



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA



Maestría Interinstitucional en Biotecnología

Tesis de Maestría presentada como requisito para optar al título de:

Máster en Biotecnología

Título

Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp productoras de enzimas proteolíticas, y propuesta de un proceso de producción de hidrolizado proteico a Escala Piloto, utilizando el extracto crudo enzimático obtenido.

Elaborada por:

Elda Alejandra González Castro
Ingeniera Química

Tutor:

Dr. Ing. Roberto González Castellanos,
Director Ejecutivo
Compañía Centroamericana de Biogás S. A

Noviembre 2018



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AGRARIA



Universidad
Nacional
Autónoma de
Nicaragua, León.
"A La Libertad Por La Universidad"



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA



1967
Universidad
Politécnica
de Nicaragua
Sirviendo a la Comunidad



Líder en Ciencia y Tecnología

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi roca y mi fortaleza.

A mis padres José Santiago González y Ana María Castro, por ser luz en mi vida, por enseñarme a luchar día a día por las metas que me he propuesto.

A mi amado esposo Jorge Ernesto Aragón y a mis hermanas Gabriela y Ana Francis porque fueron fuente de inspiración y de fuerza.

A Doña Ana Mercedes Medina, por contagiarme de su espíritu inquebrantable, por estar ahí cuando yo no pude estar con mi familia.

AGRADECIMIENTO

Gracias Dios, por haberme permitido cumplir esta meta, regalarme salud y una familia maravillosa.

A mi tutor Dr. Roberto González Castellanos por confiar en mí para la realización de este proyecto, por su paciencia y guía en todas las etapas de este. Al Dr. Leandro Paramo por colaborarnos a través de su proyecto y por su asesoramiento técnico en la parte microbiológica y de Biología Molecular.

A mi colega el Dr. Omar Navarro, docente investigador de la Universidad Nacional Agraria y responsable del Laboratorio de Microbiología, por brindarme el espacio para realizar los últimos experimentos. Al Lic. Jorge Esquivel por su asesoría en el análisis estadístico.

A la Dra. Martha Lacayo, por su apoyo a través del Laboratorio de Biotecnología y sus sabios consejos.

Por último, pero no menos importante, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) por auspiciar este proyecto y a la Universidad Nacional Agraria, a la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua de Managua (UNAN-M), a la Universidad Autónoma de Nicaragua de León (UNAN-L), a la Universidad Politécnica de Nicaragua (UPOLI), a la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), por ser las instituciones promotoras de la Maestría Interinstitucional de Biotecnología, que realizaron el aporte invaluable como son los docentes, que apoyaron con sus laboratorios y reactivos. Estas instituciones fueron verdaderas casas de estudio con puertas abiertas para mí durante mi investigación.

CARTA DEL TUTOR

La ingeniera **Elda Alejandra González** ha desarrollado su Tesis de Maestría como último requisito para optar por el título de Máster en Biotecnología, en el grado de post-grado / especialidad, cuyo título es: *Aislamiento y caracterización de cepas de **Bacillus spp** productoras de enzimas proteolíticas, y propuesta de un proceso de producción de hidrolizado proteico a Escala Piloto, utilizando el extracto crudo enzimático obtenido*, reuniendo todos los requisitos para ser presentado como Trabajo de Tesis. Durante la realización de esta investigación la Ing. Elda Alejandra González Castro demostró su alto grado de responsabilidad, motivación y espíritu emprendedor. Así mismo desarrolló habilidades y destrezas que sin lugar a dudas darán pautas para el desarrollo de la biotecnología en el país. Por todo lo antes planteado, consideramos que la presente Tesis de Maestría ha cumplido con todas las normas estipuladas para el presente Programa de Postgrado, por lo cual puede ser sometida a su defensa y evaluación final.

Felicito a la Ing. González por su esfuerzo como investigadora y amplia gestión dentro de las universidades participantes que permitió la realización y culminación de éste trabajo.

Atentamente



Dr. Ing. Roberto González Castellanos

Tutor

Director Ejecutivo

Compañía Centroamericana de Biogás, S. A.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	13
II. JUSTIFICACIÓN	15
III. ANTECEDENTES	17
IV. OBJETIVOS	20
Objetivos Generales	20
Objetivos Específicos	20
VI. MARCO TEÓRICO	21
5.1 Enzimas	21
5.1.1 Utilización de las enzimas.	21
5.1.2 Obtención de las enzimas.	22
5.1.3 Actividad Enzimática.	24
5.1.4 Cinética Enzimática Simple.	26
5.2 Obtención de hidrolizados	28
5.3 Características de los Bacillus spp.	31
5.3.1 Enzimas proteolíticas secretadas por <i>Bacillus spp.</i>	32
5.3.2 Regulación de la síntesis de proteasa alcalina en bacilos.	33
5.3.3 Método de producción.	34
5.3.4 Fuente del medio de cultivo.	35
5.3.5 Periodo de Incubación.	35
5.3.6 Temperatura de incubación.	36
5.3.7 Especificidad por el sustrato.	37
5.3.8 Efectos de iones metálicos y estabilizadores y aditivos.	37
5.4 Elementos de Cinética Microbiana.	39
5.5 Identificación Bacteriana.	43
5.6 Escalado de procesos Biotecnológicos	47
5.6.1 Etapas a considerar en los trabajos de Investigación y Desarrollo (I+D).	47
5.7 Uso de los Softwares para la Modelación Matemática de Biorreactores	54

5.8	Análisis Estadístico.....	60
5.8.1	Definición de la Población y tamaño de la muestra.....	60
5.8.2	Análisis Estadístico de Varianza Univariado.....	61
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
4.1	Ubicación del área de estudio.....	65
4.2	<i>Población y tamaño de la muestra</i>	66
4.3	<i>Fase Experimental (“in vitro”)</i>	67
4.4	<i>Fase de Simulación</i>	77
VIII.	RESULTADOS.....	86
8.1.	<i>Fase Experimental (“in vitro”)</i>	86
8.2.	<i>Fase de Simulación Escalado de la Producción del ECE in silico</i>	108
IX.	DISCUSIÓN.....	136
1.	<i>Proceso de selección y caracterización de cepas</i>	136
2.	<i>Producción del ECE a Escala de Laboratorio y desarrollo del modelo matemático correspondiente.</i>	139
X.	CONCLUSIONES.....	140
XI.	RECOMENDACIONES.....	141
XII.	ANEXOS.....	142
	Anexo 1. Imágenes.....	142
	Anexo 2. Preparación de medios de cultivo y resultados de pruebas bioquímicas.	145
	Anexo 3. Resultados de la Identificación molecular.....	152
	Anexo 4. Cálculo de actividad enzimática utilizando caseína como sustrato.....	155
	Anexo 5. Datos de Actividad enzimática corridas en el agitador con medio modificados y transformada de datos raíz cuadrada. (Raiz_ UaXml).	156
	Anexo 6 Análisis estadístico de datos por ANOVA.....	157
	Anexo 7. Reglas del Lenguaje de STELLA.....	160
	Anexo8. Resumen de Resultados de la Modelación del Proceso con SPD.....	166
	Indice de Imágenes.....	171
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	172

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la proteasa alcalina de <i>Bacillus licheniformis</i> con la aplicación del Método de Lineweaver Burke (Elizabeth Lira Silva & Ricardo Jasso Chávez, 2013).	28
Tabla 2. Actividad de la proteasa alcalina del <i>Bacillus licheniformis</i> a diferentes valores de pH (Elizabeth Lira Silva & Ricardo Jasso Chávez, 2013).....	29
Tabla 3. Bioquímica correspondiente a <i>Bacillus Subtilis</i> , según Jenny Paola Cuervo Lozada, 2010.	44
Tabla 4. Recomendaciones para la utilización del análisis del ARNr 16S y del gen <i>rpoB</i> (Germán Bou et al., 2011).	46
Tabla 5. Composición de medios modificados a los cuales se les evaluará como respuesta del tratamiento actividad enzimática.....	74
Tabla 6. Efecto en los diferentes Criterios de Escalado, cuando se cambia uno de ellos (Roberto A. González Castellanos, 2018b).	80
Tabla 7. Datos de constantes cinéticas de Bacilos y otros microorganismos (elaboración propia como resultado de la revisión bibliográfica, con referencia en cada cita).	82
Tabla 8. Coeficientes cinéticos seleccionados para los Modelos.....	83
Tabla 9. Muestreo y Codificación del material de estudio.	87
Tabla 10. Cantidad de microorganismos aislados a partir de las matrices muestreadas.	88
Tabla 11. Lectura de las reacciones a las pruebas de catalasa.	89
Tabla 12. Pruebas bioquímicas aplicada en los microorganismos de estudio.	90
Tabla 13. Resultados de las pruebas por sensibilidad a los antibióticos.....	91
Tabla 14. Halo de hidrolisis obtenido.....	92
Tabla 15. Identificación por secuenciación de las cepas de estudio.....	94
Tabla 16. Curva de calibración de la determinación de AE.....	95
Tabla 17. Actividades enzimáticas de las cepas en estudio	96
Tabla 18. Resultados de Prueba de Homogeneidad de Levene, extraída de InfoStat, (Versión libre).	100
Tabla 19. Halo de hidrolisis de caseína del crecimiento a las 24 horas.	108
Tabla 20. Dimensiones geométricas de los Fermentadores a utilizar en el Escalado del proceso de producción de ECE.....	111
Tabla 21. Resumen del Escalado de los Fermentadores desde el Banco hasta la Industria.....	112
Tabla 22. Balance global por componentes (kg x templa),	131
Tabla 23. Resumen Ejecutivo Evaluación económica anual.....	132
Tabla 24. Resumen de la Evaluación Económica en un periodo de 15 años.	133
Tabla 25 Resultados Prueba de catalasa	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Velocidad de reacción inicial R_0 representada frente a la concentración de sustrato S para una reacción que obedece a la cinética de Michaelis – Menten (https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=10707211).....	27
Figura 2. Trayectoria de crecimiento celular en cultivo estacionario. (Tomado del Brock 2012).	39
Figura 3. Fases de Crecimiento de los microorganismos: (A) Fase lag; (B) Crecimiento acelerado; (C) crecimiento exponencial; (D) crecimiento desacelerado; (E) Fase estacionaria; (F) Fase de Muerte.(tomado de Shijie Liu, 2017)	41
Figura 4. Crecimiento obtenido. Según la Ecuación de Monod (curva superior); según la de Haldane (curva inferior). Tomado de (Víctor Manuel Trejos, Javier Fontalvo Alzate, & Miguel Ángel Gómez García, 2009).	42
Figura 5. Proceso de do del 1,4-Butanodiol, aparentemente sin Etapa de Laboratorio (Tomado de [Jason S. Crater & Jefferson C. Lievense, 2018]).	48
Figura 6. Ejemplo general de Escalado. Tomado de (Víctor Manuel Trejos, Javier Fontalvo Alzate, & Miguel Ángel Gómez García, 2009)	53
Figura 7. . Estrategias de Escalado para el sistema Biorreactor + Bioproceso. Tomado de Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b.	54
Figura 8. Modelo Gráfico del Cultivo Discontinuo con STELLA (izquierda); Ajuste de curva con Berkeley Madonna (derecha) Tomado de (Roberto A. Gonzalez, Mehrdad Ebrahimi, & Peter Czermak, 2009.....	55
Figura 9. Esquema de una Unidad de Fermentación Discontinua con sus flujos (izquierda); Pantalla para la entrada de los datos cinéticos de la fermentación (derecha). (Super Pro Designer 2013)	56
Figura 10. Datos de la pantalla -Profile- del Modelo Fermentación Cinética en Lote (izquierda); Resultado de la corrida de dicho modelo en SPD (derecha) Super Pro Designer 2013)	56
Figura 11. Ejemplo de Diagrama de Flujo del proceso de producción de Anticuerpos monoclonales (MAB).59	
Figura 12. Pantalla de inicio del software de análisis estadístico utilizado (Mónica G. Balzarini et al., s/f)...63	
Figura 13. Método de siembra por extensión [(Michael T. Madigan et al., 2012)]	69
Figura 14. Cebadores utilizados para identificación bacteriana.	71
Figura 15. Figura estándar de mezclador, con agitador por el tope y dos impelentes en el eje, que incluye la separación entre impelentes (S), las dimensiones del impelente (D y D_w), el diámetro (T) y la altura (H) efectiva del líquido.	78
Figura 16. Sección del árbol filogenético de aislados bacteriano según el programa MEGA 7.0.14 . El código de acceso a GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.....	93
Figura 18. Unidades/ml de actividad enzimática por cada tratamiento.....	97
Figura 19. Diagnóstico de Normalidad de residuos. El valor de R en el gráfico QQ-Plot es >0.94 (0.987) por lo que se acepta H_0 , hay normalidad de los residuos.....	99
Figura 20. Gráfico de Dispersión de los datos.....	101
Figura 21. Cepa X5CD & Raíz U/ml donde el mejor tratamiento es de 50 g/l de Levadura Torula, 75 g/l de melaza, 1.5 g/l de Ca y 39 °C	103
Figura 22. Cepa X2 & Raíz U/ml donde el mejor tratamiento es de 40 g/l de levadura torula, 50 g/l de melaza, 2 g/l de Ca y 38 °C	104
Figura 23. Cepa X5C & Raíz U/ml, cepa que al igual que la X5CD el mejor tratamiento es de 50 g/l de Levadura Torula, 75 g/l de melaza, 1.5 g/l de Ca y 39 °C	105
Figura 24. Evolución de la corrida de producción de ECE a Escala de Laboratorio.....	107

Figura 25. Datos experimentales con el medio seleccionado.....	107
Figura 26. Determinación del k_{IA} en Agitadores Orbitales Rotatorios, en función de la velocidad de agitación. Se comparan los clásicos de cristal con los desechables de policarbonato.....	109
Figura 27. Modelo del Birreactor en STELLA. (Izquierda); Ecuaciones del modelo (derecha).....	114
Figura 28. Gráfico de los principales parámetros de las corridas en STELLA.....	114
Figura 29. Resultado de la corrida, de las ecuaciones de STELLA, en Berkeley Madonna.....	116
Figura 30. Corrida del Madonna con los coeficientes cinéticos aproximados y los datos experimentales..	118
Figura 31. Resultado de la corrida del Madonna con los coeficientes. obtenidos con el Curve Fitting.	119
Figura 32. Esquema del proceso de hidrólisis enzimática de levadura (HL), con aprovechamiento total de los productos derivados.	122
Figura 33. Diagrama de Proceso (PFD) de Proceso Hidrólisis Enzimática de Levadura.	125
Figura 34. Diagrama de GANTT detallado del uso de los equipos, con la información del tiempo de duración de cada proceso y su correspondiente programación, (3 recetas completas en 43 horas).	130
Figura 35. Diagrama de GANTT del uso de equipos en tres recetas completas.	131
Figura 36. Análisis de Sensibilidad de los principales indicadores financieros (VAN y TIR) de la Evaluación Económica, ante el cambio del precio de venta de los productos.	134
Figura 37. Análisis de Sensibilidad del VAN en función del precio de Venta de Concentrado de Glucanos y Mananos (US\$/Kg).	135
Figura 38. Las cuatro variedades de Stock (Inventario).	162
Figura 39. Variantes de flujos en STELLA.....	163
Figura 40. Variantes de uso de conectores en STELLA. Sólo la de la izquierda y del centro son válidas, la de la derecha no lo es.	164
Figura 41. Modelo en STELLA que ejemplifica el uso de un convertidor.	164

ABREVIATURAS

ECE	Extracto Crudo Enzimático
HL	Hidrolizado de Levadura
SPD	SuperPro Designer
CEP	Crudo de Enzimas Proteolíticas
HSB	Hidrolizados de Sangre de Bovina
LABIOFAM	Empresa Laboratorios Farmacéuticos de Matanzas S.A
GHP	Grado de Hidrolizado de Proteínas
ADN	ácido desoxirribonucleico
TCA	Ácido Tricloro Acético
UI	Unidades Internacionales de Enzima
UV	Ultra violeta
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido
V _{max}	Velocidad máxima
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
<u>VCD</u>	Recuento celular
ARN _r	Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal
<u>I+D. A</u>	Investigación y Desarrollo Aplicado
<i>PF</i>	Diagrama de Flujo de Procesos
MAB	Anticuerpos Monoclonales
<i>DCA</i>	Diseño Completamente Aleatorio
<i>ANOVA</i>	Análisis de Varianza
TSI	Triple azúcar hierro agar
SIM	Sulfuro-Indol-Motilidad
<u>VP</u>	<u>Voges-Proskauer;</u>
<u>pb</u>	Pares de bases
F & R	Forward and reverse
PIENSA-UNI	Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente de la Universidad Nacional de Ingeniería.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
AE	Actividad Enzimática
Re	Número de Reynolds
P/V	Potencia por unidad de volumen
Q/V	Capacidad de bombeo por unidad de volumen
ND	Velocidad Periférica del impelente
K _{La}	Coefficiente de transferencia de oxígeno
K _i	Constante de inhibición por sustrato
Q/V	Flujo Volumétrico por Volumen
P/V	Potencia por unidad de volumen
vvm	Volúmenes de aire, por volumen de líquido, por minuto
S	Sustrato
X	Células
P	Productos
V	Volumen del reactor
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Elda Alejandra González Castro 2017.

Tesis de Maestría. Maestría Interinstitucional en Biotecnología.

Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus spp* productoras de enzimas proteolíticas, y propuesta de un proceso de producción de hidrolizado proteico a Escala Piloto, utilizando el extracto crudo enzimático obtenido.

Mediante un proceso de bioprospección, se aisló una cepa de *Bacillus spp*, con buena actividad proteolítica. Se definió el medio de cultivo de grado industrial para la producción de Extracto Crudo Enzimático (ECE), a partir de dicha cepa y se produjo el ECE a Escala de Laboratorio. Se desarrolló el modelo matemático para la Producción del ECE, válido para todas las escalas de producción y se ajustaron los coeficientes cinéticos del modelo, con los resultados a escala de laboratorio. Se diseñó y modeló el proceso para la producción, a escala piloto, de Hidrolizado de Levadura (HL), a partir de la crema de levadura residual de la producción de cerveza. Se hizo la Evaluación Financiera y el Análisis de Sensibilidad de dicho proceso, lo que asegura la aplicación práctica de la investigación desarrollada, mediante la obtención de un producto biotecnológico comercial a partir de un residual industrial, que además sirve de base para el ulterior desarrollo de otros productos biotecnológicos.

Palabras Clave: *Bacillus spp*, enzimas proteolíticas, actividad enzimática, modelación matemática, simulación, Simuladores de procesos biotecnológicos

I. INTRODUCCIÓN

En Nicaragua, actualmente no se producen microorganismos de uso industrial y la industria de aplicaciones biotecnológicas es limitada, por lo que la búsqueda del desarrollo de la Biotecnología Aplicada es imprescindible para el crecimiento del país. En esa dirección se dirige la presente investigación, en la cual se desarrollan oportunidades de negocio a partir de la utilización de sustratos de bajo costo, como la melaza, para la producción del *Extracto Crudo Enzimático (ECE)* y la utilización de un residuo industrial, como la crema de levadura residual del proceso de producción de cerveza para la obtención, mediante hidrólisis enzimática, de un Producto Biotecnológico comercial: el *Concentrado de Mananos y Glucanos*.

Este trabajo inicia con la selección y evaluación de una cepa de *Bacillus spp* con gran potencial en la producción de enzimas proteolíticas, con aplicaciones en la industria alimentaria, textil y tenería. Entre las cepas de *Bacillus spp*, las proteasas alcalinas más importantes que se producen son las del tipo serina, dentro de las que se encuentran las llamadas *Subtilisinas*, producidas por *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. (Sáez, 2006).

Dado que la máxima producción de proteasas alcalinas se da durante la esporulación, los tiempos de cultivo se llevan hasta la fase de meseta entre las 24 y 48 horas, para una cepa de *B. subtilis* y un medio de aplicación industrial determinado experimentalmente por sus principales componentes de fuente energética, fuente de carbono y sales.

Este microorganismo será aislado y seleccionado por bioprospección y evaluada su actividad enzimática y posteriormente se desarrollará del proceso productivo e inversión requerida para generar un extracto de levadura y polisacáridos glucanos y mananos utilizando el crudo enzimático de enzimas proteolíticas producido por un microorganismo nativo.

Esta Tesis es la base para la posterior producción en el país de hidrolizados proteicos, obtenidas a partir de las enzimas producidas por las cepas autóctonas de **Bacillus spp.**, aisladas de muestras recolectadas en las industrias cárnicas, lácteas y avícolas. Dada las limitaciones de recursos, la investigación de la obtención de enzimas “*in vitro*” llegó solamente hasta la *Escala de Laboratorio*. El *Escalado* ulterior, hasta la *Etapa Industrial*, se realizó “*in silico*” utilizando las correlaciones de *Escalado* correspondientes y aplicando la *Modelación Matemática*. En el caso de la *Producción del Hidrolizado* con las enzimas obtenidas, se definió el proceso por modelación matemática hasta nivel de *Planta Piloto* y se concretaron las recomendaciones pertinentes para el desarrollo ulterior de la *Producción Industrial de Hidrolizados de Levaduras (HL)*.

II. JUSTIFICACIÓN

La importancia de esta Tesis se justifica porque las enzimas han sido productos industriales importantes durante más de un siglo y el rango de aplicaciones potenciales de las mismas sigue aumentando rápidamente. Particularmente las proteasas, que es el tipo de enzima que se desarrolla en esta investigación, hidrolizan proteínas en unidades peptídicas más pequeñas y constituyen un gran grupo de enzimas de importancia industrial. Las proteasas constituyen aproximadamente el 60% del mercado total de enzimas (Wolfgang Aehle, 2007). Las proteasas industriales se obtienen a partir de bacterias (*Bacillus*), mohos (*Aspergillus*, *Rhizopus* y *Mucor*), páncreas de animales y plantas. La mayoría de las proteasas industriales son *endoproteasas*.

