19.974	3	6.658		
Total SS	1901.976	11			

$R^2 = 0.938$ y R^2 Ajustado=0.887.

Valor-F > $F_{0.05(1,6)}$ tabular = 5.99.

SS: Suma de cuadrados; df: grados de libertad; MS: cuadrado medio

^a Significativo para valores-p ≤ 0.05

[#] Falta de ajuste no significativa

Cuadro 42: Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la respuesta Q_{PHB} .

Factor	SS	df	MS	F	p
Azúcares reductores (g/L) (X_1)	0.011184	1	0.011184	166.8912	0.000013 ^a
Azúcares reductores (g/L) (X_1^2)	0.001080	1	0.001080	16.1145	0.007004 ^a
Extracto de levadura (g/L) (X_2)	0.004604	1	0.004604	68.7067	0.000167 ^a
Extracto de levadura (g/L) (X_2^2)	0.000437	1	0.000437	6.5221	0.043266 ^a
(X_1) x (X_2)	0.000016	1	0.000016	0.2393	0.642109
Error Total	0.000402	6	0.000067		
Falta de ajuste	0.000282	3	0.000094	2.3377	0.251856 [#]
Error Puro	0.000120	3	0.000040		
Total SS	0.017501	11			

$R^2 = 0.977$ y R^2 Ajustado=0.958.

Valor-F > $F_{0.05(1,6)tabular} = 5.99$.