Los trabajos desarrollados en el *CEBiot* de la *UPOLI*, por limitaciones de equipamiento, se centraron en el desarrollo de hidrólisis básica de la levadura, en lugar de hidrólisis enzimática que se venía utilizando hasta ese momento (Roberto A. González, Raúl E. Piad Barreras, & Elda Alejandra Gonzalez, 2010). En realidad, ese cambio sólo afecta la eficiencia de hidrólisis, lo que provoca que el hidrolizado obtenida tenga un contenido ligeramente menor del principio activo (glucanos y mananos), lo que exige una dosis superior en su aplicación, pero con el mismo efecto final, según se pudo comprobar en las evaluaciones realizadas por el *CEBiot*, de conjunto con la Universidad Agraria (*UNA*), con muy buenos resultados. Se comprobó especialmente el funcionamiento del hidrolizado como producto prebiótico que sustituye el uso de los llamados “Antibióticos Promotores del Crecimiento (*APC*)” en la producción animal, lo que es la base de un muy grave problema de salud: el surgimiento de las denominadas “*súper bacterias*”, o sea las bacterias inmunes a los antibióticos tradicionales (Raúl E. Piad Barreras, Roberto A. Gonzalez-Castellanos, Elda Alejandra Gonzalez, Nadir Reyes, & Hermes Gonzalez, 2011).

Finalmente se ha considerado que todos los trabajos realizados en Nicaragua, encaminados a la

producción de hidrolizados proteicos para su uso en la producción animal, tanto los obtenidos por hidrólisis enzimática en *GENERIFAR* como los obtenidos por hidrólisis básica en el *CEBiot*, se han limitado a la *Escala de Laboratorio* (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009) y en ninguno de los casos se ha aplicado el Escalado “*in silico*”. Además, los Hidrolizados obtenidos, que se han podido probar con animales en condiciones adecuadas de experimentación, han sido los obtenidos mediante Hidrólisis Básica, ya que los Hidrolizados Enzimáticos obtenidos en *GENERIFAR* no fueron evaluados adecuadamente (Raúl E. Piad Barreras & Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2008), siendo la hidrólisis enzimática mucho más eficiente (Manuel L. Pérez Quintana, 2000). Esto significa que todavía queda un amplio campo para el desarrollo en esta Temática. Precisamente, conocer que existen esas posibilidades reales y que no se han podido concretar, es una de las motivaciones principales para desarrollar este trabajo, que además se dirige a la reutilización de un desecho industrial, transformándolo en un producto de mucho valor agregado.

III. ANTECEDENTES

Como antecedentes de esta investigación se conocen los trabajos iniciados en Cuba, por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Matanzas (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Manuel L. Perez, 2000), en los cuales se seleccionaron dos cepas de enzimas proteolíticas, una de *Bacillus subtilis* y otra de *B. liqueniformis*. Con ambas cepas se obtuvo un *Crudo de Enzimas Proteolíticas (CEP)* microbianas y con ese extracto crudo se pudo desarrollar (a manera de ejemplo de las posibilidades de aplicación del extracto), la producción de *Hidrolizados de Sangre Bovina (HSB)* e *Hidrolizados de Levadura (HL)*.

En esos trabajos, la producción a Escala de Banco del Hidrolizado de Levadura (*HL*) que el que interesa en esta investigación, se logró con el crudo enzimático de la cepa de *B. licheniformis*, obtenido a *Escala Industrial* (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009). En Cuba se realizaron también varios trabajos (Manuel L. Pérez Quintana, 2000) (Raúl E. Piad Barreras, 2001), sobre la evaluación del uso de estos hidrolizados en la producción animal, aunque no se evaluaron otros usos del extracto crudo, con la excepción de la producción del *Hidrolizados de Sangre Bovina (HSB)*, mencionado anteriormente, que se probó en la primera etapa de desarrollo del extracto crudo, por lo que quedó pendiente obtener hidrolizado para otros usos, entre ellos su uso como medio de cultivo para fermentaciones (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009).

Las primeras experiencias en Cuba con hidrolizados proteicos, a partir de enzimas proteolíticas microbianas se dirigieron a la obtención del hidrolizado de sangre bovina. Este hidrolizado se obtiene como producto para la salud humana y se fabrica y distribuye comercialmente por la *Empresa Laboratorios Farmacéuticos de Matanzas S. A. (LABIOFAM)*, con instalaciones en Matanzas y La Habana. Para su producción se utiliza la enzima de origen vegetal, papaína y el objetivo del trabajo

fue sustituir esa enzima de importación, por el crudo enzimático microbiano de producción nacional. El *Escalado de la Producción* de ese hidrolizado proteico se llevó a cabo pasando de la *Etapa de Laboratorio a la Etapa Piloto* y de ahí a la *Etapa Industrial*. Por las características específicas de este producto no fue necesario utilizar las *Etapas de Banco* ni *Demostrativa*. Finalmente se obtuvo un producto que se comportó satisfactoriamente en su comparación con el producido con la papaína y se obtuvo entre **37% y 39%** de *Hidrólisis Proteica*, (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009) con la ventaja adicional que el proceso completo se desarrolla en la mitad del tiempo que con la papaína (Roberto A. González Castellanos et al., 2000).

En Cuba se ajustó también la producción de *Hidrolizado de Levaduras (HL)*, con el mismo crudo enzimático de enzimas proteolíticas microbianas. Para esto se partió de la “crema de levadura residual” de una planta de producción de alcoholes y derivados. En este caso no fue necesario compararla con ningún otro proceso y se realizó el estudio solamente en dos Etapas: *Laboratorio* y *Piloto*. La *Etapa de Laboratorio* incluyó la optimización completa del proceso de obtención del hidrolizado (Manuel L. Pérez Quintana, 2000). Como resultado de la optimización se obtuvo un Grado de Hidrolizado de Proteínas (*GHP*) mayor de 45%, lo que supera el grado de hidrólisis alcanzada en la producción de Hidrolizado de Sangre Bovina – *HSB* (37 – 39%) (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009).

En ese mismo trabajo se hizo una comparación entre diferentes tipos de hidrolizados obtenidos a Escala de Laboratorio. Se probó con Hidrólisis Enzimática, Básica, Ácida, Térmica y Autolítica y se comprobó que el mejor resultado se obtuvo con la *Hidrólisis Enzimática*, aunque se aprecia que el resultado de la *Hidrólisis Básica* fue el más cercano al enzimático (Manuel Pérez Quintana, Grethel Milian Florido, Ramón Bocourt Salabarría, & Reinaldo Alemán Pérez, 2016). Estas pruebas se repitieron con Hidrolizados obtenidos a *Escala de Banco*, con igual resultado (M. Pérez et al., 2001).

Posteriormente se realizó la producción a *Escala Piloto*, para contar con mayores cantidades de hidrolizado para utilizarlo en investigaciones posteriores con animales y en dicho Escalado se obtuvieron resultados de hidrólisis muy similares a las obtenidas a *Escala de Laboratorio* (Roberto A. González Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009).

Los trabajos de Hidrólisis Enzimática se continuaron en Nicaragua, por el *Grupo de Desarrollo Biotecnológico de la Empresa GENERIFAR S. A.*, el cual logró producir exitosamente, a Escala de Laboratorio, el *Extracto Crudo Enzimático (ECE)* y obtener *Hidrolizados Enzimático de Levaduras*, el cual, en las pruebas preliminares realizadas con ganado bovino y equino, demostró su potencialidad como aditivo prebiótico.

IV. OBJETIVOS

Objetivos Generales

1. Aislar y caracterizar cepas de *Bacillus spp* productoras de enzimas proteolíticas
2. Desarrollar el proceso de producción, a escala de laboratorio, del Extracto Crudo Enzimático (*ECE*) y modelar su utilización, a escala piloto, en la producción del Hidrolizado de Levadura (*HL*).

Objetivos Específicos

1. Aislar microorganismos que responden a las características de los *Bacillus Spp*, con alta actividad proteolítica.
2. Optimizar el medio de cultivo grado industrial para la cepa de *Bacillus* seleccionada.
3. Realizar la *Modelación Matemática* y *Simulación* del proceso de producción del *ECE*, para completar “*in silico*”, las *Etapas de Escalado* (*Banco, Piloto, Demostrativa e Industrial*).
4. Modelar “*in silico*”, la utilización del *ECE* en el proceso de producción del *HL*, a partir de la crema de levadura residual de la producción de cerveza.

VI. MARCO TEÓRICO

5.1 Enzimas

5.1.1 Utilización de las enzimas.

Las enzimas se han utilizado desde la historia humana temprana, sin conocimiento de lo que eran o cómo funcionaban. Se usaban para hacer dulces del almidón, coagular la leche para hacer queso y preparar alcohol. Las enzimas se han utilizado comercialmente desde la década de 1890, cuando los extractos de células fúngicas se utilizaron por primera vez para descomponer el almidón en azúcares. La *amilasa tajadiastasa fúngica* se empleó como una ayuda digestiva en 1894 (Wolfgang Aehle, 2007).

Las enzimas generalmente se preparan mediante microorganismos cultivados en un cultivo puro y obtenido directamente de plantas y animales. Las enzimas que se producen comercialmente se pueden clasificar en tres categorías principales: enzimas industriales, enzimas analíticas y enzimas médicas. Las enzimas industriales, que son las de interés en esta investigación, son aquellas que se producen y usan en grandes cantidades, como las enzimas de conversión de almidón (*α -amilasa*, *glucoamilasa* y *glucosa isomerasa*), que se utilizan para convertir almidón en jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, ampliamente utilizado en refrescos. La *proteasa alcalina* es otro ejemplo de enzima industrial, que se agrega a los detergentes de lavandería como un auxiliar de limpieza. Las enzimas analíticas (*glucosa oxidasa*, *galactosa oxidasa*, *alcohol deshidrogenasa*, *hexoquinasa*, *muramidasa* y *colesterol oxidasa*) y médicas (*asparaginasa*, *proteasas*, *lipasas* y *estreptoquinasa*) se producen en el rango de miligramos a gramos y generalmente requieren ser altamente purificadas; por lo tanto, sus costos de producción son altos (James M. Lee, 2009).

Las enzimas han sido productos industriales importantes durante más de un siglo. El rango de aplicaciones potenciales todavía está aumentando rápidamente. Con el advenimiento de la tecnología

de ADN recombinante, ha sido posible producir en grandes cantidades, enzimas que antes eran raras y, por lo tanto, reducir el costo. Además, en la fabricación farmacéutica, el deseo de hacer compuestos quirales puros está dando lugar a nuevas oportunidades. La quiralidad es importante en un producto: en una mezcla racémica, un enantiómero a menudo es terapéuticamente útil, mientras que el otro puede causar efectos secundarios y no agregar ningún valor terapéutico. La capacidad de las enzimas para reconocer isómeros quirales y reaccionar con solo uno de ellas puede ser un componente clave en la síntesis farmacéutica. Los procesos que dependen de una mezcla de síntesis química y enzimática se están desarrollando para una nueva generación de productos farmacéuticos (Shijie Liu, 2017).

Los avances tecnológicos han facilitado el uso de enzimas en un rango cada vez más amplio de condiciones de proceso. Las enzimas de organismos que crecen en ambientes inusuales (p. ej., océanos profundos, lagos salados, fuentes termales y sitios de desechos industriales) están cada vez más disponibles para su estudio y uso potencial. Nuevas enzimas y un mejor control de las condiciones de reacción permiten el uso de enzimas en presencia de altas concentraciones de compuestos orgánicos, en ambientes acuosos con alto contenido de sal o en temperaturas, pH o presiones extremas. Al unir nuevos conocimientos sobre la relación de la estructura de la enzima con su función biológica, con la tecnología del ADN recombinante, se pueden producir enzimas diseñadas o manipuladas por el ser humano. Ya no se necesita depender únicamente de fuentes naturales para obtener las enzimas, lo que incrementa apreciablemente su rango de aplicación (Shijie Liu, 2017).

5.1.2 Obtención de las enzimas.

Las fuentes principales de producción de enzimas para empleo industrial son (Syed Tanveer & Ahmed Inamdar, 2012):

- **Animales:** La industria empacadora de carnes es la fuente principal de las enzimas derivada del páncreas, estómago e hígado de los animales, tales como la *tripsina*, *lipasas* y *cuajos* (*quimosina* y *renina*).
- **Vegetales:** La industria de la malta de cebada es la fuente principal de enzimas de cereales. Las *enzimas proteolíticas* (que degradan proteínas) tales como la *papaína* y la *bromelina* se obtienen de la papaya y del ananá, respectivamente.
- **Microbianas:** principalmente se extraen de bacterias, hongos y levaduras que se desarrollan en la industria de la fermentación. La ventaja de la obtención de enzimas microbianas es que los microorganismos se reproducen a ritmo acelerado, son fáciles de manipular genéticamente, crecen en un amplio rango de condiciones ambientales y tienen una gran variedad de vías metabólicas, haciendo que las enzimas obtenidas sean más económicas.

El primer paso en la producción a gran escala de enzimas microbianas es cultivar los organismos que producen la enzima deseada. Las condiciones de fermentación pueden optimizarse para obtener la sobreproducción de la enzima. Las **proteasas** se producen utilizando cepas súper productoras de **Bacillus**, **Aspergillus**, **Rhizopus** y **Mucor**; las **pectinasas** se producen por *Aspergillus niger*; las **lactasas** por levadura y *Aspergillus*; las **lipasas** se producen por ciertas cepas de *levaduras* y *hongos*; la *glucosa isomerasa* se produce por *Flavobacterium arborescens* o *Bacillus coagulans*. Después de la etapa de cultivo, las células se separan de los medios por lo general por filtración o algunas veces por centrifugación. Dependiendo de la naturaleza intracelular o extracelular de la enzima, las células o el caldo de fermentación se procesan adicionalmente para separar y purificar la enzima. La recuperación de enzimas intracelulares es más complicada e implica la ruptura de células y la eliminación de restos celulares y ácidos nucleicos (Shijie Liu, 2017)

Para la producción industrial de enzimas microbianas se han utilizado una gran variedad de diferentes microorganismos, que cubren, tanto la gama taxonómica de sistemas eucariotas, como levaduras y hongos, hasta los sistemas procariotas, tanto de las familias Gram negativas como Gram positivas. Cuando se consideran las enzimas bio farmacéuticas, entonces entran en juego también las líneas de células de mamíferos e insectos. Para la mayor parte de la historia de las aplicaciones de la enzima, la producción se llevó a cabo con las cepas conocidas por hacer la enzima de interés. Esto explica por qué se han empleado muchos tipos diferentes de microorganismos para producir enzimas. (Shijie Liu, 2017)

La proteasa alcalina se excreta de forma natural por *Bacillus licheniformis* para romper sustratos proteicos y por eso resultó ser una de las primeras enzimas producidas comercialmente, la *subtilisina Carlsberg*, para uso en detergentes. Las cepas se seleccionaron para que produjeran los niveles más altos de la *proteasa* y nació así una industria. Una historia similar se siguió para la producción de α -amilasa. Una vez más, el *Bacillus licheniformis*, excreta naturalmente una α -amilasa altamente termoestable, capaz de descomponer el almidón en oligosacáridos más fácilmente digeribles. Las cepas de *Bacillus* han sido uno de los caballos de batalla de la producción de enzimas durante décadas, basado principalmente en su capacidad para producir en exceso la *subtilisina* y la α -amilasa (Wolfgang Aehle, 2007).

5.1.3 Actividad Enzimática.

Una enzima se suele valorar por su función y actividad más que por su masa, ya que las unidades de enzima sirven como una cuantificación de la actividad enzimática. Para muchas enzimas, la actividad en condiciones específicas puede expresarse en *Unidades Internacionales (UI)*, que se define como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de un sustrato dado en un producto dado por minuto (Gold Biotechnology, 2015).

Para las enzimas que usan macromoléculas específicas como sustratos (como las enzimas amilasas proteolíticas), definir la masa molecular del sustrato puede ser complicado porque en realidad el sustrato cambia cada vez que la proteasa corta un enlace de la macromolécula. La actividad para estos tipos de enzimas generalmente se determina midiendo el cambio en la intensidad de color de la proteína que separa los productos y utilizando una curva estándar para estimar la concentración de estos productos.

En 1938, *M. L. Anson* usó hemoglobina desnaturalizada como sustrato para enzimas proteolíticas en un *Ensayo de Lowry* (Gold Biotechnology, 2015). Luego, la proteína no digerida se precipitó y la concentración de "*productos de división de proteínas*" se estimó colorimétricamente. A partir de ese trabajo, el término *Unidades Anson* se popularizó y una *Unidad mAnson* se definió como "*la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de aminoácidos solubles en MAB, Folin positivos en 1 minuto a pH 7,5 y 37 ° C, utilizando hemoglobina como sustrato*". En 1958, *Hagihara* decidió usar la caseína como sustrato en lugar de la hemoglobina (Gold Biotechnology, 2015) (Carrie Cupp-Enyard. 2008). El término *Unidades de Proteasa* se usa comúnmente y se puede definir de la misma manera que las *Unidades de mAnson*, excepto que se usa caseína como sustrato. A la hora de definir la actividad de las enzimas proteolíticas, las *Unidades mAnson*, que usan hemoglobina como sustrato, se consideran equivalentes a las **Unidades de Proteasa**, que usan caseína como sustrato (Gold Biotechnology, 2015).

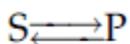
Existen diferentes ensayos instrumentales para la determinación de actividad enzimática entre ellos se encuentran los *Métodos Continuos* y los *Discontinuos*. Los *Métodos Continuos* son Colorimétrico, Fluorométrico, Calorimétrico, Químio-luminiscente, Dispersión de la luz, y la Termoforesis a Microescala. Dentro de los *Métodos Discontinuos* están la Radiometría y el Método Cromatográfico. De todos ellos, los Ensayos Espectrofotométricos son los más utilizados para

determinar la actividad enzimática. Este Método sigue el curso de la reacción midiendo el cambio en la cantidad de luz que absorbe la solución del ensayo. Si esta luz se encuentra en la región visible, se puede ver un cambio en el color del ensayo. No obstante, a menudo se usa la luz Ultra Violeta (UV) se usa a menudo, ya que las coenzimas comunes NADH y NADPH absorben la luz UV en sus formas reducidas, pero no en sus formas oxidadas.(Wikipedia, 2018b)

Incluso cuando la reacción de la enzima no produce un cambio en la absorbancia de la luz, todavía puede ser posible usar un ensayo espectrofotométrico para la determinación de la actividad enzimática utilizando un ensayo acoplado. Aquí, el producto de una reacción se usa como el sustrato de otra reacción, fácilmente detectable. Por ejemplo, el ensayo acoplado para la enzima hexocinasa, que puede analizarse acoplando su producción de glucosa-6-fosfato a la producción de NADPH, usando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Wikipedia, 2018b).

5.1.4 Cinética Enzimática Simple.

Un modelo matemático de la cinética de reacciones catalizadas por enzimas de sustrato único fue desarrollado por primera vez por *V.C.R. Henri* en 1902 y por *L. Michaelis* y *Maud L Menten* en 1913. La cinética de reacciones simples catalizadas por enzimas a menudo se conoce como ***cinética de Michaelis-Menten o cinética de saturación***. Estos modelos se basan en datos de reactores discontinuos con volumen de líquido constante en los que se conocen las concentraciones iniciales de sustrato, $[S]_0$ y enzima, $[E]_0$ y este modelo en particular se basa en una reacción uni molecular simple:



Esa reacción se puede utilizar como modelo, aunque no es exactamente unimolecular.

$$0 = r_1 = k_1[E][S] - k_{-1}[ES]$$

En realidad, el equilibrio que se produce es relativamente complejo, pero tanto *Henri* como *Michaelis-Menten* utilizaron esencialmente este enfoque, suponiendo que el primer paso es muy

$$r_P = k_c[ES] = \frac{k_c E[S]}{K_m + [S]} = \frac{r_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

rápido y se alcanza el equilibrio cuando se considera el segundo paso. Finalmente, después de varias transformaciones, se llega a la expresión conocida de la *Ecuación de Michaelis-Menten* (Shijie Liu, 2017):

En el gráfico siguiente (Figura 1) se observa la variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración del sustrato, según el Modelo de Michaelis.Menten, en el cual se definen las constantes cinéticas V_{max} y K_m (Wikipedia, 2018c).

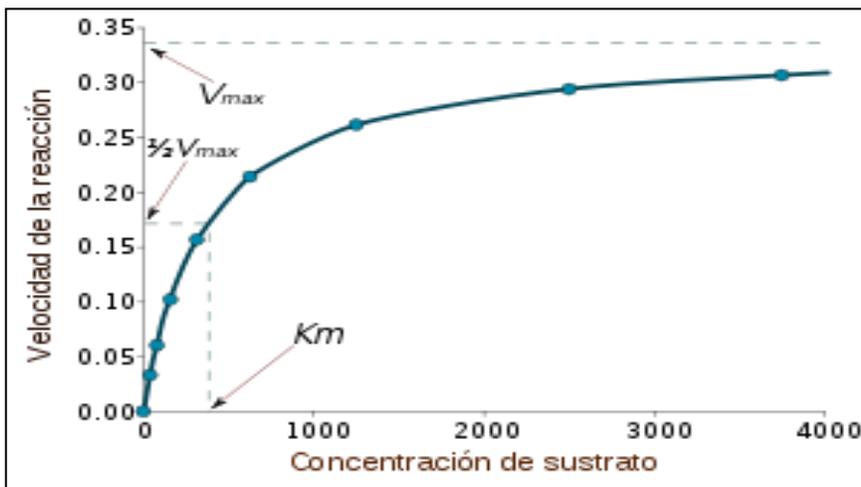


Figura 1. Velocidad de reacción inicial R_0 representada frente a la concentración de sustrato S para una reacción que obedece a la cinética de

En este caso, la velocidad de avance máxima de la reacción es V_{max} . El valor de r_{max} cambia si se agrega más enzima, pero la adición de más sustrato no tiene influencia sobre V_{max} . K_m a menudo se llama *la constante de Michaelis-Menten*. Un valor bajo de K_m sugiere que la enzima tiene una alta afinidad por el sustrato. Además, K_m corresponde a la concentración de sustrato a la que la velocidad

de reacción es la mitad de la velocidad de reacción máxima. Como se aprecia en la figura, el valor K_m para la reacción es la concentración de sustrato requerida para dar la mitad de la velocidad máxima. Típicamente, los valores para K_m están en el rango de 0.01e20 mM (10^5 e $0.02 \text{ kmol} / \text{m}^3$) (Sathyanarayana N. Gummadi, 2017).

Como ejemplos del comportamiento de una proteasa, en este caso la producida por el *B. licheniformis*, a continuación, se muestran los valores de la actividad enzimática de la proteasa, para diversas concentraciones de caseína, variando el pH (Tabla 1). Más abajo se muestran los parámetros cinéticos de esa misma proteasa alcalina, obtenidos a partir de los datos de la actividad en función del pH, con la aplicación del Método de Lineweaver Burke (Tabla 2) (Elizabeth Lira Silva & Ricardo Jasso Chávez, 2013).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* con la aplicación del Método de Lineweaver Burke (Elizabeth Lira Silva & Ricardo Jasso Chávez, 2013).

pH	V_{max}^* (IU/mL proteína)	K_m^* (mM)	V_{max}/K_m^* min^{-1}
5	1.6	17.3	0.1
6	3.3	18.9	0.2
7	2.4	7.7	0.3
8	5.2	16.3	0.3
9	9.0	12.0	0.8
10	11.9	9.4	1.3
11	6.4	13.6	0.5
12	2.7	11.7	0.2

maximiza la entrega de nutrientes a los tejidos musculares. Precisamente esa característica de los hidrolizados proteicos son las que han hecho surgir muchos productos comerciales de este tipo. También los hidrolizados se usan en la Industria Biotecnológica como un suplemento para cultivos celulares (Wikipedia, 2016).

Tabla 2. Actividad de la proteasa alcalina del *Bacillus licheniformis* a diferentes valores de pH (Elizabeth Lira Silva & Ricardo Jasso Chávez, 2013)

Caseína (mM)	pH	Actividad de la proteasa alcalina (IU/mL)							
		5	6	7	8	9	10	11	12
0		0	0	0	0	0	0	0	0
5		0.15	0.18	0.35	0.66	2.54	3.89	1.8	0.32
10		0.22	0.254	0.72	1.32	4.8	7.9	2.3	0.98
20		0.35	0.43	0.85	1.65	5.72	8.43	3.6	1.43
30		0.55	0.68	0.98	1.98	6.43	9.32	4.87	2.101
40		0.72	0.89	1.12	2.08	6.78	9.89	5.32	2.62
80		0.85	0.912	1.23	2.32	6.9	10.05	5.54	3.18

El método de fabricación de Hidrolizados de Proteínas predominante es por *enzimas*. Sin embargo, también están disponibles *Hidrolizados de Proteínas* producidos por *Hidrólisis Ácida* y por *Hidrólisis Alcalina* (Vijai K. Pasupuleti & Steven Braun, 2010):

- *Hidrólisis Ácida de Proteínas*: La mayoría de las proteínas hidrolizadas con ácido se usan como potenciadores del sabor y solo una pequeña porción de estos hidrolizados ácidos se utilizan en Biotecnología, para lo cual hay que eliminar total o completamente las sales que se forman durante ese tipo de Hidrólisis. Para llevar a cabo esta Hidrólisis se utilizan principalmente el ácido clorhídrico y el sulfúrico, siendo el más común el ácido clorhídrico. Con la *Hidrólisis Ácida*, se destruyen algunos de los aminoácidos esenciales, como el triptófano, la metionina, la cistina y la cisteína. Además, la glutamina y la asparagina se convierten en ácido glutámico y ácido aspártico. Típicamente, la *Hidrólisis Ácida* descompone las proteínas en aminoácidos individuales y

pequeñas cantidades de péptidos más pequeños. El proceso agrega cantidades significativas de sal, que es perjudicial para el crecimiento de microorganismos. Por lo cual, como se mencionó anteriormente, en muchas ocasiones es necesario filtrar total o parcialmente por nano-filtración precipitación o por resinas de intercambio iónico. Sin embargo, los *Hidrolizados Ácidos* son ampliamente utilizados en la industria alimentaria y de alimentos para mascotas, como potenciadores del sabor.

La *Hidrólisis Ácida* requiere emplear reactores de acero inoxidable revestidos de vidrio que puedan soportar altas presiones y temperaturas, lo que hace muy importante los procedimientos de seguridad en estos procesos. Los factores que definen esta hidrólisis son: Concentración y tipo de ácido; Temperatura (250-280 ° F); Presión (32-45 psi); Tiempo de Hidrólisis (2-8 h) y Concentración de Proteína (50 -sesenta y cinco%). Todos estos factores, de manera independiente y combinada, tienen un impacto en la calidad del producto. Hidrolizados ácidos de caseína y proteínas de soja están disponibles comercialmente, para su uso en fermentaciones y medios de diagnóstico.

- *Hidrólisis Alcalina de Proteínas*: No se han encontrado informes de aplicaciones comerciales de Hidrolizados de Proteínas Alcalinas en Biotecnología, pero si se usan a escala comercial en la industria alimentaria. Durante el proceso de hidrólisis, algunos aminoácidos como la serina y la treonina se destruyen, pero el triptófano está intacto.

La *Hidrólisis Alcalina* es un proceso bastante simple y directo. Primero, la proteína se solubiliza por calentamiento seguido de la adición de agentes alcalinos como hidróxido de calcio, sodio o potasio, controlando la temperatura en un punto de ajuste deseado (intervalo típico de 80-130 ° F). La Hidrólisis continuará durante varias horas hasta que alcance el grado deseado de Hidrólisis y luego el producto se *evapora, se pasteuriza y se seca por pulverización*.

- *Hidrólisis Enzimática de Proteínas*: La mayoría de las enzimas utilizadas para fabricar Hidrolizados de Proteínas se obtienen de fuentes animales, vegetales y microbianas. Los recientes avances en técnicas para la *Hidrólisis de Proteínas* provienen de estudios principalmente con enzimas proteolíticas de procesos de fermentación. Las principales ventajas de *Hidrólisis enzimática de proteínas* (Vijai K. Pasupuleti & Steven Braun, 2010), es que las condiciones de hidrólisis son “suaves” y las enzimas son más específicas, lo que permite a los fabricantes controlar con precisión el grado de hidrólisis y adaptar los productos para los usuarios finales.

5.3 Características de los *Bacillus* spp.

Bacillus spp es un género de bacterias en forma de bastón y *Gram positiva*. El género *Bacillus* pertenece a la *División Firmicutes*. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endospora de situación central, que no deforma la estructura de la célula a diferencia de las endoesporas clostridiales. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes. La mayoría de especies dan positivo a la prueba de la catalasa y son saprófitas. Viven en el suelo, agua del mar y ríos, aparte de alimentos que contaminan con su presencia. Aunque generalmente son móviles, con flagelos peritricos, algunas especies de interés sanitario, como *B. anthracis*, (causante del carbunco) son inmóviles. Hay especies productoras de antibióticos (Wikipedia, 2018a):

Su excelente susceptibilidad genética y tamaño relativamente grande, han proporcionado las poderosas herramientas necesarias para investigar a una bacteria desde todos los aspectos posibles. Las recientes mejoras en las técnicas de microscopía de fluorescencia han proporcionado una increíble visión de la estructura dinámica de un organismo unicelular. La investigación sobre *Bacillus subtilis* ha estado a la vanguardia de la Biología Molecular de Bacterias. El organismo es un modelo para la diferenciación, la regulación de genes /proteínas, y eventos del ciclo celular en las

bacterias. (Wikipedia, 2018a) (Michael T. Madigan, John M. Martinko, David A. Stahl, & David P. Clark, 2012). Como ejemplo, más abajo se muestra una tabla con las secuencias de reconocimiento de algunas enzimas de restricción (Tabla 4) (Michael T. Madigan et al., 2012). Fotografías de colonias de *Bacillus subtilis* y de cepas después de la tinción de Gram, se muestran en la Imagen 1 del Anexo 1.

La clasificación microbiana del *Bacillus subtilis* es: Dominio: **Bacteria**; Filo: **Firmicutes**; Clase: **Bacilli**; Orden: **Bacillales**; Familia: **Bacillaceae**; Género: **Bacillus**.

5.3.1 Enzimas proteolíticas secretadas por *Bacillus spp.*

Dentro de las enzimas secretadas están las proteasas, que no se producen exclusivamente por el *Bacillus subtilis*, hay otras especies que también la producen, aunque el más utilizado industrialmente es el *B. subtilis*. Entre los microorganismos productores de proteasas, además del *B. subtilis*, están las siguientes bacterias: *Nocardiosis sp.*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus pseudofirmus*, *Nesterenkonia halobia*, *Bacillus clausii*, *Vibrio metschnikovii*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus patagoniensis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus circulans*, *Xenorhabdus nematophil*, *Serratia marcescens* subsp. *Sakuensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus halodurans*. También están los hongos: *Aspergillus fumigatus*, *Engyodontium álbum*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus* (Kanupriya Miglani Sharma, Rajesh Kumar, Surbhi Panwar, & Ashwani Kumar, 2017).

Los *Bacillus spp* secretan una gran variedad de proteasas donde cada una tiene su función específica, en particular las proteasas extracelulares están involucradas en la degradación de sustratos poli-peptídicos a moléculas más pequeñas que puedan ser absorbidas por la célula.

Las enzimas exocelulares tienen una gran ventaja sobre las intracelulares como son la mayor estabilidad de la enzima a condiciones como temperatura, fuerza iónica y pH, debido a que son liberadas al medio en el ambiente de crecimiento del microorganismo, existe además la posibilidad de reciclaje del microorganismo, reduciendo costos y tiempos de producción, los métodos de separación del producto y purificación son más fáciles y económicos (Marcela Alejandra Ferrero, 1995).

Las proteasas son clasificadas por su mecanismo catalítico en cuatro grupos. Esta clasificación es determinada indirectamente por la reactividad a inhibidores que reaccionan con residuos particulares en la región del sitio activo. Los cuatro grupos son serina-proteasas, cisteína-proteasas, aspártico-proteasas y metano-proteasa. Las cepas de Bacilos excretan metalo y/o serina proteasas (Marcela Alejandra Ferrero, 1995).

Las metalo-proteasas son endo-enzimas que cortan preferentemente uniones con el grupo amino; requieren cinc para su actividad y calcio para su estabilidad; tienen un peso molecular de 30 a 40 Kilo Dalton y un pH óptimo de actividad cercano al neutro, debido a ello también se la denomina proteasa neutra. Son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA y por o-fenantrolina. Las serina-proteasas hidrolizan ésteres terminales simples, no tienen requerimientos de iones metálicos, exhiben un pH óptimo de actividad entre 9 y 11, poseen un peso molecular entre 20 y 30 kilo Dalton y poseen además actividad de esterasa (Alex Armando Sáez Vega, 2006).

5.3.2 Regulación de la síntesis de proteasa alcalina en bacilos.

La máxima síntesis de enzimas exo-celulares normalmente ocurre antes de la esporulación. La transición de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento está a menudo acompañada por la desaparición de la fuente de carbono del medio y los cambios en las condiciones de cultivo des-reprimen muchos genes sujetos a represión catabólica. Como consecuencia, es difícil decidir si

la aparición de una enzima es debido a una alteración del ambiente o a la expresión de genes específicos de esporulación (Alex Armando Sáez Vega, 2006).

Las proteasas de los diferentes microorganismos tienen diferentes propiedades y todas se han estudiado ampliamente. Para aplicaciones industriales, las proteasas deben poseer actividad y estabilidad en condiciones relativamente hostiles, que a menudo comprenden temperaturas extremas, pH y presencia de inhibidores y agentes oxidantes. Por lo tanto, las enzimas candidatas deben tener tanto la idoneidad del proceso, así como una estabilidad prolongada, si se destinan a aplicaciones industriales. El objetivo final de cualquier actividad de investigación sobre las enzimas es descubrir una enzima de naturaleza robusta y versátil en aplicaciones.

5.3.3 Método de producción.

El uso del cultivo sumergido es ventajoso debido a la facilidad de esterilización y el control del proceso es más fácil de diseñar en estos sistemas y por eso es el más utilizado, aunque para algunas enzimas es conveniente utilizar el Cultivo en Estado Sólido. En los cultivos sumergidos, la composición de los medios juega un papel importante en la producción de enzimas por microorganismos. Además de esto, diversos factores ambientales como la temperatura, el pH y el tiempo de incubación también influyen en gran medida en el metabolismo microbiano. Estos factores son importantes para promover, estimular, mejorar y optimizar la producción de proteasas. Para obtener rendimientos elevados y comercialmente viables de proteasa, es esencial optimizar los medios de fermentación para el crecimiento de los cultivos y la producción de proteasa. No se ha establecido ningún medio definido para la mejor producción de proteasas alcalinas a partir de diferentes fuentes microbianas. Cada organismo o cepa tiene sus propias condiciones especiales para la máxima producción de enzimas.

5.3.4 Fuente del medio de cultivo.

El carbono y el nitrógeno son los principales componentes de los medios que también actúan como estimulantes esenciales para el crecimiento de microorganismos y la producción de enzimas. Como ejemplo de su efecto, se encontró que la sacarosa al 5% (p / v) era óptima para la producción de enzimas por *Actinomycete Nocardiopsis prasina* HA4. La dextrosa y la sacarosa se encontraron como las dos mejores fuentes para la producción de biomasa y proteasa por *L. mylittae*, especialmente cuando estas dos se combinaron juntas en una proporción de 1: 1 en el medio. También se informó que la dextrosa es la fuente de carbono adecuada para la proteasa que produce la cepa de *Bacillus subtilis*. Entre las fuentes de carbono utilizadas para la producción de proteasas por *Pseudomonas fluorescens*, se encontró que el salvado de trigo y la maltosa respaldan la producción de proteasas. Se observó que la harina de trigo era más efectiva para la producción de proteasa por un *Bacillus sp.* (Kanupriya Miglani Sharma et al., 2017)

En resumen, el requerimiento de un suplemento de carbono y de nitrógeno específico difiere de organismo a organismo y diferentes investigadores han utilizado diferentes fuentes de nitrógeno orgánico (simple o complejo), fuentes de nitrógeno inorgánico y aminoácidos para mejorar la producción de proteasas, por lo cual no hay una guía definida.

5.3.5 Periodo de Incubación.

El período de incubación afecta significativamente la producción de enzimas y varía de 24 horas a una semana, dependiendo del tipo de microorganismo y otras condiciones de cultivo, como el tamaño del inóculo, el estado metabólico del pH celular y la temperatura. Por ejemplo, *Bacillus sp.* APP1 produjo el título máximo de proteasa después de un período de incubación de 2 días, aunque el mayor rendimiento de biomasa se registró después de 4 días de período de incubación. *B. subtilis* KO exhibió su producción máxima de proteasa dentro de un período de incubación de 48 h.

pH del medio. El pH del cultivo afecta todos los procesos enzimáticos y el transporte de diversos componentes a través de la membrana celular. Sin embargo, la base molecular de porqué el pH afecta el metabolismo bacteriano en el caldo de cultivo, en realidad está oscura. Se ha informado un medio con pH inicial neutro para la producción de proteasa alcalina por *P. chrysogenum IHH5*, *S. roseiscleroticus*, *B. cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus aquimaris VITP4* y *P. aeruginosa MCM B-327*. Mientras que el medio ligeramente ácido (pH 6.3-6.5) ha sido reportado como óptimo para la producción de proteasa por *Bacillus sp* y para el *B. cereus SIU1*, mientras que un medio ligeramente alcalino (pH 8,0-8,5) resulta óptimo para la producción de proteasas por *B. licheniformis IKBC-17*, *B. subtilis IKBS 10*, *Bacillus macerans IKBM-11*, *Bacillus amovivorus* y *Aspergillus niger*. La razón detrás de este tipo de observación aún no está muy clara (Kanupriya Miglani Sharma et al., 2017). Como se aprecia, también hay bastantes variaciones de una cepa a otra.

5.3.6 Temperatura de incubación.

La temperatura es un parámetro crítico que debe controlarse y variarse de un organismo a otro para lograr el máximo crecimiento celular y la producción de enzimas. El requerimiento de temperatura óptimo reportado para la producción de proteasa alcalina por diferentes microorganismos difiere ampliamente. Una temperatura de 37 ° C se ha reportado como óptima para la producción de proteasas por un número de especies de *Bacillus* tales como *B. amovivorus*, *B. proteolyticus* CFR3001, *B. aquimaris VITP4* y *B. subtilis* cepa Rand. En contraste con eso, se ha informado que una temperatura de 40 ° C es mejor para la producción de proteasa por *Bacillus sp.* 2-5, *B. licheniformis GUS1*, *V. pantothenicus* y *S. roseiscleroticus*. La producción máxima de proteasa por *A. niger* se obtuvo a 45 ° C. Una temperatura óptima más alta, 50° C, se ha reportado para *Bacillus sp.* cepa APP1 y *B. subtilis BS1*. *B. licheniformis IKBC-17*, *B. subtilis IKBS-10*. La temperatura óptima de producción de proteasa alcalina por *B. cereus* y *B. polymyxa* también se ha

reportado en 60°C. La producción de proteasa utilizando el método estadístico se estudió utilizando la cepa *B. subtilis* K-1. La actividad de proteasa más alta se detectó a 60°C (312,6 U / ml); sin embargo, se observó una actividad sustancial a 70 ° C (306.2 U / ml) y 80 ° C (301.6 U / ml) (Kanupriya Miglani Sharma et al., 2017).

5.3.7 Especificidad por el sustrato.

Una de las características de las enzimas es su especificidad por el sustrato. Por ejemplo, se encontró que el citocromo C era el mejor sustrato específico para la enzima proteasa secretada por *Bacillus megaterium*, seguido del aislado de proteína de soja, la caseína. Para la proteasa producida por una cepa termófila de *B. subtilis* DM-04, la caseína sirvió como el sustrato más preferido, seguido por la gelatina, mientras que la globulina sérica bovina y el fibrinógeno fueron los menos hidrolizados por esta enzima [83]. La proteasa alcalina producida por *Bacillus brevis* SSA1 se encontró activa en una amplia gama de sustratos como caseína, BSA, gelatina y hemoglobina. La actividad enzimática de la proteasa producida por *A. flavus* AP2 fue la más alta con gelatina. La proteasa alcalina de *Beauveria* sp. (BAP) fue más activa contra la caseína en comparación con la hemoglobina y la albúmina sérica bovina (Kanupriya Miglani Sharma et al., 2017).

5.3.8 Efectos de iones metálicos y estabilizadores y aditivos.

Se ha informado que diversos iones metálicos y reactivos influyen en la actividad de las proteasas. Los iones de calcio se conocen como inductores y estabilizadores de muchas enzimas y los protegen de los cambios conformacionales. Los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} regulan positivamente la actividad enzimática de la proteasa alcalina de *B. circulans*, mientras que Mn^{+2} aumenta en cinco veces actividad enzimática activada de la proteasa de *Pseudomonas thermaerum* GW1 y Cu^{+2} , Mg^{+2} y Ca^{+2} , aumentan la actividad enzimática de la proteasa de *B. licheniformis* MP1 en aproximadamente 13% y 15%, respectivamente. Cu^{+2} , no tuvo efecto estimulante sobre la actividad

de la proteasa producida por actinomicetos, *Nocardioopsis prasina* a diferencia del caso de varias proteasas bacterianas. La adición de CaCl_2 5 mM potenció la actividad del 105,3% de la enzima proteasa alcalina producida por *A. niger*. También se obtuvo la activación de la proteasa de *A. niger* AB100 por iones metálicos como Ca^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} y Mg^{+2} . El isopropanol, el metanol y el benceno aumentaron la actividad de la proteasa de *Pseudomonas thermaerum* GW1. También la PseA proteasa de *P. aeruginosa* cruda mostró una notable estabilidad en presencia de la mayoría de los solventes, teniendo el logaritmo del coeficiente de partición ($\log P$) por encima de 2,0, pero fue menos estable en presencia de solventes hidrófilos. La proteasa de *B. subtilis* cepa Rand no solo era estable en presencia de disolventes orgánicos, sino que también exhibía una actividad mayor que en ausencia de disolvente orgánico (Kanupriya Miglani Sharma et al., 2017).

5.4 Elementos de Cinética Microbiana.

5.4.1 Análisis del Crecimiento Microbiano.

Cuando un medio nutriente líquido se inocula con un cultivo de siembra (inóculos), los organismos absorben selectivamente los nutrientes disueltos del medio y los convierten en biomasa. Una curva de crecimiento de lote (discontinua) típica incluye las siguientes fases: (1) fase de retardo, (2) fase de crecimiento exponencial o logarítmica, (3) fase de desaceleración, (4) fase estacionaria y (5) fase de muerte. Más abajo se muestra un ciclo de crecimiento de células de mamíferos por lotes que también es típico para células microbianas (Figura 2).