SS: Suma de cuadrados; df: grados de libertad; MS: cuadrado medio

^a Significativo para valores-p ≤ 0.05

[#] Falta de ajuste no significativa

5.3. Prueba de Deseabilidad

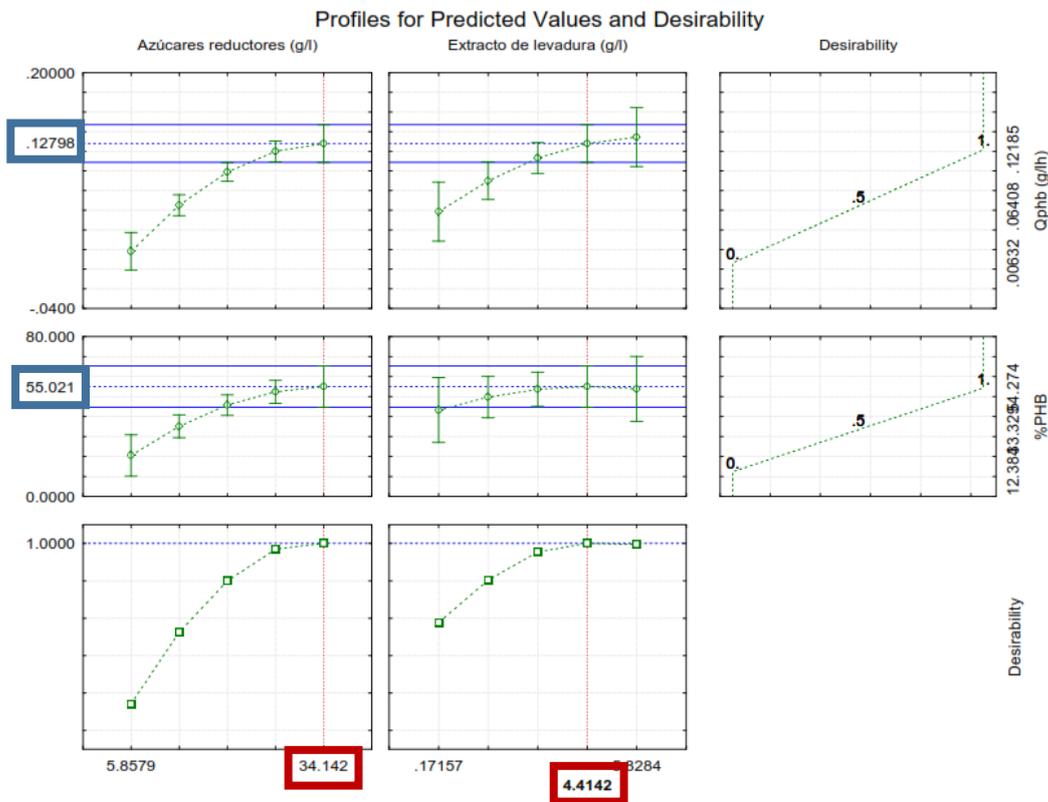


Figura 53. Perfil de Valores predichos y Deseabilidad. En cuadrados azules están los valores predichos para las respuestas, y en cuadrados rojos los valores de las variables independientes que optimizan la producción.

ANEXO 6: Cromatogramas

6.1. Cromatograma de azúcares en hidrolizado

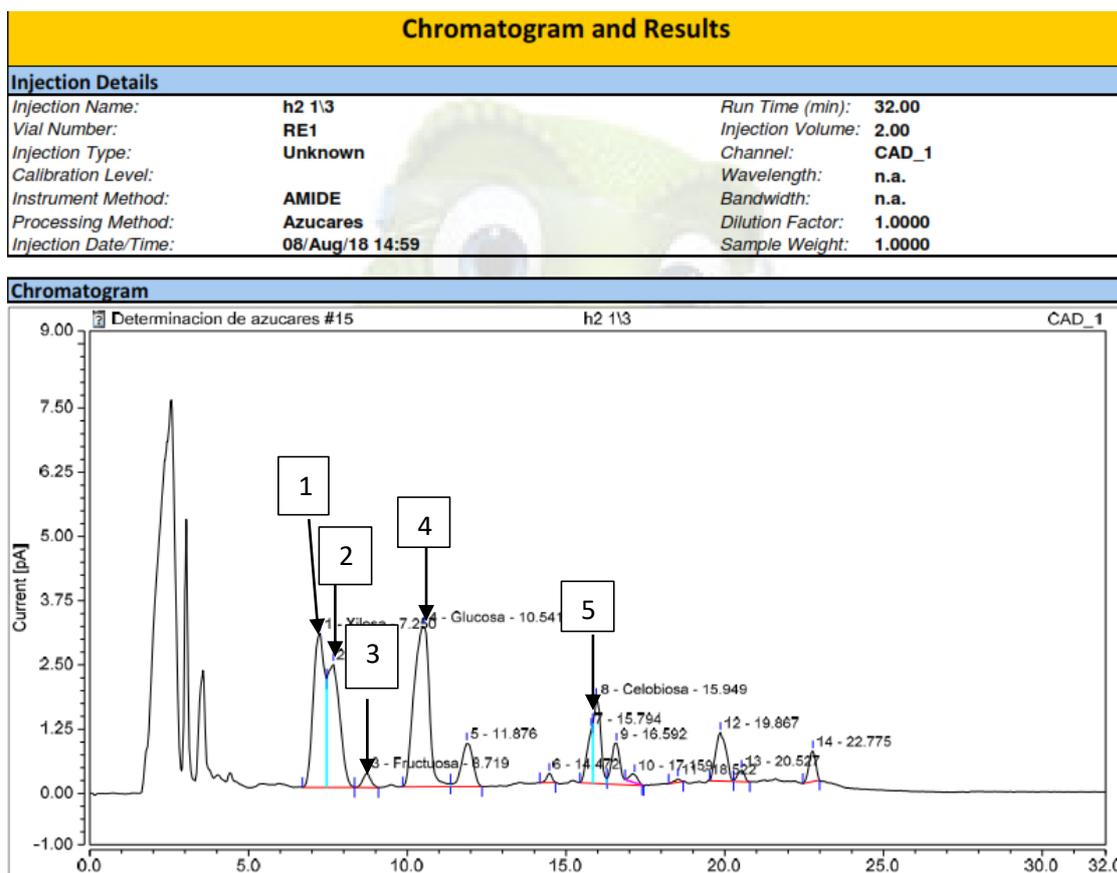


Figura 54. Cromatograma de azúcares en el hidrolizado de granos gastados de cervecía, diluido 1:3. 1. Xilosa. 2. Arabinosa. 3. Fructosa. 4. Glucosa. 5. Celobiosa