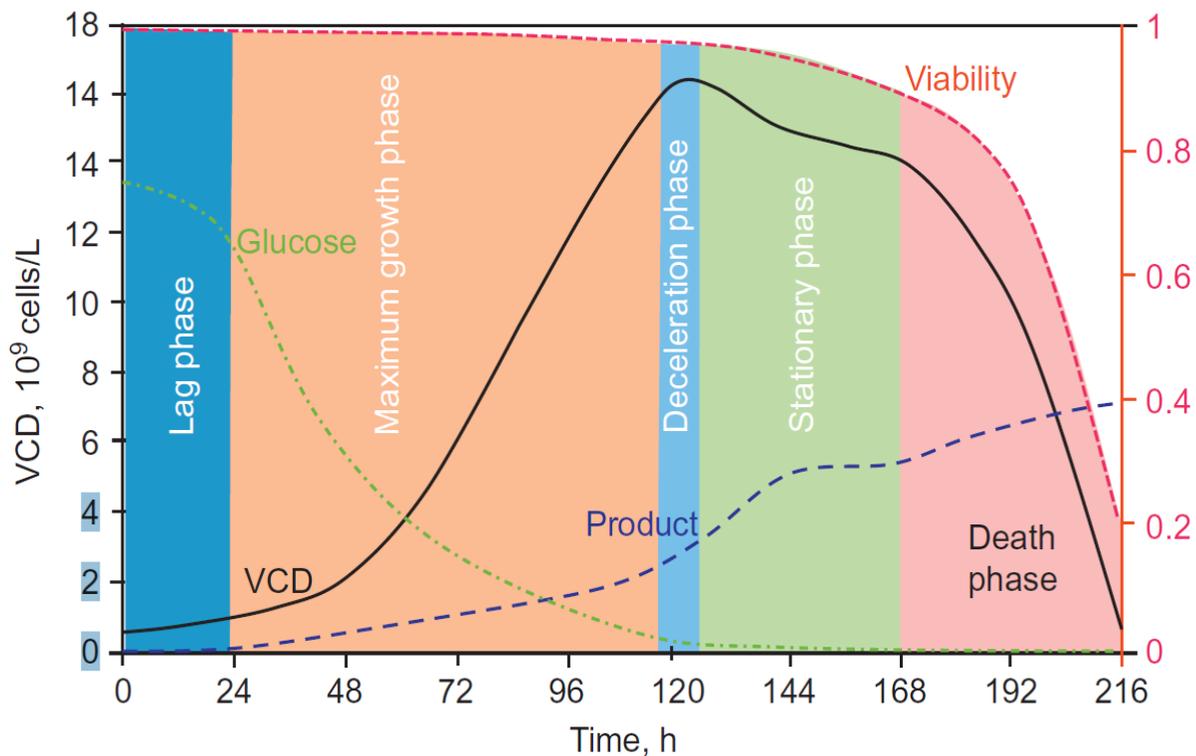


Figura 2. Trayectoria de crecimiento celular en cultivo estacionario. (Tomado del Brock 2012).

Si bien se muestran varios parámetros, el *recuento de células (VCD)* o la *biomasa celular* son los que principalmente se tienen en cuenta para la clasificación del régimen de crecimiento. La *fase de retraso* ocurre inmediatamente después de la inoculación y es un período de adaptación de las células a un nuevo entorno. Los microorganismos reorganizan sus constituyentes moleculares cuando se

transfieren a un nuevo medio. Dependiendo de la composición de los nutrientes, se sintetizan nuevas enzimas, se reprime la síntesis de algunas otras enzimas y la maquinaria interna de las células se adapta a las nuevas condiciones ambientales. Durante esta fase, la masa celular puede aumentar un poco, sin un aumento en la densidad del número de células. Cuando el inóculo es pequeño y tiene una fracción baja de células que son viables, puede haber una fase de pseudoretraso, que es el resultado no de una adaptación, sino de un inóculo muy pequeño o en mal estado. La baja concentración de algunos nutrientes y factores de crecimiento también puede causar una larga fase de retraso (Shijie Liu, 2017).

En las fases de crecimiento se habla de la “exponencial o logarítmica” y para apreciarla adecuadamente, debe graficarse el logaritmo de la concentración, en lugar de la concentración en sí misma. Para analizar la diferencia entre el comportamiento de la concentración de células y el logaritmo de la concentración, a continuación se muestra un nuevo gráfico, al cual se le añade también la derivada del logaritmo de la concentración y de esa forma se tiene el cuadro total de todo el proceso (Figura 3) (James M. Lee, 2009).

5.4.2 Cinética de Monod y Haldane.

Se ha podido comprobar que el crecimiento de células de mamífero y de microorganismos, así como muchos procesos metabólicos en general, siguen un comportamiento al cual, en la mayoría de los casos, se le puede aplicar el mismo enfoque que la Cinética de **Michaelis-Menten** y aplicar una ecuación simplificada que toma la forma que se muestra más abajo y se conoce como *Ecuación de Monod* (Shijie Liu, 2017).

Ecuación de Monod



$$\mu_G = \frac{r_X}{X} = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}$$

Esta ecuación es una función de velocidad empírica, y se ha visto su relevancia en la cinética del crecimiento celular desde un punto de vista del comportamiento cinético aproximado. Sin embargo, en algunos casos la ecuación no ajusta bien con los resultados experimentales y para resolver ese problema se han propuesto varios modelos alternativos, de los cuales, el más utilizado es el de *Haldane*, que considera la inhibición por sustrato, que es la que se ha comprobado que existe en el cultivo de interés (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009) (M. L E. Halmi, M. S. Shukor, W. L. W. Johari, & M.Y. Shukor, 2014) y por lo tanto será el que se utilice en esta Tesis.

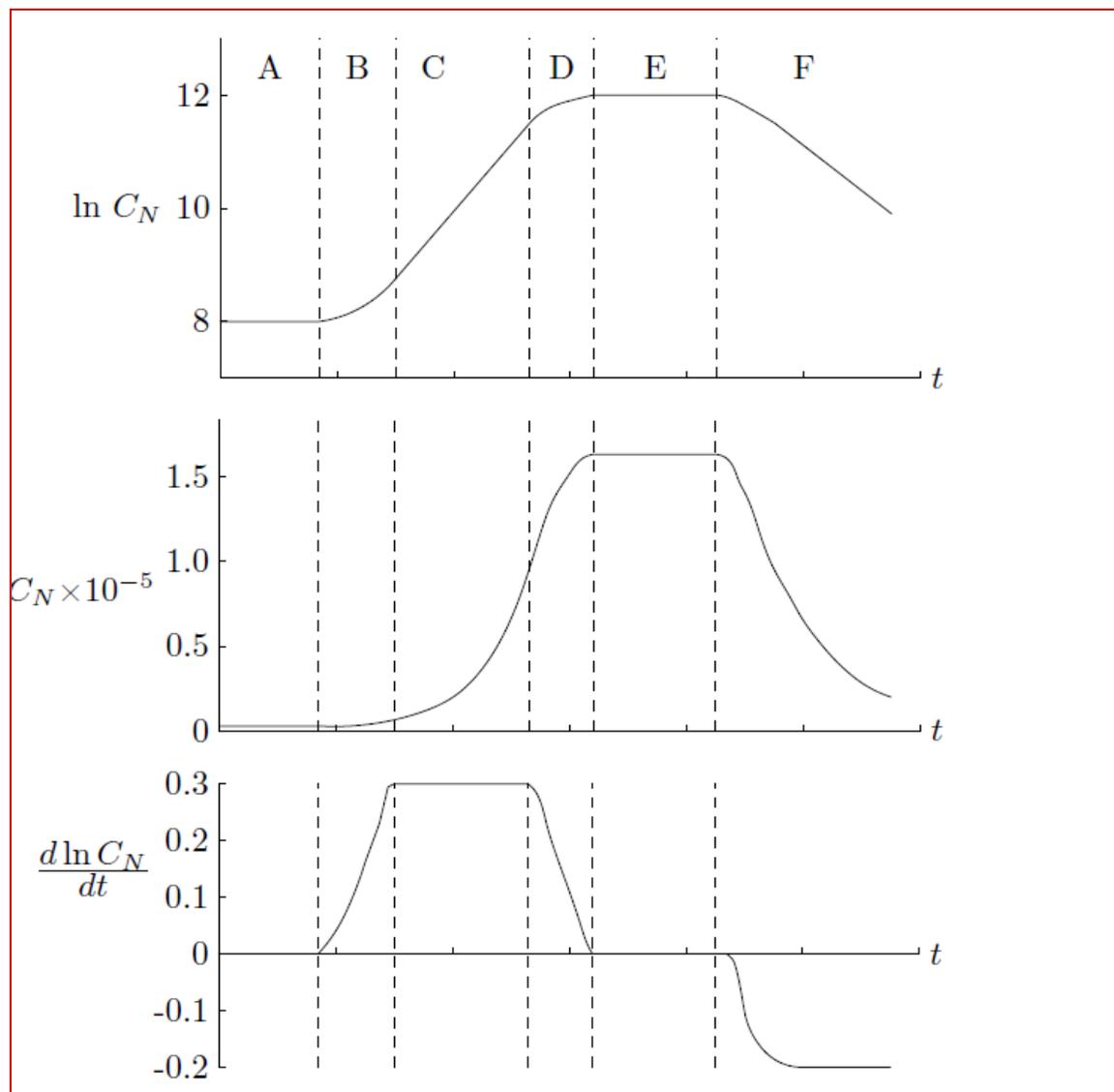
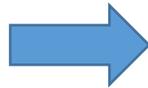


Figura 3. Fases de Crecimiento de los microorganismos: (A) Fase lag; (B) Crecimiento acelerado; (C) crecimiento exponencial; (D) crecimiento desacelerado; (E) Fase estacionaria; (F) Fase de Muerte. (tomado de Shiiie Liu. 2017)

Ecuación de Haldane



$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_m + S + K_1 S^2}$$

Para tener una idea de la diferencia que tiene en el Crecimiento Microbiano utilizar uno u otro modelo, a continuación se muestra un ejemplo típico de la corrida de un microorganismo, con los dos modelos, Monod y Haldane (Figura 4) (Víctor Manuel Trejos, Javier Fontalvo Alzate, & Miguel Ángel Gómez García, 2009).

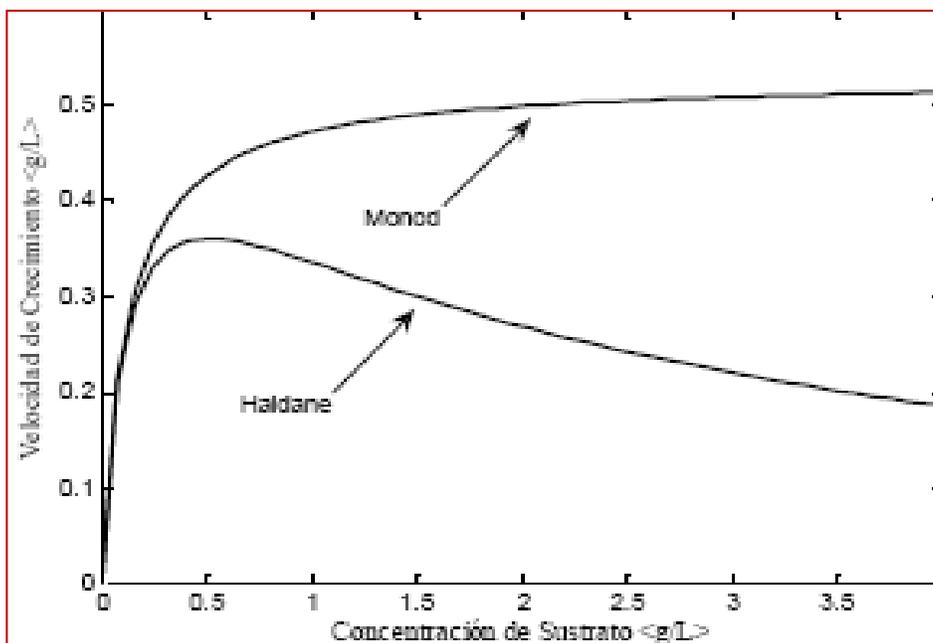


Figura 4. Crecimiento obtenido. Según la Ecuación de **Monod** (curva superior); según la de **Haldane** (curva inferior). Tomado de (Víctor Manuel Trejos, Javier Fontalvo Alzate, & Miguel Ángel Gómez García, 2009).

Del mismo modo, para la formación de productos extracelulares, se utilizará el **Modelo de Luedeking-Piret**, ya que este es válido, tanto para los productos asociados al crecimiento, como a los que no lo son.

Ecuación de Luedeking-Piret



$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dN}{dt} + \beta N$$

5.5 Identificación Bacteriana

La identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales y por métodos genotípicos. Los métodos convencionales están basados en las características fenotípicas y los métodos genotípicos suelen reservarse para las bacterias que no se pueden identificar con métodos convencionales.

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas.

El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación.

En el proceso de identificación bacteriana convencional, la experiencia del microbiólogo es fundamental para la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial, en función de la fiabilidad de las mismas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar, del origen del aislado bacteriano, así como del coste de las mismas. Los laboratorios deben elaborar y realizar un proceso de identificación normalizado, de forma secuencial o simultánea el conjunto de pruebas cuyo propósito final sea la identificación del microorganismo a nivel de género y especie.

La bioquímica del *Bacillus subtilis*, de acuerdo con el *Bergley's* (D. H. Bergley & John G. Holt, 2000) y confirmada por Cuervo (Jeanny Paola Cuervo Lozada, 2010), se muestra más abajo (Tabla 3).

Tabla 3.. Bioquímica correspondiente a *Bacillus Subtilis*, según Jenny Paola Cuervo Lozada, 2010.

Prueba	Reacción
Reacción a tinción de Gram	+
Crecimiento anaeróbico	-
Posición de la espora	Central
Oxidasa	-
Catalasa	+
Fermentación de la Glucosa	+
L-arabinosa	+
D-xilosa	+
D-Manitol	-
Hidrólisis del almidón	+
Hidrólisis de la caseína	+
Hidrólisis de la Urea	-
Movilidad	+
Utilización del Citrato	+
Reducción de Nitrato	+
Crecimiento en NaCl al 7%	+
Crecimiento a pH 5.7	-
Hidrólisis de la Gelatina	+
Voges- Proskauer	+

En el proceso de identificación bacteriana por técnicas genotípicas se debe tener en cuenta la especificidad de la técnica, para la identificación de cada bacteria debe tomarse en cuenta lo descrito por Bou en 2010 donde él explica que, los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos de las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos. En la taxónoma bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador *housekeeping* está presente en todas las bacterias. Se presenta

como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución. Además, tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis.

El ARNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas. Así pues, la identificación mediante el ARNr 16S se fundamenta en su secuencia. Pero en ocasiones el ARNr 16S presenta una baja capacidad de discriminación para algunos géneros y especies debido a una reciente divergencia, y es necesario complementar la identificación con el estudio de otros genes o con pruebas fenotípicas. Así sucede con diferentes especies de los géneros *Bacillus* (*B. cereus* y *B. thuringiensis*; *B. globisporus* y *B. psychrophilus*). Es necesario recordar que muchas especies o subespecies que no pueden identificarse mediante el ARNr 16S, lo son mediante el análisis del *rpoB* (Germán Bou, Ana Fernández-Olmos, Celia García, Juan Antonio Sáez-Nieto, & Sylvia Valdezate, 2011).

La identificación bacteriana proporcionada por el análisis del ARNr 16S es más certera, sólida y reproducible que los análisis fenotípicos, resolviendo aproximadamente el 90% de las identificaciones. Sin embargo, no constituye una herramienta infalible. La elaboración de recomendaciones en su análisis según los géneros y especies a identificar, las bases de datos con mayor calidad de las secuencias depositadas, la aplicación complementaria o en sustitución de otros genes housekeeping como dianas, proporcionar en un futuro inmediato plataforma más eficiente en la identificación molecular bacteriana. Por lo anterior hay pautas a seguir para utilizar y el posterior análisis de la identificación mediante ARNr 16S ver tabla 4. (Germán Bou et al., 2011).

Tabla 4. Recomendaciones para la utilización del análisis del ARNr 16S y del gen *rpoB* (Germán Bou et al., 2011).

Categoría	Recomendaciones
Cepas por secuenciar	Cepas con escasa descripción Cepas con baja frecuencia de aislamiento Cepas con fenotipos atípicos Cepas de difícil identificación fenotípica Cepas de crecimiento lento o fastidioso Nuevos patógenos Bacterias de difícil cultivo
Análisis del ARNr 16S	Mínimo: > 98,5% similitud Ideal: 1.300 a 1.500 pb secuenciadas < 1% posiciones ambiguas
Criterio para la identificación de especie	Mínimo: > 98,5% similitud Ideal: > 99% similitud Comparación con la secuencia tipo o cepa de referencia que posee estudios de homología de ADN. Para diferencias < 0,5% a la especie más cercana, considerar otras propiedades (fenotipo)
Criterio para la identificación de género	Rango de similitud 95-100%
Criterio para la asignación de familia	Similitud < 95%
Análisis retrospectivo de la identificación fenotípica	Morfología de la colonia Tinción Gram Catalasa/oxidasa Perfil bioquímico Requerimientos nutricionales
Análisis del <i>rpoB</i>	Fragmento hipervariable 2.300-3.300 pb
Criterio para la identificación de especie	Según tamaño del fragmento secuenciado 300-600 pb: una similitud \geq 94% 600-825 pb: una similitud \geq 96%
Criterio la identificación de género	Distinto género: una similitud < 85,5%
Criterio de identificación de nueva especie/subespecie bacteriana	Nueva especie: una similitud > 97,7% Nueva subespecies: una similitud 98,2%

5.6 Escalado de procesos Biotecnológicos

5.6.1 Etapas a considerar en los trabajos de Investigación y Desarrollo (I+D).

El proceso de Investigación y Desarrollo puede considerarse dividido en 5 *Etapas, Niveles* o *Escalas* (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b): 1. **Laboratorio**; 2. **Banco**; 3. **Piloto**; 4. **Demostrativa** o **Semi-industrial**; 5. **Industrial**. La división de la Investigación y Desarrollo en esas cinco Etapas es convencional y por lo tanto, no son muy precisos los límites entre una escala y otra, ni tienen que considerarse necesariamente todas las escalas (Jim Lane, 2014) (Wikipedia, 2017).

Por ejemplo, en algunas ocasiones se omite la *Escala Demostrativa*, aunque esa *Escala* se utiliza mucho en los casos de procesos muy novedosos y ya prácticamente se considera como una *Etapas de Escalado* fija. En otras ocasiones se pueden unificar las escalas de *Laboratorio* y *Banco* (Jeff Lievense, May 10th 2016) (Jeff Lievense, 2014) (Nurul Sa'aadah Sulaiman, 2015).

5.6.2 Criterios a considerar para los límites entre escalas.

En ocasiones se ha planteado definir el límite entre Escalas por el volumen del Biorreactor, pero ese criterio no se considera adecuado y en su lugar se definen los objetivos que se deben cumplir en cada Etapa y el cumplimiento de dichos objetivos es el que fija el paso de una Escala a otra (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b).

1. *Escala de Laboratorio*:

El **Laboratorio** constituye la unidad primaria de investigación en la que quedan determinadas las metodologías de síntesis o procesamiento y se establecen las condiciones bajo las cuales se obtienen los mejores resultados. El **Laboratorio** confirma o rechaza las hipótesis obtenidas del conocimiento previo y de la literatura y se obtienen datos que contribuyen a enriquecer la información

sistematizada, que constituye la base para el trabajo a escalas de **Banco** y **Piloto**. En esta etapa se enfatiza en todos los mecanismos que son independientes del tamaño, como los aspectos de Termodinámica y de Cinética. Además se obtiene información para la realización de evaluaciones económicas preliminares y se determinan diversas propiedades físico-químicas, necesarias para los cálculos ingenieriles y la formulación y comprobación de modelos matemáticos (Carlo Pirola, 2016).

En esta etapa, para los procesos Biotecnológicos, se consideran los siguientes objetivos:

- Seleccionar y evaluar las cepas.
- Optimizar el medio y otras variables experimentales y de proceso.
- Obtener información en cortos plazos de tiempo a muy bajo costo.

Por su importancia, esta Etapa nunca se pasa por alto. Cuando, en apariencia, se comienza directamente en la **Escala de Banco** (Figura 5) es porque ya está disponible la información que normalmente se obtiene en la Escala de Laboratorio. Como ejemplo está el desarrollo de la producción por fermentación del 1,4-Butanodiol, que fue el primer producto producido a granel por la industria petroquímica, que se obtuvo industrialmente por vía fermentativa.

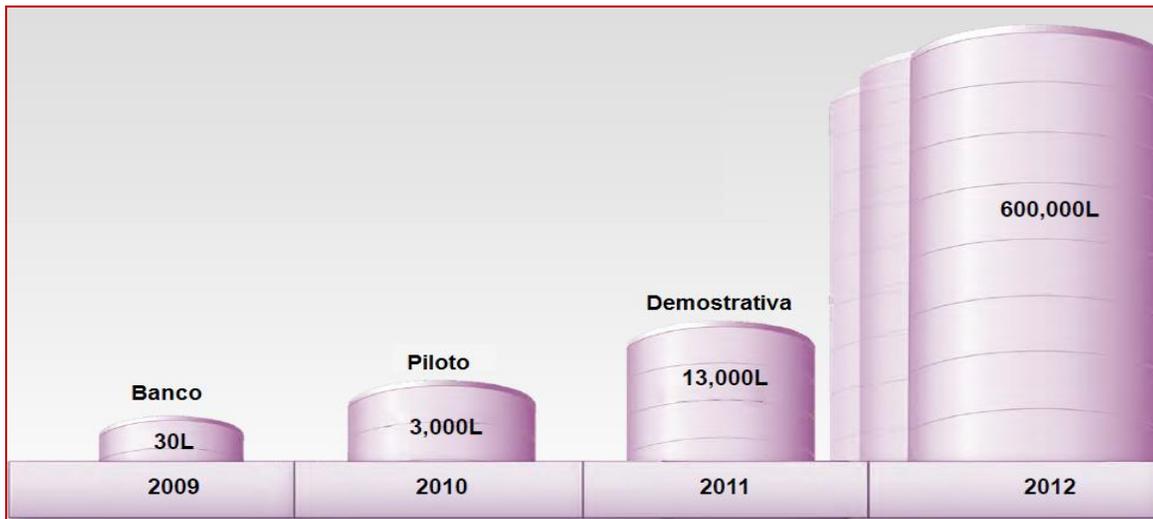


Figura 5. Proceso de do del 1,4-Butanodiol, aparentemente sin Etapa de Laboratorio (Tomado de [Jason S. Crater & Jefferson C. Lievens, 2018]).