6.2. Cromatograma de consumo de azúcares en hidrolizado

Se observó una disminución significativa del pico de glucosa a las 22 horas. Luego disminuyó el pico xilosa, seguido del de arabinosa. Cabe resaltar que estos dos picos se superponían con el método que se probó en ese momento y el programa no los diferenciaba. Aún es necesario mejorar el método para poder cuantificar adecuadamente. Se observó también que cuando el pico de xilosa desapareció cerca de las 48 h, en la siguiente muestra (61 h) el programa lo consideraba como xilosa por estar sus tiempos de retención muy cerca. En realidad se trata de arabinosa.

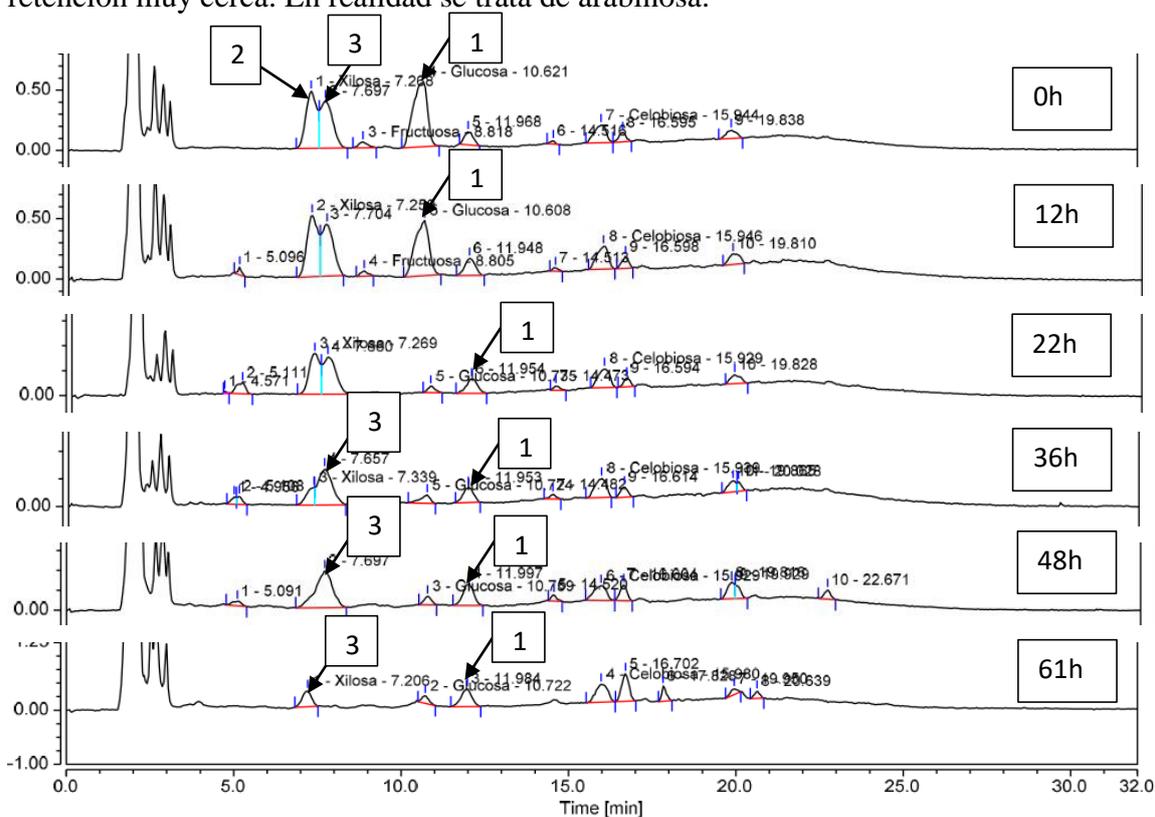


Figura 55. Cromatogramas superpuestos de muestras de sobrenadante de la cinética en medio complejo H + EL. Las flechas indican los azúcares para mayor claridad: 1. Glucosa, 2. Xilosa y 3. Arabinosa.