En ese caso, los datos del *1,4-Butanodiol* para la **Escala de Laboratorio** ya se conocían (Jason S. Crater & Jefferson C. Lievense, 2018).

2. Escala de Banco:

En esta etapa, la investigación comienza a adquirir un carácter tecnológico y posee sus particularidades que la distingue. La principal es que ya las unidades experimentales se conciben con características geométricas y operacionales similares a los equipos de **Planta Piloto** o **Industrial**, disponibles o recomendables. Con respecto al tamaño, la recomendación es que sea de 10 a 200 veces más grande que el tamaño de los equipos de Laboratorio (Wikipedia, 2017), aunque ese valor puede variar mucho, en dependencia de los procesos que se estén escalando (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b).

Sus principales características son:

- Conlleva un mayor nivel de instrumentación y automatización.
- El trabajo experimental se orienta hacia el completamiento y precisión de la información de laboratorio.

Los objetivos principales de esta etapa son:

- Revelar la esencia de los fenómenos que ocurren en los procesos.
- Revelar los pasos controlantes o críticos en las operaciones.
- Verificar hipótesis de modelos matemáticos.
- Aportar información para cálculos y diseños de ingeniería.

En el caso de los Procesos Biotecnológicos se consideran también los siguientes objetivos:

- Selección del procedimiento de desarrollo de inóculos, esterilización del medio, aireación, agitación y operaciones de purificación.

- Ajuste de variables como razón de transferencia de oxígeno, evolución de dióxido de carbono, producción de biomasa, biosíntesis de metabolitos y efectos del pH.
- Estudio del régimen de alimentación continua o incrementada.
- Selección de alternativas de control e instrumentación.
- Evaluación económica preliminar y estimado de viabilidad del proceso

Esta etapa permite un enfoque científico a relativo bajo costo que de todas formas representa un gasto de recursos y tiempo adicional al **Laboratorio** y por eso, en ocasiones se tiende eliminar. No obstante, es muy peligroso eliminar esta Etapa, debido a que facilita información que resulta decisiva para el funcionamiento de las Plantas Piloto, que no se obtiene directamente de la Escala de Laboratorio.

No obstante, hay ocasiones en que, si se complementan sus resultados con trabajos de *Modelación Matemática y Simulación de los Procesos*, es posible que el trabajo de la **Escala de Banco** pudiera eliminar la necesidad de la **Escala Piloto**. Pero, como siempre ocurre en los procesos de *Escalado*, hay que ser muy cuidadoso con las decisiones adoptadas (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b).

3. *Escala Piloto:*

Los estudios de Escala Piloto resultan de especial importancia para el proceso completo de Escalado [22], pero poseen un alto costo y la decisión de su realización debe estar subordinada a un conjunto de factores entre los cuales se destacan el Tipo de proceso, Nivel de información disponible y Tamaño propuesto para la unidad industrial.

La Planta Piloto debe montarse y operarse de manera que permita satisfacer al menos uno de los siguientes objetivos principales:

- Evaluar la factibilidad de un proceso tecnológico.

- Obtener la información para el diseño de una planta comercial.
- Obtener cantidades de productos con fines de ensayo o promoción.

En el caso de los Procesos Biotecnológicos, se tienen los siguientes objetivos específicos (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b):

- Confirmar los datos obtenidos a nivel de banco y verificar los criterios de escalado.
- Seleccionar las estrategias de esterilización del medio y de concentración y purificación de productos.
- Obtener cantidades de productos para prueba de caracterización, toxicológica, promoción de mercado y verificación de la viabilidad del proceso.
- Ofrecer una información de validación a un costo relativamente alto.

4. *Escala Demostrativa o Semi Industrial*

El objetivo principal de esta etapa, como su nombre lo indica, es demostrar la estabilidad operativa de los procedimientos de fabricación desarrollados, para asegurar que funcionen durante períodos prolongados, a las velocidades de alimentación previstas para la producción comercial (Jim Lane, 2014). Esta es una etapa cara del proceso de *Escalado* que puede prolongar bastante la introducción de una nueva tecnología en el mercado y sólo se realiza para aquellas tecnologías de una gran complejidad y que representan un salto apreciable en el nivel de desarrollo existente .

Estas plantas se construyen de igual forma que una planta de Escala Comercial, pero a una capacidad de producción menor, usualmente un décimo de la proyectada para la escala definitiva, de manera que permita el acopio de experiencias durante su funcionamiento y sirve de modelo a las futuras plantas industriales que se construyan. En general, las diferencias entre las *Escalas de Banco*, *Piloto* y *Demostrativa* están fuertemente influenciadas por la industria y la aplicación (Francis X.

McConville, 2006). Algunas industrias usan los tres términos de manera indistinta, pero en todos los casos se emplean al menos dos de esas etapas.

En ocasiones, la *Etapa Demostrativa* pudiera omitirse, lo que representaría una considerable reducción en el periodo (y costo) de desarrollo de una tecnología. Sin embargo, esa decisión debe ser bien sopesada y en especial debe tenerse en cuenta la primera de las recomendaciones para evitar fracasos en el Escalado, realizada por *Jim Lane*, en el *7º Congreso Mundial BIO sobre Biotecnología Industrial*: “*Sin omitir ni escatimar pasos: Piloto, Demostrativa y Comercial.*”(Jim Lane, 2014).

5. *Escala Industrial o Comercial*

Normalmente esta *Escala* no se considera una parte del proceso de investigación y desarrollo, lo que constituye un error conceptual con fuertes implicaciones de índole práctica. Realmente la Industria constituye, no sólo una prueba de validación de las experiencias precedentes, sino que enriquece la información ingenieril disponible y los modelos matemáticos formulados y brinda información de gran valor para el perfeccionamiento de equipos, para la optimización del propio proceso productivo y para el futuro diseño de otros productos.

Además, en la mayoría de los casos, las instalaciones a *Escala de Banco y Piloto* se diseñan a partir de un “*scale-down*” de una instalación industrial existente, o supuesta sobre la base de la experiencia acumulada con la operación de otras industrias. Aquí es válido el consejo dado por Lievense: “*Comienza con el final en la mente* (Jeff Lievense, May 10th2016). Por todo lo anterior, la *Escala Industrial* debe ser considerada una etapa muy importante en el conjunto de las tareas de *I+D*. A continuación, a manera de resumen, se muestra una representación esquemática de un proceso total de Escalado, en el que se han considerado todas las etapas (Figura 6), tomado del Curso

“Scale-Up of Chemical Engineering Process”, de la Universidad Pahang, en Malasia (Nurul Sa’aadah Sulaiman, 2015).

5.1 Posibilidades existentes para el Escalado de Biorreactores.

Para el Escalado de Biorreactores existen dos enfoques diferentes, como se muestra más abajo (Figura 7) (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b).

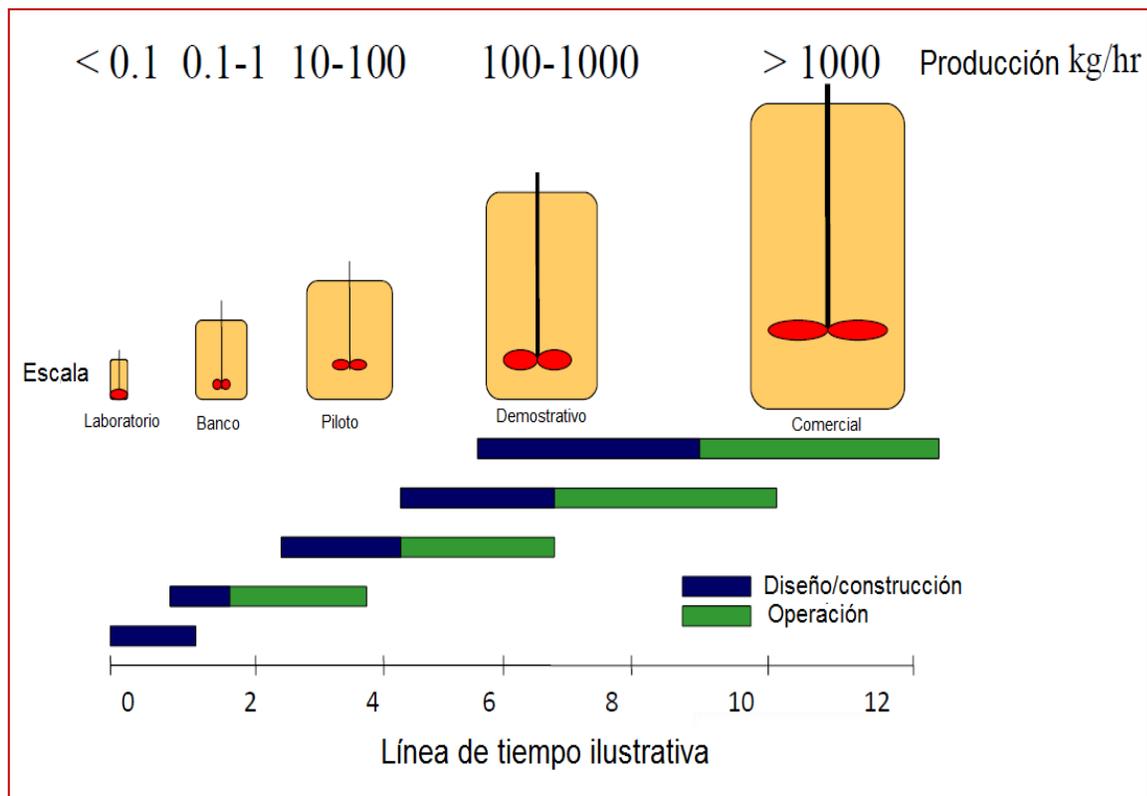


Figura 6. Ejemplo general de Escalado. Tomado de (V́ctor Manuel Trejos, Javier Fontalvo Alzate, & Miguel ́ngel G3mez Garc’a, 2009).

1. Diseo de un Biorreactor o de una planta de producci3n nueva (Figura 7, izquierda), en la cuales se asume que el diseador tiene la flexibilidad de seleccionar o desarrollar un nuevo sistema (Bioproceso) que cumpla con los requerimientos del Biorreactor.

2. Diseño de un nuevo Bioproceso que sea compatible con las condiciones de un Biorreactor industrial ya existente (Figura 7, derecha). Este tipo de problemas resulta muy común en la práctica industrial, particularmente cuando se deben producir muchos productos diferentes y a veces no relacionados entre sí, en una instalación limitada.

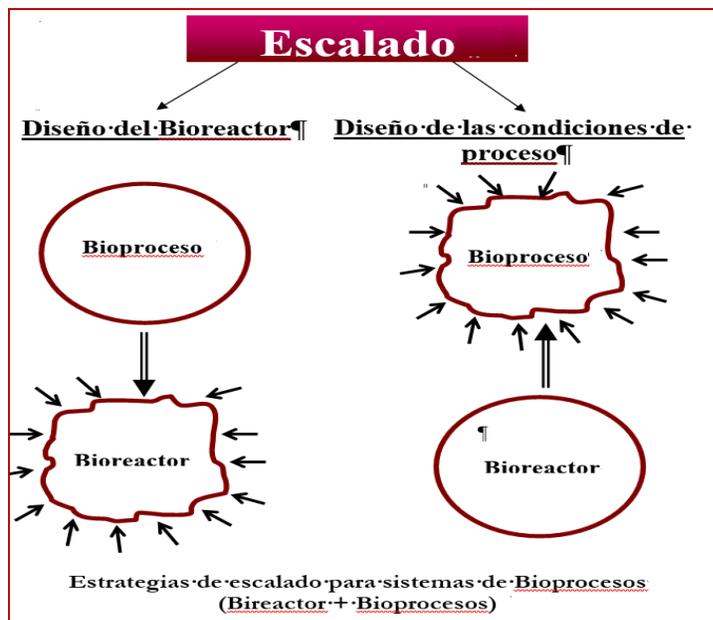


Figura 7. . Estrategias de Escalado para el sistema Biorreactor + Bioproceso. Tomado de Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b.

5.7 Uso de los Softwares para la Modelación Matemática de Biorreactores

Para estudiar el comportamiento de las biorreacciones mediante la Modelación Matemática y la Simulación se pueden emplear varios softwares, de los cuales los más utilizados, para las primeras etapas (*Banco y Piloto*) han sido *Simulink* (Toolbox de *MATLAB*) (M. L E. Halmi et al., 2014); *STELLA* (Angela B. Shiflet & George W. Shiflet, 2006, p. 1) (Isee System Inc., 2016, p. 10) y *Berkeley Madonna* (Robert Macey, George Oster, & Tim Zahnley, 2009, p. 2) (Diane Hoffoss, 2013). Tomando como base una comparación reciente (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018a), se ha decidido utilizar el *STELLA* para la etapa inicial de la Modelación y terminar el proceso con

Berkeley Madonna, teniendo en cuenta la existencia de experiencias prácticas positivas con el uso combinado de ambos softwares, en trabajos de investigación biotecnológica (Dirk Nehring, Roberto González, Ralf Protner, & Peter Czermak, 2004) (Dirk Nehring, Roberto A. Gonzalez-Castellanos, Peter Czermak, & Ralf Portner, 2006). A continuación, se muestra un ejemplo de un modelo icónico de un cultivo discontinuo obtenido con **STELLA** (Figura 8, izquierda), así como el resultado de un ajuste de curva con Berkeley Madonna (Figura 8, derecha) (Roberto A. Gonzalez, Mehrdad Ebrahimi, & Peter Czermak, 2009)

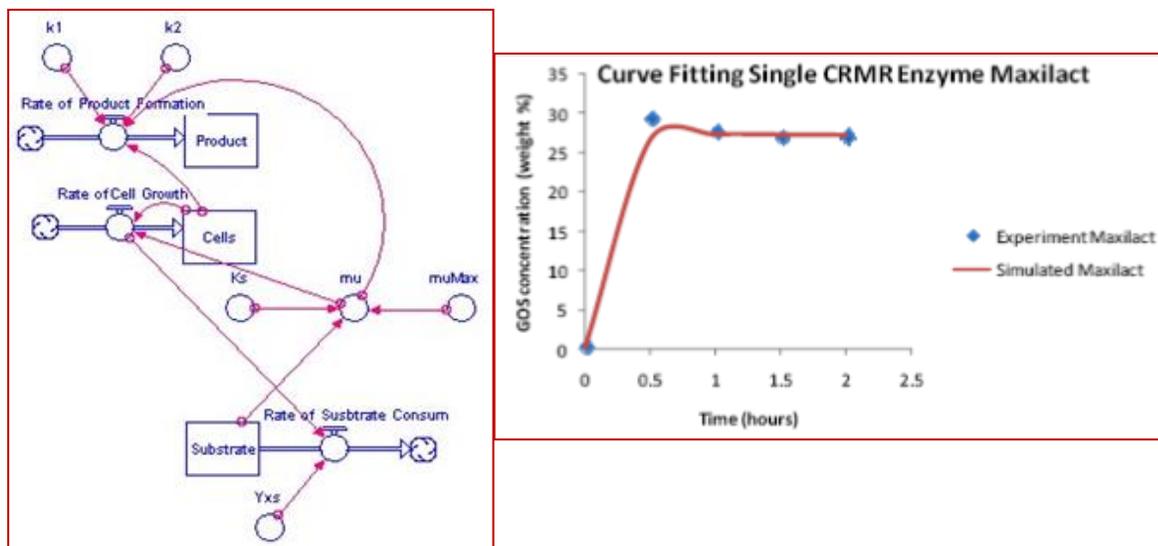


Figura 8. Modelo Gráfico del Cultivo Discontinuo con **STELLA** (izquierda); Ajuste de curva con **Berkeley Madonna** (derecha) Tomado de (Roberto A. Gonzalez, Mehrdad Ebrahimi, & Peter Czermak, 2009).

Para las *Escalas Demostrativa e Industrial* se requiere utilizar Simuladores de Proceso y el que se recomienda el simulador específico para procesos biotecnológicos: el **SuperPro Designer (SPD)** (Intelligen Inc., 2013), aunque también el SPD puede utilizarse en las Escalas de Laboratorio, Banco y Piloto (Esveidi Montserrat Valdovinos García, 2014).

Más abajo se muestra la representación en el *SuperPro Designer (SPD)* de una unidad para la realización de una Fermentación de Discontinua (Figura 9, izquierda) y la pantalla del *SPD* para la entrada de los datos cinéticos para poder llevar a cabo la simulación de dicho fermentador (Figura 9, derecha) (Roberto A. González Castellanos, 2014). Más abajo se muestra una pantalla denominada “*Profiles*” con la información sobre las variables para la corrida de simulación (Figura 10, izquierda) y el resultado de la corrida en *SPD* del Modelo “*Fermentación Cinética Discontinua*” (Figura 10, derecha)

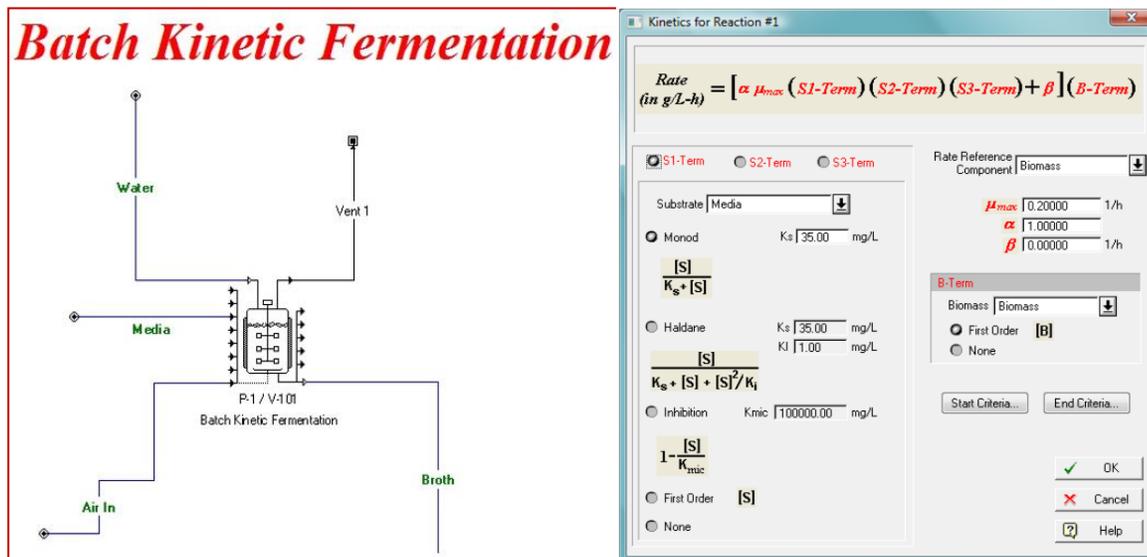


Figura 9. Esquema de una Unidad de Fermentación Discontinua con sus flujos (izquierda); Pantalla para la entrada de los datos cinéticos de la fermentación (derecha). (Super Pro Designer 2013)

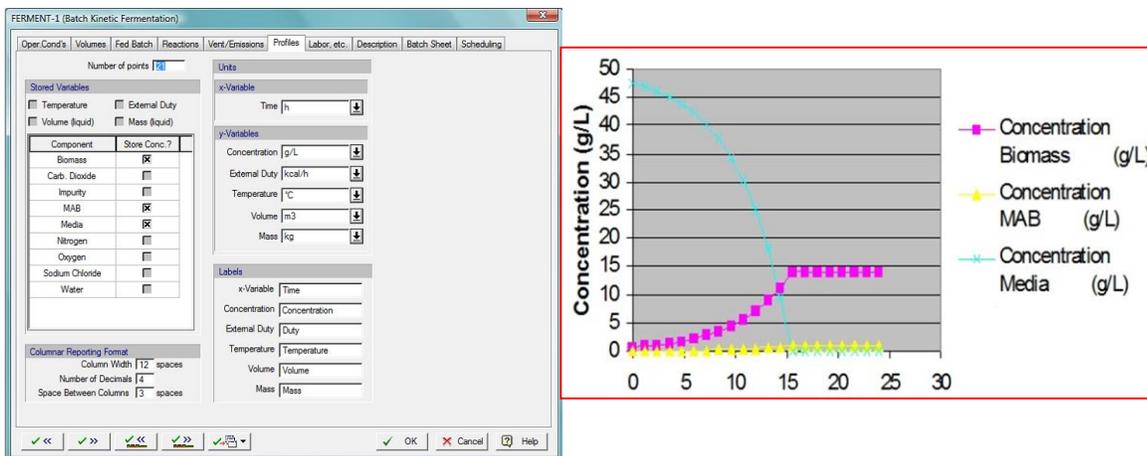


Figura 10. Datos de la pantalla -Profile- del Modelo Fermentación Cinética en Lote (izquierda); Resultado de la corrida de dicho modelo en *SPD* (derecha) Super Pro Designer 2013)

Una de las características del SPD que lo diferencia de otros Simuladores de Proceso (*Aspen ONE*, *CHEMCAD*, *Aspen HYSYS*, et.) es la existencia, además de la *Operaciones Unitarias* específicas para los Bioprocesos, de los *Procedimientos Unitarios*. Estos procedimientos consisten en un Conjunto de Operaciones que toman lugar secuencialmente en un mismo equipo. En el caso de la *Modelación de Proceso Discontinuos* a estos procedimientos unitarios se les denomina “*receta*” y consisten en un conjunto de operaciones secuenciales que se realizan, por ejemplo, en un fermentador, como: ‘Carga de A’, ‘Carga de B’, ‘Calentamiento’, ‘Agitación’, ‘Reacción’, ‘Transferencia Externa’ (en el simulador se escriben en inglés, o sea ‘*Charge A*’, ‘*Charge B*’, ‘*Heat*’, ‘*Stir*’, ‘*React*’, ‘*Transfer Out*’,) y ese conjunto de actividades es lo que constituye un Procedimiento Unitario (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2014b).