ANEXO 7: Cálculos de biomasa teórica esperada

7.1. Cálculo de la biomasa teórica esperada para el medio M.

Los cálculos de biomasa celular esperada se realizaron considerando una composición de biomasa típica (Egli, 2009), que se muestra en el Cuadro 43.

Cuadro 43. Composición elemental de la biomasa de bacterias.

Elemento	%
C	50
O	21
N	12
P	3
S	1
K	1
Mg	0.5
Fe	0.5
Ca	1
Mn	0.5
Zn	0.5
Co	0.5
Cu	0.5

FUENTE: (Egli, 2009)

El medio M modificado tiene la composición mostrada en el Cuadro 44.

Cuadro 44. Composición del medio M modificado.

Medio M modificado	
Nutrientes	g/L
Glucosa	20
Na ₂ HPO ₄	3.59
KH ₂ PO ₄	1.5
NaCl	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
NH ₄ Fe(III) citrate	0.05
CaCl ₂	0.015
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2
Sol traza SL6 (10X)	100 uL
Composición de SL6 (10x)**	g/L
ZnSO ₄ *7H ₂ O	1
H ₃ BO ₃	3
CoCl ₂ *6H ₂ O	2
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.094
NiCl ₂ *6H ₂ O	0.2
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.3
MnCl ₂ *4H ₂ O	0.31

**concentrado 10 veces. Fuente: Modificado de (Rodríguez-Contreras et al., 2013)

A partir de esta composición se calculó el contenido de los macroelementos y los microelementos que se muestran en el Cuadro 45.

Cuadro 45. Cálculo de las capacidades de biomasa del medio de cultivo

Elemento	PM	E (g/L)	Y _{x/e} (g/g)	X (g/L)	F.E.
C	12	7.99307267	1	7.993	2.24927579
N	14	0.42643447	8.33333333	3.554	1
P	31	1.12544884	33	37.140	10.4512599
K	39	0.42987681	100	42.988	12.0968685
S	32	0.51030145	100	51.030	14.3600432
Mg	24.3	0.01971842	200	3.944	1.10976531
Fe	55.84	0.01053589	200	2.107	0.59296645
Mn	54.93	0.00000848	10000	0.085	0.02387329
Co	58.93	0.00004954	100000	4.954	1.39394674
Ca	40.08	0.00545252	10000	54.525	15.3435619
Cu	63.55	0.00000239	100000	0.239	0.06722575
Zn	65.38	0.00002274	100000	2.274	0.63982484
Na	22.99	1.55587597	10000	15558.760	4378.28392

PM: Peso molar del elemento químico; E: Concentración del elemento químico en medio de cultivo; Y_{x/e}: Rendimiento de Biomasa respecto al elemento químico asumiendo una composición típica para bacterias (Egli, 2009)

Las concentraciones de los macroelementos y microelementos del Cuadro 45 se calcularon a partir del peso molar de cada elemento y la composición del medio de cultivo en el Cuadro 44. Los rendimientos Y_{x/e} se calcularon a partir de la composición de biomasa asumida en el Cuadro 43 (Egli, 2009), al menos para los nutrientes principales. En el caso de algunos micronutrientes, estos valores se obtienen de la literatura (Egli, 2009, 2015). Por ejemplo, para el caso del nitrógeno, este parámetro se calcula dividiendo $100/12 = 8.333$, donde 12 es el % de nitrógeno asumido como parte de la composición de la bacteria y 100 es el total, es decir 100%. El rendimiento Y_{x/e} tiene dimensiones de masa (g) o concentración (g/L) de biomasa por masa (g) o concentración (g/L) del elemento químico evaluado. Es decir, lo que representa 8.333 es la cantidad de gramos o gramos por litro de biomasa que se obtienen a partir de 1 g o 1 g/L de nitrógeno. Las unidades dependen del uso que se le quiera dar al parámetro. Entonces, para calcular la biomasa teórica, simplemente se multiplicó el rendimiento por el contenido del elemento en el medio de cultivo. Es así que, por ejemplo, para la concentración de biomasa predicha a partir de la concentración de nitrógeno se obtuvo 3.55 g/L después de multiplicar 8.333

x 0.4264 g/L. Resaltado en amarillo en el Cuadro 45 se encuentra el nutriente asumido como limitante, en este caso el nitrógeno. Los factores de exceso se calcularon dividiendo todas las concentraciones de biomasa, entre la concentración de biomasa obtenida a partir del nutriente que se supone debe ser limitante. Estos factores permiten diferenciar qué nutrientes se encuentran en exceso, y cuáles podrían estar limitando el normal crecimiento de los microorganismos, según la composición asumida de estos. En el caso del medio M, se puede apreciar que varios micronutrientes del medio podrían ser limitantes, como el Fe, Mn, Cu o Zn. Esto significa que probablemente el nitrógeno no sea el nutriente limitante. Sin embargo, esto depende de la composición exacta del microorganismo empleado y de las afinidades que este tenga por los nutrientes. Para esto se tendría que realizar un análisis de la composición elemental del microorganismo y estudios cinéticos que evalúen diferentes concentraciones de los micronutrientes y verificar en qué momento estos pueden limitar el crecimiento al estar los demás componentes en exceso.

7.2. Cálculo de la biomasa teórica esperada para el medio H

Asumiendo la composición elemental de las bacterias del Cuadro 43, se calculó la concentración de biomasa teórica esperada para el medio H, empleando la concentración de nitrógeno total presente en el medio de cultivo. En este caso, el contenido de nitrógeno para una composición de medio de cultivo con 20 g/L de azúcares reductores es de 0.3762 g/L de nitrógeno total. Este valor se obtuvo al dividir la concentración de nitrógeno total del hidrolizado concentrado, 1.96 g de nitrógeno total /L (a 104.2 g/L de azúcares reductores) entre 5.21 que es la constante de proporcionalidad obtenida dividiendo 104.2 g/L entre 20 g/L, que es la concentración de azúcares reductores empleada en el medio H. Con este contenido de nitrógeno y asumiendo un $Y_{x/e}$ de 8.333, se calculó la concentración de biomasa teórica (sin acumulación de polímero), que en este caso fue de 3.13 g/L.

7.3. Cálculo de la biomasa teórica esperada para el medio H + EL

Asumiendo la composición elemental de las bacterias del Cuadro 43, se calculó la concentración de biomasa teórica esperada para el medio H + EL, empleando la concentración de nitrógeno total presente en el medio de cultivo. En este caso, el contenido de nitrógeno para una composición de medio de cultivo con 20 g/L de azúcares reductores y 2 g/L de extracto de levadura es de 0.57 g/L de nitrógeno total. Este valor se obtuvo al sumar el contenido de nitrógeno aportado por el hidrolizado y por el extracto de levadura. Con este contenido de nitrógeno y asumiendo un $Y_{x/e}$ de 8.333, se calculó la concentración de biomasa teórica (sin acumulación de polímero), que en este caso fue de 4.75 g/L.