Sobre las operaciones antes mencionadas, es importante aclarar que, aunque se listen secuencialmente, pueden ocurrir a veces de manera concurrente. Por ejemplo, puede desarrollarse constante ‘*Stir*’, mientras se ejecutan secuencialmente ‘*Charge A*’, ‘*Charge B*’ y ‘*React*’, ya que en todas esas operaciones se requiere la agitación. Otro elemento importante es que un *Procedimiento Unitario* está unido con una clase de equipo en particular (*Reactor*, *Fermentor*, *Diafilter*, *Nutche filter*, etc), aunque *dos o más Operaciones Unitarias pueden compartir el mismo equipamiento, siempre y cuando se asegure que los tiempos de ocupación del equipo no se solapen.*

El *Procedimiento Unitario* permite modelar procesos por lotes (batch) con todo detalle. En el caso de los procesos continuos, normalmente cada *Procedimiento Unitario* tiene sólo una *Operación Unitaria* que se ejecuta todo el tiempo. Por ejemplo, el Procedimiento unitario **Centrifugal Pumping** involucra una única operación unitaria (**Centrifugal Pumping**) y el equipo hospedero es una *Centrifugal Pump*. En todos los casos, el conjunto de *Operaciones Unitarias* que se desarrollarán

en el *Procedimiento Unitario* se despliegan sobre el *Diagrama de Flujo de Procesos* (**PFD** por sus siglas en inglés), con un simple icono de **reactor** (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2014b).

A continuación, para que se tenga una idea de las posibilidades de simulación de procesos biotecnológicos que tiene el SPD, se muestra el Diagrama de Flujo de Procesos (PFD) del proceso de producción de Anticuerpos Monoclonales (MAB), cuyo fermentador fue el que se mostró en el ejemplo anterior (Figura 11) (Roger G. Harrison, Paul W. Todd, Scott R. Rudge, & Demetri P. Petrides, 215d. C.). Como podrán apreciar, se incluyen todas las etapas del proceso biotecnológico, tanto las de Purificación Previa (*Upstream*), como la de Biorreacción y la de Tratamiento de los Productos (*Downstream*) (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2014a).

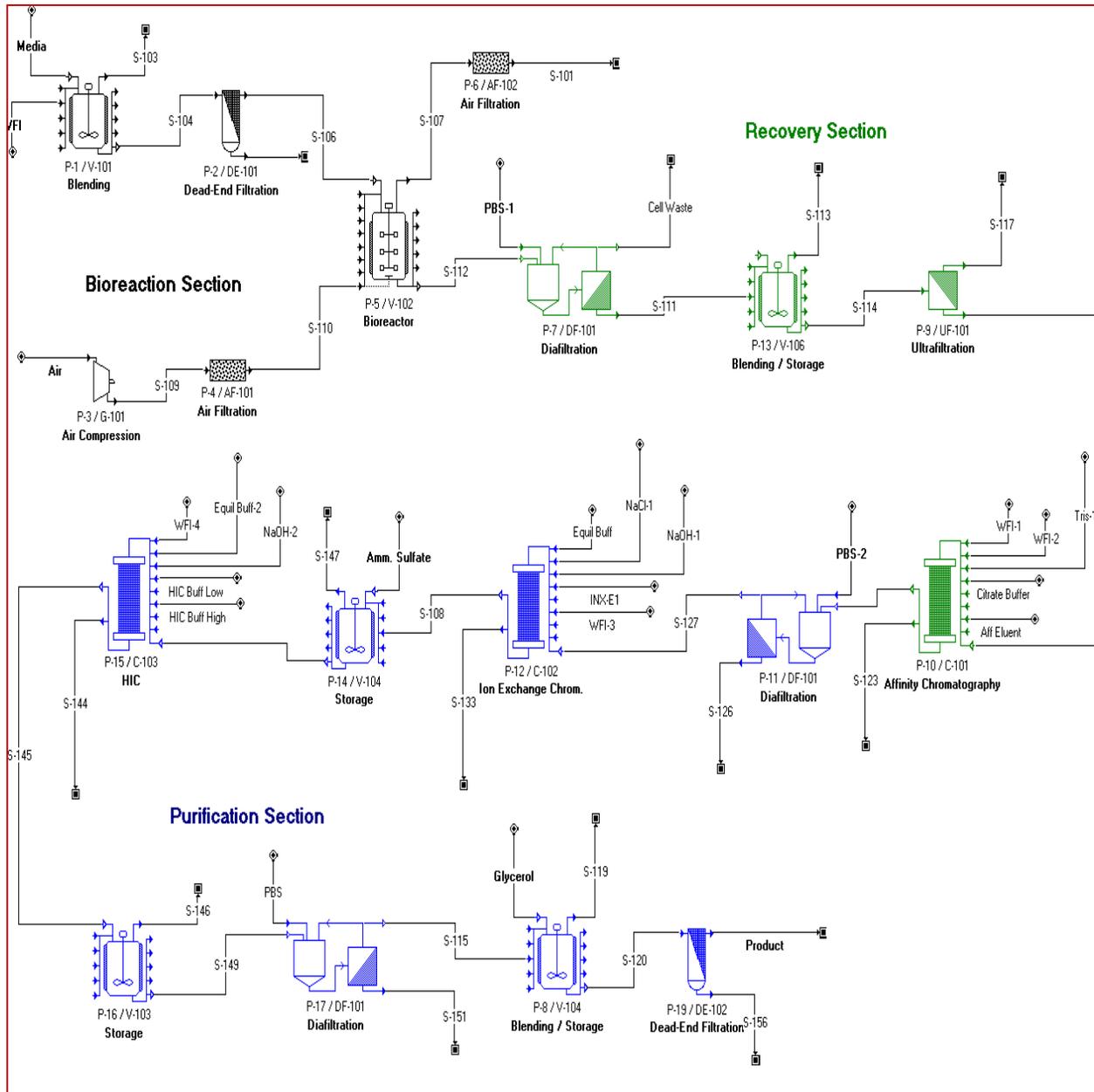


Figura 11. Ejemplo de Diagrama de Flujo del proceso de producción de Anticuerpos monoclonales (MAB).
(Super Pro Designer 2013)

5.8 Análisis Estadístico

5.8.1 Definición de la Población y tamaño de la muestra

En la metodología de la investigación un tema muy importante es el cálculo de la población que deben incluirse en un estudio y el tamaño de muestra que permite a los investigadores saber cuántos individuos o muestras son necesarios estudiar, para poder estimar un parámetro determinado con el grado de confianza deseado, o el número necesario para poder detectar una determinada diferencia entre los grupos de estudio, suponiendo que existiese realmente. El cálculo del tamaño de la muestra es una función matemática que expresa la relación entre las variables, cantidad de muestras y poder estadístico. La muestra de un estudio debe ser representativa de la población de interés. El objetivo principal de seleccionarla es hacer inferencias estadísticas acerca de la población de la que proviene. La selección debe ser probabilística, los factores estadísticos que determinan el tamaño de la muestra son: hipótesis, error tipo I, error tipo II, poder estadístico, variabilidad, pérdidas en el estudio y el tamaño del efecto (A. Calderoli Priscila. 2016).

Existen muchas fórmulas para definir el tamaño de la muestra, pero no obstante en la educación médica se han hecho consideraciones especiales para simplificar este cálculo y cumplir con un rigor estadístico que permita análisis conclusivos. Las consideraciones según García en su investigación del año 2013 (José Antonio García-García et al., 2013) son:

- Tamaño de muestra para estudios piloto se recomienda incluir entre 30 y 50 participantes o muestras, los cuales deben poseer los atributos que se desean medir en la población objetivo, previamente identificadas.
- Estrategias para minimizar el número necesario se basan en conseguir una población homogénea (desde los criterios de selección), disminuir la variabilidad de las medidas (aleatorizando,

formando bloques) y aumentar la frecuencia de aparición del fenómeno de interés, por lo que deben aplicarse siempre que sea posible.

- Utilizar Software, lo que facilita obtener el tamaño de muestra empleando programas en línea. lo puede hacer ligeras diferencias en el número de la muestra.

5.8.2 Análisis Estadístico de Varianza Univariado.

El *Diseño Completamente Aleatorio (DCA)* es conocido también como “*One Way ANOVA*”. Es un estudio muy útil para condiciones en que las unidades experimentan homogeneidad relativa, lo que permite colocar completamente al azar a los tratamientos en cada una de las unidades experimentales: es decir, este tipo de diseño no impone restricciones a las unidades experimentales. Este diseño también es útil para Ensayos de Campo en las que las unidades experimentales no requieren de agrupamiento o bloques en particular, esto es cuando el efecto de los tratamientos en estudio no estará determinado por la heterogeneidad de las muestras (Henry Pedroza & Luis Dicoyski, 2007).

Todas estas variantes de estudios experimentales, por el análisis y alcance de sus resultados llegan a convertirse en estudios de tipo analítico o estudios explicativos de causa y efecto, mediante la aplicación de los *ANOVA* en *DCA*. Las variables generadas en tales estudios se adaptan para aplicarles un *DCA*, siempre y cuando se cumplan las cuatro condiciones que se describen a continuación:

1. *La lógica en que se basa la relación causa-efecto que se propone demostrar*, dado que esa lógica es la fundamentación *sine qua non*, para que la prueba de hipótesis del *DCA* se plantee correctamente.
2. Que la(s) variable(s) dependiente(s) Y_{ijk} , cumplan los principios de:
 - a. *Normalidad de residuos* o prueba de Kolmogorov Smirnov.

- b. *Homogeneidad de varianza de los residuos con respecto a los tratamientos* o Prueba de Levene.
- c. *Independencia de los residuos.*
3. Que la(s) variable(s) independiente(s) (\mathbf{X}_i) o tratamientos o variables de clasificación, o causas del fenómeno objeto de estudio, cumplan los criterios de control que sean necesarios, preestablecidos en el protocolo de investigación.
4. Que el ANOVA a realizar, tenga suficientes repeticiones ($r \geq 4$) para cada una de los tratamientos en estudio, para alcanzar la validez y confiabilidad necesaria al evaluar la varianza de los tratamientos y del error experimental (Henry Pedroza & Luis Dicovskyi, 2007).

Al iniciar el procedimiento del ANOVA, se debe de hacer la descripción del *Modelo Aditivo Lineal*, que se describe a continuación:

Modelo Paramétrico del DCA: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$ donde:

$i = 1, 2, 3, \dots, t \dots$ tratamientos en estudio.

$j = 1, 2, 3, \dots, n \dots$ observaciones o repeticiones estadísticas.

Y_{ij} = La j -ésima observación del i -ésimo tratamiento

μ = Es la media poblacional a estimar a partir de los datos del experimento

τ_i = Efecto del i -ésimo tratamiento a estimar a partir de los datos del experimento.

ε_{ij} = Efecto aleatorio de variación

La hipótesis estadística a verificar es:

H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \dots \dots = \mu_n$

H_a : $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \dots \dots \neq \mu_n$

El ANOVA se puede realizar definiendo y organizando los datos según el software seleccionado, con el Test de rangos múltiples que se ajuste a los datos y permita probar las hipótesis estadísticas. Para realizar los análisis estadísticos existen muchos softwares. En el caso del software **InfoStat** (Mónica G. Balzarini et al., s/f) (Figura 12), que fue el seleccionado para esta Tesis, las bases de datos se organizan en tablas de doble entrada, donde usualmente cada fila contiene datos de una unidad de análisis y cada columna corresponde a una variable relevada (variable de clasificación, variable respuesta o covariable). Los valores de cada variable observados en cada unidad se ubican en las celdas de las tablas.

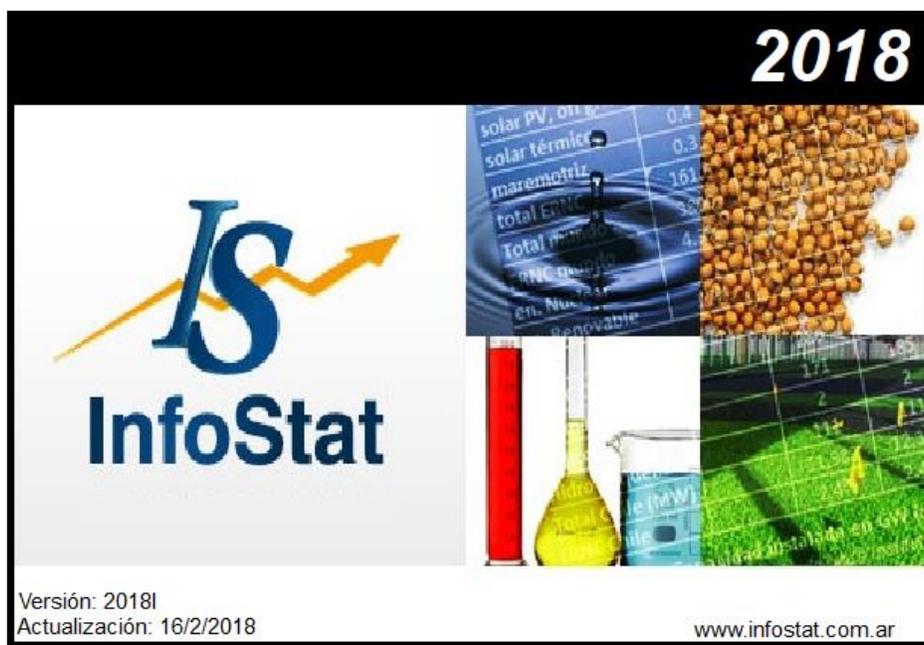


Figura 12. Pantalla de inicio del software de análisis estadístico utilizado (Mónica G. Balzarini et al., s/f)

Para realizar *Comparaciones de Rangos Múltiples*, cuando los efectos de un factor en el ANOVA son considerados como no nulos, se implementa una prueba de comparaciones múltiples de medias. Por eso **InfoStat** provee las medias de las muestras bajo cada una de las distribuciones que se comparan. El usuario puede indicar si desea comparar las medias de todos los tratamientos y en caso de diseños con estructura factorial de tratamientos, las medias de los niveles de cada uno de los factores que intervienen. Para analizar las diferencias “*a pares*” entre las medias de las distribuciones

que se comparan, es posible realizar una gran variedad de pruebas a posteriori o *Pruebas de Comparación Múltiple*. La ventana auxiliar “*Comparaciones*”, disponible en la ventana de ANOVA, permite solicitar procedimientos de comparaciones múltiples jerárquicos, basados en algoritmos de agrupamiento jerárquico y tratamientos tradicionales. Los procedimientos tradicionales generalmente presentan una menor tasa de error tipo I que los procedimientos basados en conglomerados, cuando se trabaja en experimentos que no tienen un buen control de los niveles de precisión usados para la comparación de medias. Con un número alto de medias de tratamiento, los procedimientos tradicionales pueden producir salidas de difícil interpretación ya que una misma media puede pertenecer a más de un grupo de medias (*falta de transitividad*). Por el contrario, los métodos jerárquicos para comparaciones de medias producen agrupamientos mutuamente excluyentes (*partición del conjunto de medias de tratamientos*) (Mónica G. Balzarini et al., s/f). En diversos textos se encuentran comentarios sobre las comparaciones entre los distintos métodos de rango múltiples, en los cuales el investigador está interesado en comparar las medias de tratamientos (Douglas C. Montgomery, 2017).

Cuando sólo se hacen comparaciones por parejas, el *Método de Tukey* conduce a límites de confianza más estrechos que el *Método de Scheffé*, por lo cual el *Método de Tukey* encontrará más diferencias significativas, siendo en este caso el método preferido. En cambio, cuando los contrastes son más complicados que la diferencia de medias. El *Procedimiento de Tukey* tiene un error tipo I menor que los correspondientes errores de las pruebas de *Newman-Keuls* y de *Duncan*; es decir, es una prueba más conservadora.

-

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio a realizar en esta Tesis es del tipo Experimental. La Escala de Laboratorio se llevó a cabo utilizando el cultivo sumergido en Erlenmeyers colocados en Agitadores Orbitales Rotatorios con Control de Temperatura, como es la práctica usual en esta Escala (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b) y en la misma se logró la optimización del medio de cultivo para utilizar en las siguientes escalas. Como se explicó al inicio, en la práctica no se pudieron continuar las investigaciones “in vitro”, pero se continuaron “in silico”, mediante la Modelación Matemática y la Simulación. De igual forma, “in silico”, se trabajó el diseño de la Planta de Producción de Hidrolizado de Levaduras a Escala Piloto. Para la realización de esta forma de Escalado, se tomó como base la experiencia de los trabajos realizados en Cuba, en los cuales no se pudieron realizar los experimentos en todas las Escalas necesarias y se utilizó la Modelación Matemática para permitir completar el Escalado (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009), aunque en ese caso los trabajos “in vitro” llegaron hasta la Escala de Banco en un caso y hasta la Escala Piloto en el otro (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009). Además, se cuenta con el software necesario para llevar a cabo esta tarea (**STELLA**; **Berkeley Madonna** y **SuperPro Designer**), las referencias bibliográficas pertinentes y el conocimiento básico sobre la operación de los mismos (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018a) (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018c) (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018d).

4.1 Ubicación del área de estudio

El estudio se realizó en el municipio de Managua que posee una superficie total de 289 km² y una superficie del área urbana de 150.5 km², con una altitud mínima de 43 metros sobre el nivel del mar. Posee un clima tropical de sabana, caracterizado por una prolongada estación seca y por temperaturas altas todo el año, que van desde los 27° C a 34° C. El promedio de precipitaciones anual se encuentra entre los 1,100 y 1,600 mm y con una humedad relativa del 70.5% (Dirección Aplicaciones

Meteorología, 2008). Los procedimientos desarrollados en esta investigación se llevaron a cabo en tres Instituciones: Universidad Nacional Agraria (UNA), Universidad Politécnica de Nicaragua (UPOLI), Universidad Nacional de Ingeniería (UNI).

En el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Animal (FACA) de la UNA, se realizaron los preparativos del material para las tomas de muestras. Posteriormente la parte de selección microbiológica se hizo en el Centro Biotecnológico (CEBIOT) de la UPOLI. Una vez seleccionadas las cepas de interés por pruebas bioquímicas, se regresó al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Animal (FACA) para hacer las corridas con medios de cultivo modificado, con el fin de determinar la capacidad de los microorganismos a crecer en un medio industrial y la viabilidad de sus enzimas en el caldo crudo de cultivo. Finalmente, a través de un proyecto del Programa de Investigación y Extensión, Estudios Nacionales y de Servicios Ambientales (PIENSA) de la Universidad de Ingeniería (UNI) se realizó la identificación por secuenciación de la especie de las cepas de *Bacillus spp* seleccionadas. Esta forma de trabajar solo fue posible materializarla por la estrecha colaboración lograda, dado el carácter inter-institucional de la Maestría que se está desarrollando.

4.2 Población y tamaño de la muestra

La población de esta investigación fue definida por el interés de aislar *Bacillus subtilis*, en las matrices descritas por Milán (Grethel Milián et al., 2014), como son suelo de granjas, concentrado de aves de corral, ciego de aves de engorde, leche sangre y heces de bovinos. El tamaño de la muestra seleccionada fue de 70 muestras 10 muestras por cada matriz seleccionada, cumpliendo con lo descrito por García en 2013 para estudios médicos (José Antonio García-García et al., 2013), donde defines como mínimo 30 muestras participantes y Calderoli en 2016 (A. Calderoli Priscila, 2016) en el aislamiento de microorganismos en suelo.

4.3 Fase Experimental (“in vitro”)

4.3.1 Recolección de muestras.

Se acopiaron 7 tipos de muestras con origen agroindustrial y producidas en el occidente del país, las muestras fueron colectadas en estado líquido y sólido. Estas muestras se transportaron en frío a 4 °C de los sitios de producción al laboratorio de Biotecnología de Universidad Politécnica de Nicaragua (UPOLI) donde fueron procesa de forma inmediata.(Kanupriya Miglani Sharma et al., 2017).

Las muestras colectadas fueron:

- 1.** Concentrado de pollos: Fue proporcionado por la Empresa Pollo Estrella siendo tomadas las muestras de concentrado directamente de los sacos que se suministrarían a los pollos.
- 2.** Heces frescas de Bovino: Se extrajeron directamente del recto de los bovinos utilizando guantes de palpar.
- 3.** Heces secas de bovino: Se recolectaron de las heces encontradas en el suelo del corral de Facultad de Ciencia Animal (FACA) de la UNA.
- 4.** Sangre de rastros bovino: Se recolectaron de la sangre que se encontraba en el piso del rastro de Sabana Grande luego del faenado.
- 5.** Sangre de matadero bovino: Se recolectaron en el Matadero San Martín de la línea de producción, en el Proceso de Sangrado y Degüello.
- 6.** Ciego de pollo: se compraron 5 pollos de la línea Cobb de cuarenta y dos días de edad y las muestras se tomaron directamente del ciego de los pollos.
- 7.** Leche sin hervir: las muestras se obtuvieron directamente de los cuartos mamarios de vacas y también se tomaron muestras de los recipientes en donde se almacena la leche, en una granja productora de leche ubicada en las cercanías de la FACA.

Las muestras recolectadas se codificaron y conservaron en termos con embalajes fríos para trasladarlas al laboratorio de Biotecnología (CEBiot) de la UPOLI y procesarlas (Bruce Budowle, Steven E. Schutzer, James P. Burans, & et alii, 2006).

4.3.2 Aislamiento de microorganismos.

Los microorganismos se aislaron en medios de cultivos sólidos a partir de las muestras colectadas, mediante un pretratamiento de shock térmico.(Bruce Budowle et al., 2006) (Michael T. Madigan et al., 2012). Se inocularon las 3 últimas diluciones en placas por duplicado, de las cuales se seleccionaron las colonias que respondían a las características morfológicas y apariencia de los *Bacillus Spp*: crecimiento de colonias en forma de abanico, crecimiento de colonias en masa, cremosa, rugosa, seca, lisa, húmeda y crecimiento de colonias con bordes dentados.(Huynh A. Hong et al., 2009) (Ver imagen en el *Anexo I*). Posteriormente se seleccionaron diferentes tipos de colonias identificadas y se sembraron por estrías para la obtención de cultivos puros. (María Elena Realpe, Carlos Arturo Hernández, & Clara Inés Agudelo, 2002)

4.3.3 Pretratamiento de las muestras.

Previo al aislamiento se tomaron alícuotas de cada muestra colectada que fueron sometidas a un Shock térmico en baño de María *TermoScientific Presicion*, a 71°C por cinco minutos para eliminar las formas vegetativas y microorganismos contaminantes y posteriormente se realizaron diluciones seriadas, hasta un total de 8 diluciones.(Kanupriya Miglani Sharma et al., 2017)

En el caso de las muestras colectadas sólidas, se preparan en extracto líquido, tomando 5 gramos de muestra, las que se suspendieron en 5 ml de agua estéril. Posteriormente, al igual que las muestras líquidas, se vierte la solución en tubos de 16 mm para aplicarles el Shock térmico.

4.3.4 Inoculación de muestras colectadas

La primera inoculación del material colectado y previamente tratado, se realizó por triplicado, durante un tiempo de incubación de 24 horas. Se inoculó 0.5 ml en la superficie del medio PCA en placa, para obtener crecimiento de todos los microorganismos posibles para posteriormente proceder a su selección y aislamiento. La técnica de siembra utilizada fue extensión o bañado, con asa tipo L (Figura 13) (Michael T. Madigan et al., 2012).

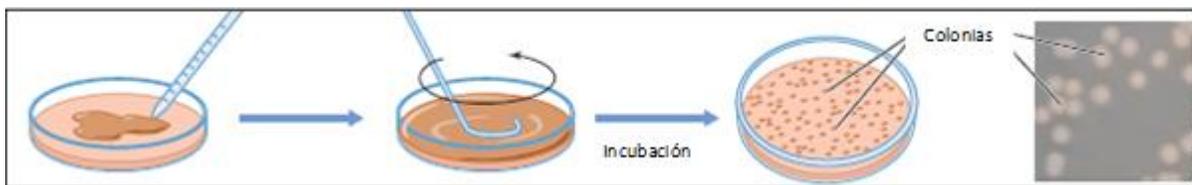


Figura 13. Método de siembra por extensión [(Michael T. Madigan et al., 2012)]

4.3.5 Selección y aislamiento de microorganismos

La selección y aislamiento se realizó a partir de las colonias obtenidas en la siembra de las muestras en PCA. Las placas con crecimiento microbiano mixto obtenidas se sometieron a la selección por colonias de bacterias que poseían morfología macroscópica característica del género *Bacillus spp*: crecimiento de colonias en forma de abanico, crecimiento de colonias en masa, cremosa, rugosa, seca, lisa, húmeda y crecimiento de colonias con bordes dentados. (María Elena Realpe et al., 2002) (Grethel Milián et al., 2014). Estas se purificaron en dos repiques o pases sucesivos cuando se observó que todas las colonias en la misma placa eran idénticas, a las cuales mediante la Tinción de Gram y Tinción de endoesporas ("verde Malaquita") (Ver imagen en anexo1.3) se les comprobó las características Microscópicas del género de interés. (D. H. Bergley & John G. Holt, 2000)

4.3.6 Conservación de los microorganismos aislados.

Los microorganismos aislados a -20 °C se conservaron en viales de 2 ml con caldo leche (William L. Cody et al., 2008). Los microorganismos seleccionados en paralelo además se conservaron usando el método de transferencia periódica para asegurar la viabilidad del mismo y tener muestras frescas para continuar el trabajo de investigación (J. M. Méndez-Úbeda, M. S. Flores Hernández, & L. A Páramo-Aguilera, 2017). La transferencia se realizó en medio agar nutritivo. Los intervalos entre cada transferencia fueron de un mes. Los sub-cultivos se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 4°C.

4.3.7 Identificación por pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas que se realizaron a las cepas que dieron positivo a la prueba de Gram, prueba diferencial que confirma la característica de la estructura de la membrana citoplasmática y la pared celular compuesta por una capa gruesa de péptido-glucano que retiene el color violeta y a su vez positiva a la formación de esporas para la replicación celular, ambas características de los *Bacillus spp* (D. H. Bergley & John G. Holt, 2000).

Las pruebas aplicadas fueron: *producción de Indol; fermentación de carbohidratos* (glucosa, fructosa, lactosa, manitol, TSI, SIM, MIO); *hidrólisis del almidón; producción de catalasa; producción de acetil metil carbinol o Voges-Proskauer; reducción de nitratos; utilización del citrato; crecimiento en presencia de NaCl* (Paul Cos, Arnold J. Vlietinck, Dirk Vanden Berghe, & Louis Maes, 2006); *producción de catalasa* (Carlos Andrés Bastidas, 2016) y *proteólisis de caseína*. Los procedimientos y claves de reacción se detallan en el **Anexo 2**.

4.3.8 Identificación molecular de los microorganismos seleccionados.

La identificación molecular se llevó a cabo a través de la secuenciación parcial del gen ADN ribosomal 16S para bacterias, utilizando cebadores *27F* y *1492R*; lo que produjo datos de secuenciación de **1.300 pb** o más (Figura 14) (J. M. Méndez-Úbeda et al., 2017).

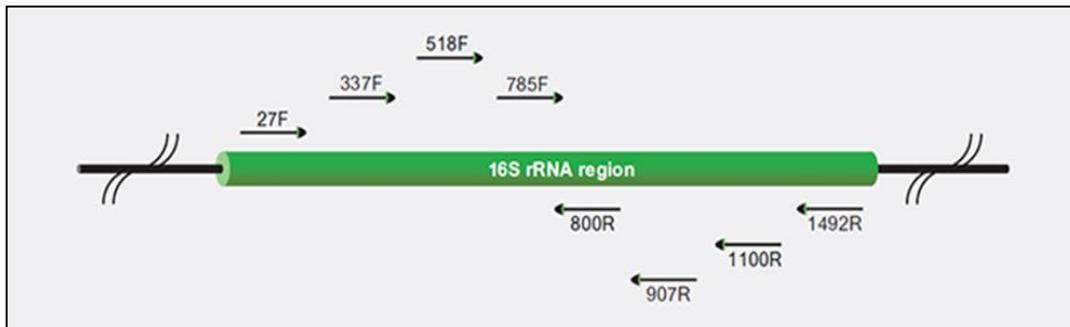


Figura 14. Cebadores utilizados para identificación bacteriana.

La subunidad rRNA 16S se considera el objetivo universal para la identificación bacteriana del ADN con la ayuda de la secuenciación. La tecnología de secuenciación de Sanger tuvo un gran impacto en la secuenciación de primera generación debido a su simplicidad (Avelina Suárez Moya, 2017).

La comparación de las secuencias del *gen ADNr 16S* permite establecer relaciones filogenéticas entre distintos organismos (J. M. Méndez-Úbeda et al., 2017). La identificación hasta el nivel de especie la realizó el Laboratorio de PIENSA-UNI. El procesamiento básico implicó el uso de dos cebadores internos (*785F* y *800R*) y para diferenciar una especie de otra se utilizaron cebadores adicionales, como los genes de limpieza que se muestran más abajo (Tabla 8). Estos genes son una alternativa para buscar la información filogenética y taxonómica de microorganismos (Erlendur Helgason, Nicolas J. Tourasse, Roger Meisal, Dominique A. Caugant, & Anne-Brit Kolstø, 2004).

4.3.8.1 Corrección de las secuencias

Los *electroferogramas* recibidos fueron corregidos visualmente usando el programa **Bioedit v7.0.9**. Se observó la secuencia de bases y se editaron los errores producidos por el secuenciador. Posteriormente se guardaron en formato *FASTA*. (Ver datos en *Anexo 2*).

La observación del *electroferograma* constituye el primer paso del análisis de las secuencias. Éste muestra el orden de las bases a partir de curvas de secuenciación de fragmentos de ADN por fluorescencia, una curva por cada base. Es importante revisar los *electroferogramas* antes de continuar con los análisis de la muestra debido a que brindan mucha información, incluyendo la calidad del trabajo de la *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* y por ende la confiabilidad de los datos obtenidos. (Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz, Beatriz Rendón Aguilar, & Martha Graciela Rocha Munive, 2014).

Se hace una interpretación de electroferogramas y a cada una de las bases le corresponde un color que el equipo interpreta como un pico y en la parte superior le asigna la base correspondiente. A) *Secuencia correcta*, a cada base corresponde un pico bien definido. B) *Existe una contaminación de otra secuencia de ADN*, por eso se ven los picos (secuencias) encimados. Para solucionar este problema se debe hacer más específica la amplificación por PCR o clonar el fragmento. C) *Cuando el producto no está bien purificado el templado o la concentración es menor a la recomendada*, se termina la señal antes de que se lea todo el fragmento. (Amelia Cornejo Romero et al., 2014)

4.3.8.2 Comparación de las secuencias

Las secuencias corregidas se compararon con las depositadas en la base de datos del **GenBank** del **NCBI** (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando la herramienta **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para secuencias altamente similares, comparando cada secuencia parcial del gen *16S e ITS* para

bacterias (Fabian Galvis Serrano & Laura Yolima Moreno Rozo, 2014).(Francisco Castillo-Reyes et al., 2015) (S. Yang, Q. Yan, Q. Bao, J. Liu, & Z. Jiang, 2017).

La introducción de la secuencia y su comparación con otras disponibles en la base de datos con la cual se trabaja proporciona un informe constituido por varias secciones. En el caso del programa **BLAST** antes mencionado, en la primera sección aparece un gráfico que indica el nivel y el tamaño de los fragmentos alineados, seguido de un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad (% de coincidencia).

4.3.8.3 *Alineamiento de secuencias*

Se realizó un alineamiento múltiple con las cinco secuencias elegidas para cada secuencia en estudio, utilizando la aplicación **Clustal W Multiple alignment for version 1.4** incluida en el menú *Accesory Application* del programa **Bioedit v7.0.9**. Posteriormente se repitieron los pasos de comparación de la secuencia alineada en el **BLAST** y la selección de las cinco secuencias con mayor identidad para ser guardadas en formato **FASTA**.

4.3.8.4 *Construcción de árboles filogenéticos*

Se utilizó el programa **MEGA 7.0.14** para la construcción de los árboles filogenéticos, usando el método *Neighbor-Joining Tree* como método de construcción del árbol, y evaluando la confiabilidad haciendo “*bootstrapping*” de 1000 repeticiones, teniendo en cuenta que cada rama se deberá repetir como mínimo en el 50% de las veces (J. M. Méndez-Úbeda et al., 2017).

4.3.9 Obtención de un crudo enzimático proteolítico a partir del crecimiento de los microorganismos seleccionados en un medio industrial

El proceso de crecimiento del crudo enzimático a *Escala de Laboratorio* se lleva a cabo en *Cultivo Sumergido*, por ser estos cultivos más ventajosos que los *Cultivos en Estado Sólido*, debido a la facilidad de esterilización, a que el control del proceso es más fácil de diseñar y a que favorecen la

producción de enzimas (Kanupriya Miglani Sharma et al., 2017). Como pasos previos a este proceso de desarrollaron las siguientes actividades:

4.3.9.1 Reactivación de los microorganismos aislados y preparación de solución madre

Las cepas preservadas en caldo leche, en copias de trabajo, fueron inoculadas en placas Petri que contenían 20 ml de agar nutriente (Ver imagen en anexo 1.5) y se incubaron en una *Incubadora Fisher Scientific* a 38°C por 24 horas. Posteriormente para preparar la solución madre, se inocularon en Erlenmeyer con 50 ml de caldo nutriente e incubadas a 38°C por 24 horas en un agitador orbital a 150 rpm (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b).

4.3.9.2 Preparación de medios modificados

La selección las composiciones del medio de cultivo se realizaron a partir de los resultados y crecimiento obtenido en la solución madre. La preparación del medio se formuló con los factores de variación; melaza, levadura torula y cloruro de calcio dihidrato. El preparado se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos a 100 Kpa (Manuel L. Pérez Quintana, 2000). Los equipos para medir pH, pesaje de los componentes de medios y esterilización fueron *pH-metro Orion 3Star*, *Balanza analítica OHAUS 0-65 gr* y *esterilizador All American* tipo Olla.

A continuación (Tabla 5), se muestran la formulación para cada tratamiento en el medio modificado: Melaza como fuente de carbono, Levadura Torula como fuente de nitrógeno, Calcio para la producción de enzimas hidrolíticas y Temperatura para la óptima reproducción de los microorganismos.

Tabla 5. Composición de medios modificados a los cuales se les evaluará como respuesta del tratamiento actividad enzimática

Número de Corrida	Factor 1 Melaza g/l	Factor 2 Levadura g/l	Factor 3 Calcio g/l	Factor 4 Temperatura °C
1	75	50	1.5	39
2	50	40	1	38
3	50	60	1	40
4	50	40	2	38
5	50	40	1	40

4.3.9.3 *Corridas para la obtención del crudo enzimático*

Para realizar la inoculación se prepararon diluciones seriadas 10^{-10} a partir de la solución madre. Se hizo un Diseño Experimental con el cual se definió que, por cada cepa evaluada se debían realizar 5 corridas por triplicado, organizadas por lotes con respecto al cuarto factor a evaluar, la temperatura, la que se evaluaría a tres niveles: 38°C, 39°C y 40°C. Los volúmenes de trabajo fueron 50 ml, los frascos utilizados para la fermentación fueron Erlenmeyer de 250 ml. Los resultados del Diseño se analizaron mediante el Programa *Infostat*, como se explica en el epígrafe de Análisis Estadístico.

Los preparados se incubaron en Agitadores Orbitales Rotatorios (“*Shaker*”), con control de temperatura (Ver anexo 1.6), que resulta el equipamiento más adecuado para la *Escala de Laboratorio* (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b). Con estos equipos se evaluó el crecimiento de la cepa seleccionada en un medio de cultivo industrial, variando la concentración de nutrientes en el medio y la temperatura del proceso de la fermentación, con el objetivo de obtener el medio de cultivo óptimo para el proceso industrial. El proceso se llevó a cabo durante 24 horas a 150 rpm, según las corridas experimentales por lote, basados como se dijo anteriormente en el factor temperatura.

Con el fin de determinar la cinética de crecimiento en el medio modificado se realizará una corrida final con la cepa seleccionada por el análisis estadístico de datos de la variable respuesta como es la Actividad Enzimática (AE) con un medio industrial en las concentraciones y temperatura con una diferencia significativa favorable para la obtención de un crudo enzimático con la mayor actividad enzimática experimentada. Los componentes a incorporar dentro del medio modificado final con la cepa seleccionada por su mejor AE son Melaza, Levadura, Calcio, Sodio, y agua, el pH a trabajar será el establecido en el ensayo de 7.5 pH.

4.3.10 Determinación de Actividad Enzimática

Para su determinación se empleó la metodología según Cupp (Carrie Cupp-Enyard, 2008), utilizando caseína como sustrato. Se realizó previamente una curva patrón de acuerdo al ensayo, luego se procedió a la preparación de caseína desnaturalizada, en la cual se utilizó agar caseína, hidróxido de sodio, urea, fosfato monobásico de potasio, procediendo así a la determinación de la actividad enzimática en unidades de Anson del Extracto de Crudo Enzimático (ECE) por espectrofotometría, a una longitud de onda de 300 nm. El equipo utilizado fue el *Nanodrop2000* y micropipetas *Eppendorf*. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que, bajo las condiciones del ensayo, libera 1 μg de aminoácidos positivos al Reactivo de Folin. por minuto, calculados como tirosina.

4.3.11 Determinación de proteólisis enzimática

Materiales: *Agar + leche descremada*; Sustrato: *Caseína (proteína)*, Enzima: *Caseinasa (Proteasa, exoenzima)*; Producto: *Aminoácidos; Revelador* (Microbiología e Inmunología., 2013).

Las *proteasas se excretan* al medio para la degradación de proteínas. La *caseína* es la proteína de la leche que le confiere el color blanco. Cuando la caseína *se hidroliza* desaparece el color blanco alrededor del crecimiento microbiano. El medio de cultivo (agar leche), en lugar de esterilizarlo, se filtró 0.45 mm y después se vertió a cada placa Petri con 20 ml del medio, con pH 7.5. Se inocularon 10 μl del crudo enzimático con una micro-pipeta Eppendorf de 0.1 a 10 μl y se incubó a 38°C por 24 horas. Se leyó el halo de hidrólisis de la caseína en milímetros. (Abhrajyoti Ghosh, et all 2008).

4.3.12 Análisis estadístico de los datos

El análisis de los resultados de Actividad Enzimática en el medio de cultivo industrial con los diferentes factores ensayados se realizó con la transformación de raíz cuadrada de los datos, a través de un *Diseño completamente al azar DCA* y *Análisis de Varianza con el Test de Tukey (ANOVA)*,

descrito por Pedroza en 2007 y Montgomery en 2017, (Henry Pedroza, & Luis Dicovskyi. 2007), (Douglas C. Montgomery 2017) con lo que se comprobó la normalidad de los datos cuantitativos, y la mejor composición del medio, así como la diferencia significativa entre la actividad enzimática obtenida por cada microorganismo seleccionado. Los datos se procesaron con el programa estadístico *Infostat versión libre 2016* <http://www.infostat.com.ar/> . *InfoStat* es un programa estadístico desarrollado con una interfaz avanzada para el manejo de datos basada en el difundido concepto de planilla electrónica. Permite importar y exportar bases de datos en formato *texto*, *EXCEL* y *Epiinfo*. Posee rápido acceso a herramientas para el manejo de datos como por ejemplo utilizar fórmulas, aplicar transformaciones, ordenar, categorizar variables, generar variables aleatorias mediante el uso de la simulación, concatenar tablas, seleccionar registros activos, etc. Las capacidades de copia y pegado permiten trasladar fácilmente tablas, resultados y gráficos a otras aplicaciones Windows (Mónica G. Balzarini et al., 2008).

4.4 Fase de Simulación

4.4.1 Escalado

4.4.1.1 Selección del Criterio de Escalado a utilizar

Como se explicó en el Marco Teórico, en esta Tesis se trabaja en el *Tipo 2 de Problema de Escalado*, o sea cuando ya están los equipos diseñados y hay que definir las condiciones del proceso. Por lo antes expuesto, durante el *Proceso de Escalado* es necesario alcanzar, en el *Biorreactor de Escala Industrial o Demostrativa*, un ambiente fisiológico e hidrodinámico tan similar como sea posible, al establecido en las *Etapas de Banco y Piloto*. Las soluciones de ingeniería para ese problema incluyen mantener la Semejanza Geométrica, siempre que sea posible. En el caso del Biorreactor, cuando es del tipo Tanque Agitado, los Criterios más importantes que se pueden mantener constantes son (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b):

- Número de Reynolds (*Re*)

- Potencia por unidad de volumen (P/V)
- Capacidad de bombeo por unidad de volumen (Q/V)
- Velocidad periférica (ND)
- Coeficiente de Transferencia de Masa ($k_L a$) (Este criterio, a diferencia de los anteriores, depende del Escalado del Flujo de Aire).

De los criterios anteriores, por experiencia práctica se ha definido que se puede excluir el criterio de *Mantener Constante el Número de Reynolds (Re)*, porque ofrece resultados poco prácticos. De igual forma puede excluirse el criterio de *Mantener Constante la Velocidad Periférica (ND)*, el que se reserva sólo para los casos de microorganismos muy sensibles al esfuerzo cortante, ya que produce durante el *Escalado Ascendente* un elevado consumo de potencia (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b) (Edward L. Paul, Victor A., Atiemo-Obeng, & Suzanne M. Kresta, 2004).

Por otra parte, como resulta muy difícil mantener en todos los casos la Semejanza Geométrica, se han incluido, entre los *Criterios de Escalado*, dos opciones más (Edward L. Paul et al., 2004) (Figura 15):

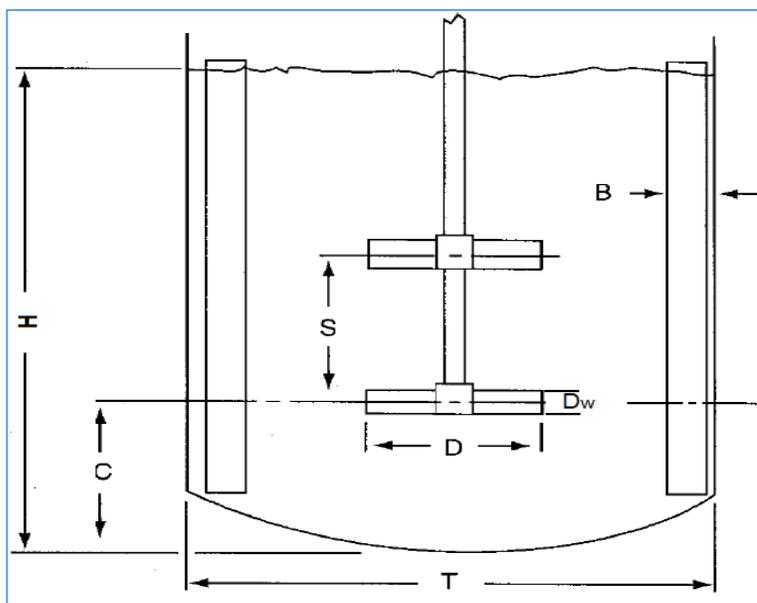


Figura 15. Figura estándar de mezclador, con agitador por el tope y dos impelentes en el eje, que incluye la separación entre impelentes (S), las dimensiones del impelente (D y D_w), el diámetro (T) y la altura (H) efectiva del

- Relación diámetro de impelente/diámetro de tanque (D/T)
- Relación del ancho de impelente/altura de impelente (D_w/D).

Además, para el cultivo de los microorganismos aerobios, que es el objeto de estudio de esta Tesis hay que considerar el *Escalado del Flujo de Aire*, lo que requiere mantener constante el *Coefficiente de Transferencia de Masa* (k_{LA}), lo que se puede alcanzar con dos variantes: 1. Mantener constantes k_{LA} y el *Flujo Volumétrico por Volumen* (Q/V), que también se mide como *Volumen de Aire por Volumen de aire por volumen de líquido por minuto* (vvm); 2. Mantener constantes k_{LA} y la *Velocidad Superficial del Aire* (v_s) (Edward L. Paul et al., 2004).