7.4. Cálculo de la biomasa teórica esperada para los ensayos de optimización

Asumiendo la composición elemental de las bacterias del Cuadro 43, se calculó la concentración de biomasa teórica esperada para los medios de cultivo elaborados para los ensayos de optimización, empleando la concentración de nitrógeno total presente en el medio de cultivo. En este caso, el contenido de nitrógeno para una composición de medio de cultivo se cuantificó al inicio y final de la fermentación. Con el valor inicial se obtuvo la biomasa teórica esperada si es que se consumiera todo el contenido de nitrógeno, es decir asumiendo que este nutriente es el limitante. Este valor se muestra en el Cuadro 46 como biomasa teórica I. Cabe destacar que este valor no considera acumulación de polímero, es decir, solo se trata de biomasa celular, ya que la composición elemental que se usa para los cálculos es de una bacteria promedio sin acumulación de polímeros. El polímero PHB no contiene nitrógeno, solo la biomasa celular (proteínas). La biomasa teórica se calculó de forma similar a los casos anteriores. Se sumó el contenido de nitrógeno aportado por el hidrolizado y por el extracto de levadura. Con este contenido de nitrógeno y asumiendo un $Y_{x/e}$ de 8.333, se calculó la concentración de biomasa teórica (sin acumulación de polímero). En el Cuadro 46 también se muestra la “biomasa real” obtenida después de restar la acumulación de PHB. A esta biomasa también se le conoce como biomasa residual.

Cuadro 46. Biomasa teórica y real obtenidas en los ensayos de optimización.

Variables		Nitrógeno total inicial (g/L)	Biomasa teórica I (g/L)	Biomasa real (g/L)
X_1 (g/L)	X_2 (g/L)			
10	1	0.285	2.38	1.043
10	5	0.671	5.59	2.371
30	1	0.661	5.51	2.127
30	5	1.048	8.73	2.767
5.86	3	0.400	3.33	1.075
34.14	3	0.930	7.75	2.306
20	0.17	0.393	3.28	2.032
20	5.83	0.940	7.83	2.908
20	3	0.666	5.55	2.746

X_1 : concentración inicial de azúcares reductores; X_2 : concentración inicial de extracto de levadura

Sin embargo, la biomasa teórica mostrada en el Cuadro 46 asume el consumo total del nitrógeno presente en el medio, lo cual no ocurrió puesto que se midió nitrógeno total remanente (Cuadro 15). Por ello, con la diferencia entre el nitrógeno total inicial y final en el medio, es decir con el nitrógeno consumido se puede calcular la biomasa teórica II, que es la que en realidad se supone que debería estar presente en el medio, asumiendo que la composición elemental del microorganismo empleado es la del Cuadro 43. Como se puede observar en el Cuadro 47, existen casos en los que la biomasa real supera la biomasa teórica II (es importante recordar que la biomasa real se refiere a la biomasa residual después de restar el contenido de PHB acumulado). En los casos mencionados, esto se debe a que, en condiciones de contenido de nitrógeno bajo, la composición del microorganismo cambia, por lo que el rendimiento $Y_{x/e}$ para el nitrógeno es diferente al teórico asumido de N del 12%. Esto se ha comprobado en análisis elementales de microorganismos en condiciones variables de nutrientes, entre ellos nitrógeno. Por ejemplo, si se cambia a 7% la composición de nitrógeno de las bacterias, la biomasa teórica se acerca a la real obtenida. En los casos donde la biomasa teórica supera a la biomasa real, esto puede deberse a lo contrario, ya que en estos casos el contenido de nitrógeno es relativamente alto y se promueve un mayor contenido de N en la biomasa.

Cuadro 47. Biomasa teórica y real obtenidas en los ensayos de optimización.

Variables		Nitrógeno		
X_1 (g/L)	X_2 (g/L)	total consumido (g/L)	Biomasa teórica II (g/L)	Biomasa real (g/L)
10	1	0.075	0.625	1.043
10	5	0.191	1.592	2.371
30	1	0.253	2.108	2.127
30	5	0.328	2.733	2.767
5.86	3	0.092	0.767	1.075
34.14	3	0.528	4.400	2.306
20	0.17	0.141	1.175	2.032
20	5.83	0.574	4.783	2.908
20	3	0.297	2.475	2.746

X_1 : concentración inicial de azúcares reductores; X_2 : concentración inicial de extracto de levadura