En particular, de estos dos criterios, se ha podido comprobar que *Mantener constante el Coeficiente de Transferencia de Oxígeno* (k_{LA}), *con igual Velocidad Superficial del Aire* (v_s), produce el mismo efecto que mantener *Igual Potencia por Unidad de Volumen* (P/V). De todo lo anterior resulta evidente que el efecto de los distintos Criterios, están interrelacionados, como se muestra más abajo. (Tabla 6). (En la Tabla no se consideró necesario incluir el *Número de Reynolds* (Re), por lo antes mencionado de que resulta poco práctico).

También se conoce que el *Escalado Ascendente* (“scale up”) del flujo de aire con *Igualdad de Flujo por Unidad de Volumen* (Q/V) o (vvm), produce resultados mejores, en el rango seguro, que si se mantiene el criterio de *Igual Velocidad Superficial* (v_s). Sin embargo, para el *Escalado Descendente* (“scale down”), los resultados mejores se obtienen con la *Igualdad de Velocidad Superficial* (v_s) (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b). Por todo lo antes expuesto, para el *Escalado* que se llevará a cabo en esta Tesis se utilizará el criterio de *Mantener Constante el Coeficiente de Transferencia de Masa Superficial* (k_{LA}), con igualdad de flujo volumétrico de aire (Q/V o vvm).

4.4.1.2 Definición de los Coeficientes Cinéticos

Para el trabajo con los Modelos Matemáticos se necesita contar con la información de los coeficientes cinéticos del microorganismo que se va a cultivar. Normalmente estos coeficientes se determinan durante las corridas en la *Escala de Banco*, ya que precisamente la determinación de los coeficientes cinéticos es una de las tareas que se deben realizar en esa Escala. Para esto, se tomaron como base el resultado del gráfico del consumo de sustrato (S), actividad enzimática (P) y concentración celular (X), obtenido a esa Escala (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b).

Tabla 6. Efecto en los diferentes Criterios de Escalado, cuando se cambia uno de ellos (Roberto A. González Castellanos, 2018b).

No.	Símbolo	Escala Piloto 20L	Escala Industrial (2500L)						
			Criterios de Escalado						
			Se mantiene la Semejanza Geométrica						Se aparta sólo DT
(P/V)	N	ND	$k_{f a_1}$ y v_{vm}	$k_{f a_1}$ y v_s	DT				
1	P	1	1000	1*E05	100	829	1000	1000	
2	T	1	5	5	5	5	5	5	
3	V	1	125	125	125	125	125	125	
4	D	1	5	5	5	5	5	7.8	
5	(D/T)	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.52	
6	(P/V)	1	1	100	0.2	0.8	1	1	
8	N	1	0.22	1	0.2	0.3	0.22	0.16	
9	ND	1	2.2	100	1	2.7	2.2	1	
10	Q	1	220	1000	100	275	220	125	
11	kLa/v_{vm}	1	1.59	39.8	0.32	1	-	1.59	
12	kLa/v_s	1	1	25.1	0.2	-	1	1	

Para obtener estos coeficientes a partir de los datos experimentales se pueden utilizar gran variedad de paquetes estadísticos, ya que casi todos cuentan con la función de Ajuste de Curvas. En este caso se decidió utilizar el software *Berkeley Madonna*, que cuenta con una buena función de *Ajuste de Curvas* (Robert Macey et al., 2009, p. 2). En este caso, primero se realiza la corrida del modelo matemático con los coeficientes estimados, se comparan los resultados obtenidos con los datos experimentales, como se muestra en el ejemplo de la referencia (Figura 36). Si la concordancia es buena, como en el ejemplo, todo está terminado. Pero lo más probable es que no lo sea y, en ese caso, hay que correr la opción *Ajuste de Curva* (“*Curve fit*”) con lo que se obtienen finalmente un ajuste mucho mejor. De esa forma el modelo queda validado, el modelo utilizado, al menos en el rango en que se ajustaron los coeficientes. De igual forma se pudiera modelar y ajustar las curvas en *EXCEL* e incluso realizar la corrida del modelo en el mismo, debido a la gran flexibilidad y utilidad de este software, disponible prácticamente en todas las computadoras. No obstante, *EXCEL* no puede ofrecer la flexibilidad de los softwares de modelación y simulación específicos (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018d), por lo cual en esta Tesis los ajustes se realizarán con *Berkeley Madonna*

Además, como normalmente los coeficientes obtenidos a *Escala de Laboratorio* se deben confirmar primero a *Escala de Banco*, antes de aplicarse en otras escalas, se decidió realizar una amplia búsqueda bibliográfica, para obtener información suficiente que sirva de referencia a la hora de analizar los coeficientes obtenidos a Escala de Laboratorio, que sirva de punto de referencia para la continuación del Escalado. En la búsqueda realizada se encontraron datos cinéticos de diferentes especies: *Bacillus subtilis* (D. Usha Priyanka, Ch. Kanaka Raju, A. Sumanjali, K. Dwaraka, & V. Meena, 2010), (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009), (Rajasekar Vinayagam1, Ramachandra Murty Vytla, & Muthukumaran Chandrasekaran, 2015, p. 752); *Bacillus licheniformis* (Marcela Alejandra Ferrero, 1995), (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009), (Biswanath Bhunia, Bikram Basak, Pinaki Bhattacharya, & Apurba Dey, 2012);

Escherichia coli (Raina M. Maier & Ian L. Pepper, 2015); *Saccharomyces cerevisiae* (Raina M. Maier & Ian L. Pepper, 2015); *Pseudomonas spp* (Raina M. Maier & Ian L. Pepper, 2015) y una sola referencia de *Bacillus cereus* (M. L E. Halmi et al., 2014). A partir de los datos obtenidos en esas fuentes, se obtuvo una Tabla Resumen que se muestra más abajo (Tabla 7). Los valores obtenidos servirán de guía para la selección de los coeficientes cinéticos del modelo, aunque siempre hay que tener en cuenta que los mismos se obtuvieron en condiciones que no son las mismas de este Proyecto y además con diferentes cepas de microorganismos.

Tabla 7. Datos de constantes cinéticas de Bacilos y otros microorganismos (elaboración propia como resultado de la revisión bibliográfica, con referencia en cada cita).

Fuente	ToC	Nutriente	mu max	Ks	Yxs	Alfa	Beta	Ki	Yps	ms
Escalado cepa B. subtilis GE20 Matanzas		Medio miel	0.5	1.696	0.151	1	0.005		1	0.09
Escalado cepa B. licheniformis E44 Matanzas		Medio azuc.	1.37	22.700						
PhD Ferrero 1995 - B. Licheniformis Medio Modificado	37	Medio Mod.	0.23							
PhD Ferrero 1995 - B. Licheniformis Medio Modificado	45	Medio Mod.	0.44							
PhD Ferrero 1995 - B. Licheniformis Medio Modificado	52	Medio Mod.	0.26							
J. Microbiol. Biotechnol. (2012) B. licheniformis - Monod+LP		Medio optm.	0.075	5.400		2.39				
J. Microbiol. Biotechnol. (2012) B. licheniformis - Andrews +LP		Medio optm.	0.109	11.1		2.39	0	0.12		
Int. J. Chem. Sci SSF B. subtilis proteasa 2010		Specific	0.026		0.18					
Growth kin B. subtilis lignoc. Carbon, 2014, Vol 6 No. 2, 570-574		Glucosa	0.481	1.3						
Growth kin B. subtilis lignoc. Carbon, 2014, Vol 6 No. 2, 570-575		Sacarosa	0.334	39.58						
Growth kin B. subtilis lignoc. Carbon, 2014, Vol 6 No. 2, 570-576		Almidón	0.074	67.32						
Growth kin B. subtilis lignoc. Carbon, 2014, Vol 6 No. 2, 570-577		Celulosa	0.049	500						
Growth kin B. subtilis lignoc. Carbon, 2014, Vol 6 No. 2, 570-578		Xylosa	0.136	132.2						
Growth kin B. subtilis lignoc. Carbon, 2014, Vol 6 No. 2, 570-579		Lignina	0.07	660						
JEBAT, 2014, Vol 2, No 1, 1-5, B. cereus degrdaando fenol (orig.)		Fenol	0.47	407				431		
JEBAT, 2014, Vol 2, No 1, 1-5, B. cereus degrdaando fenol (est.)		Fenol	0.993	514.3				391		
Austin J B & B, B subtilis 2015 (nattokinasa)		Medio optim.	0.364			0.364	0			
Envi. Microb. Chapt 3 Escherichia coli (no enzimas)	37	Glucosaa	0.8-1.4	0.2-4.0		0	0			
Envi. Microb. Chapt 3 Escherichia coli (no enzimas)	37	Lactosa	0.8	20		0	0			
Envi. Microb. Chapt 3 Saccharomyces cerevisiae (no enzimas)	30	Glucosa	0.5-0.6	25		0	0			
Envi. Microb. Chapt 3 - Pseudomons spp. (no enzimas)	25	Succinato	0.38	80		0	0			
Envi. Microb. Chapt 3 - Pseudomons spp. (no enzimas)	34	Succinato	0.47	13		0	0			

Por otra parte, del análisis de la bibliografía acopiada se pudo apreciar que el *Modelo Cinético* que mejor ajusta es el de *Haldane* que no es más que el de *Monod*, con la inclusión de la *Constante de Inhibición*. También se comprobó que, para el *Modelo para el Producto*, en el caso de la producción de las proteasas resulta mejor aplicar la *Ecuación de Luedeking Piret*, que permite modelar, en función de los valores de los coeficientes α o β , las distintas asociaciones del producto con el crecimiento: no asociado, asociado o mixto. Para el *Producto Asociado al Crecimiento*, $\beta = 0$, para el *Producto No Asociado al Crecimiento*, $\alpha = 0$ y cuando el producto se comporta de ambas formas (asociado y no asociado al crecimiento), ambos coeficientes, α y β tienen un valor específico.

No obstante, en el caso de la producción de proteasas, el producto es asociado al crecimiento, por lo cual el valor del coeficiente (β) debe ser cero, aunque se decidió dejar el Modelo de *Luedekin Piret* para darle un carácter más general al modelo. En resumen, como coeficientes cinéticos de referencia, se seleccionaron los que se muestran más abajo (Tabla 8).

Tabla 8. Coeficientes cinéticos seleccionados para los Modelos.

mu max	Ks	Yxs	Alfa	Beta	Ki	Yps	ms
0.5	1.696	0.151	2.39	0	0.012	1	0.09

En el siguiente capítulo se verá en detalle la elaboración del *Modelo Matemático* y se realizarán las simulaciones correspondientes, en las *Escalas de Banco y Piloto*, de manera que se puedan sentar las bases para elaborar el *Modelo Matemático del Diagrama de Flujo de Proceso (PFD)* de la *Planta de Producción de Hidrolizado de Levadura a Escala Piloto*. Posteriormente se realizará la *Simulación* del funcionamiento de la misma, lo que incluye una *Evaluación Económica Preliminar* de la Planta.

4.4.2 Modelación Matemática

Para el Modelo Matemático del proceso se requiere contar con un modelo que represente adecuadamente la *Cinética de las Fermentaciones Microbianas*, que no sea muy complejo y que sea lo suficiente realista. Para cumplir con ese objetivo, como se explicó anteriormente, se seleccionó el **Modelo Cinético de Haldane**, que es muy similar al de **Monod**, con la única diferencia que incorpora la *Constante de Inhibición por Sustrato* (K_i) que, según la bibliografía consultada, se necesita para obtener un buen ajuste de los resultados experimentales. Además del *Modelo Cinético*, normalmente es necesario plantear los *Balances de Materiales y Energía*, los que dependen del tipo de operación que se realice, la que puede ser *Continua*, *Discontinua* o *Discontinua Incrementada* (Brian Mcneil & Linda M. Harvey, 2008). Para la producción de enzimas se utiliza fundamentalmente el *Cultivo Sumergido Discontinuo* (Shijie Liu, 2017), por lo que será este tipo de operación la que se tendrá en cuenta para los Balances del Modelo Matemático.

Para plantear los Balances, se necesita como referencia un sistema simplificado general de un Biorreactor donde se consideran *Flujos de Entrada y Salida* (***Fin*** y ***Fout***), de manera que sean factibles de analizar las distintas formas de operación. En los flujos de entrada y salida se señalan los elementos que entran y salen del biorreactor. Como la entrada se considera aséptica, tendrá solamente el contenido de sustrato limitante (***S***), mientras que en la salida habría, además del sustrato (***S***), estarían presentes las células (***X***) y el producto (***P***). No obstante, para este Modelo se considera ***Fin = Fout = 0***, que es la característica del trabajo del *Cultivo Discontinuo*. Dentro del biorreactor se señalan los elementos que determinan la Cinética del Proceso: concentración de células (***X***); sustrato limitante (***S***) y producto (***P***). También se considera, de forma general, el volumen del reactor (***V***), aunque en este caso particular se elimina de las ecuaciones, ya que por ser el cultivo discontinuo, el volumen permanece constante (Roberto A. González Castellanos, 2014)

En el caso del *Balance de Energía*, éste no se considera necesario, ya que la fermentación se lleva a cabo a temperatura no muy lejana al ambiente ($\sim 40^\circ \text{C}$) y el incremento de temperatura se regula fácilmente por los sistemas convencionales instalados en las Escalas de Banco Piloto. Por su parte, el *Balance de Materiales* para el *Cultivo Discontinuo*, como la modelación se realizará con **STELLA**, resulta muy sencillo, ya que sólo es necesario situar adecuadamente los componentes del modelo (**Stocks, flujos y convertidores**), que se explicarán más abajo y ya quedan planteadas automáticamente las ecuaciones del *Balance de Materiales*.

Normalmente construir un modelo es una tarea muy difícil: el modelador necesita no solamente tener un buen conocimiento del proceso a modelar, sino también un profundo conocimiento matemático. Sin embargo, una de las ventajas de la *Técnica de la Dinámica de Sistemas* en la que se basa el Software **STELLA** que se ha seleccionado es que, además de ser muy útil para científicos e ingenieros, permite introducir a los científicos sin formación ingenieril ni de matemáticas y al público general, en la elaboración de modelos. Con un mínimo de formalismo matemático. *No se necesita cálculo matemático o ecuaciones diferenciales para elaborar un modelo matemático*. De hecho, los conceptos en el modelo se presentan utilizando solo texto, gráficos y álgebra básica. Los detalles matemáticos y las referencias a material más avanzado sólo se brindan a manera de información adicional. Las matemáticas superiores, aunque útiles, no son tan importantes como las habilidades de pensamiento crítico (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018a). Las reglas básicas del Lenguaje **STELLA**, traducidas y condensadas del libro de **Barry Richmond** (Barry Richmond, 2003). Se muestran en el *Anexo 7*.

VIII. RESULTADOS

8.1. Fase Experimental (“in vitro”)

Se colectaron muestras en la zona productiva de occidente, en su mayoría dentro de una fábrica de producción. Dichas muestras se inocularon en medios de cultivos sólidos para el aislamiento de bacterias y se identificaron los microorganismos seleccionados, mediante pruebas bioquímicas y por técnicas moleculares. Posteriormente, los aislados bacterianos se crecieron en medios de cultivos industriales, se determinó la actividad enzimática a *Escala de Laboratorio* y se seleccionó el mejor medio industrial, de manera de proceder posteriormente a desarrollar un modelo matemático para su producción a una mayor escala.

El desarrollo de esta tesis permitió obtener: un microorganismo identificado como *Bacillus cereus*, un medio modificado para la producción de *Extracto Crudo Enzimático (ECE)*, un modelo matemático para su Escalado, un modelo matemático para la producción de Hidrolizado de Levadura (HL) y la Propuesta del Proceso de Producción del Hidrolizado a Escala Piloto.

8.1.1. Recolección de muestras

Se tomaron muestras de 7 matrices en réplicas de 10 tomas por muestra. *Las muestras sólidas* recolectadas fueron en concentrados para Aves de corral (pollo de crianza intensiva), ciego de pollo y heces fresas y secas de bovino. *Las muestras líquidas* recolectadas fueron leche sin hervir, sangre de rastros y sangre de matadero de bovinos. En resumen, se obtuvieron como resultado del muestreo 70 muestras de 7 matrices, las cuales se codificaron utilizando, letras, números ordinales y romanos (Tabla 9).

Tabla 9. Muestreo y Codificación del material de estudio.

No.	Muestra	Código	Material de recolección
1.	Concentrado para aves	$\alpha 1 \dots \alpha 10$	Bolsa plástica 70 micras
2.	Heces frescas de bovino	A.....J	Bolsa plástica 70 micras
3.	Heces frescas de bovino	1.....10	Bolsa plástica 70 micras
4.	Sangre de Rastros de bovino	S1.....S10	Bolsa plástica 70 micras
5.	Sangre de Matadero de bovino	Sa.....SJ	Tubos de ensayo 16 mm
6.	Ciegos de Pollo	X1.....X5 ciego derecho	Placas Petri Pírex reusables y estériles
		Y1...Y5 ciego izquierdo	
7.	Leche sin hervir	I..... X # romanos	Tubos de ensayo 16 mm

8.1.2. Selección y Aislamiento de microorganismos

Las **70 muestras** obtenidas de los siete sustratos que se sometieron a Shock térmico y posteriormente se les realizaron diluciones seriadas, desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , de las cuales se tomaron las tres últimas diluciones y se cultivaron por duplicado para obtener un total de **420 placas inoculadas** en medio PCA. Estas placas se evaluaron por sus características macroscópicas y microscópicas típicas del género *Bacillus spp.* Con la tinción de Gram y de verde malaquita, se observaron al microscopio las cepas que poseían superficies en forma de abanico, crecimiento en masa, cremosa y rugosa con bordes dentados. (Figura 42)

Se obtuvieron **120 cepas** diferentes, crecidas en las placas con medio PCA inoculadas, de las cuales **46 cepas** presentaron las características (color, borde y contextura) de los *Bacillus spp.* De ellas, se purificaron **26 cepas** y, después de incubadas por 24 horas en medio AN (Agar Nutritivo) a 35° C, se les aplicó la prueba de *Tinción de Gram*. Se observó la forma y tamaño de las células al microscopio de luz con objetivo 100x con aceite de inmersión y se seleccionaron las *Gram positivas* (color violeta), de acuerdo a la forma de la célula y el resultado de la tinción.

A su vez estas **26 cepas** formaron esporas centrales, terminales, deformantes y no deformantes, tal como lo refiere el clásico *Brock Microbiology of Microorganisms* (Michael T. Madigan et al., 2012) y

lo describe el *Manual de Determinación Bacteriológica, para Bacillus spp* (D. H. Bergley & John G. Holt, 2000). Por lo tanto, se clasifican como *Gram positivas*, que muestran agrupaciones en forma de cadena y algunas bacterias aisladas. Las cepas se identificaron por el código que se les asignó por matriz, por el número de dilución de la que se obtuvieron con superíndice, los pasos de purificación con números ordinales entre paréntesis y el número de placa correspondiente al triplicado de B a D, ya que en algunos casos de una placa con un mismo código se extrajeron dos cepas con características de

Tabla 10. Cantidad de microorganismos aislados a partir de las matrices muestreadas.

No.	Matriz	Código	No. Bacterias
1	Concentrado para aves	$\alpha 1-\alpha 10$	1
2	Heces secas de bovino	1-oct	5
3	Heces frescas de bovino	A-J	1
5	Sangre de Matadero de bovino	Sa-Sj	2
6	Ciegos de Pollo	X1-X5	10
		Y1-Y5	
7	Leche sin hervir	I-X	7
	Total		26

bacilos (color, borde textura), pero no idénticas (Tabla 10).

8.1.3. Identificación por pruebas bioquímicas

Cuervo en el 2010 (Abhrajyoti Ghosh, Krishanu Chakrabarti, & Dhrubajyoti Chattopadhyay, 2008) e *Izurieta* en 2015 (Mohanasrinivasan Vaithilingam et al., 2016) evaluaron un bioinsumo y posteriormente aislaron cepas que se identificaron como *Bacillus subtilis*. Estas cepas presentaron tinción de Gram positiva, con endoesporas centrales, crecimiento aeróbico, reacción positiva a la catalasa positiva. Además, hidrolizan el almidón, reducen los nitratos, no producen Indol, forman escasa cantidad de ácido sulfúrico, presentan crecimiento en NaCl al 7%, tienen reacción positiva *Voges Proskauer*, dan negativo al manito y utilizan el citrato. Si se tiene en cuenta lo anterior y en base a los resultados que se han obtenido con la cepa evaluada, que además se confirma en el

Bergley's Manual (D. H. Bergley & John G. Holt, 2000), la cepa evaluada *debe ser identificada como Bacillus subtilis*.

Las pruebas bioquímicas y pruebas especiales microbiológicas permiten la identificación de géneros y especies de bacterias en muchos aislamientos. Las **26 cepas** aisladas en cultivo puro se sometieron a estas pruebas y se obtuvo como resultado, después de un análisis de conjunto, que **7 cepas fueron identificadas como Bacillus spp.** Dentro de estas cepas se seleccionaron, en base a los resultados de las reacciones bioquímicas, **3 cepas** para ser identificadas por técnicas moleculares.

8.1.4. Producción de catalasa.

La producción de la enzima catalasa es característica de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, como lo son los *Bacilos Gram positivos esporulados aerobios* (Carlos Andrés Bastidas, 2016). En este caso, la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno se tipificó como lenta, rápida, positiva y negativa, con el fin de obtener parámetros discriminatorios entre las cepas evaluadas, tal como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11.. Lectura de las reacciones a las pruebas de catalasa.

No.	Código de cepa	Reacción
1.	X5 ⁻⁸ (2)	CATALASA POSITIVA
2.	X5 ⁻⁹ (2) CD	CATALASA POSITIVA
3.	X2 ⁻¹⁰ (2)	CATALASA POSITIVA
4.	X5 ⁻⁹ (2) C	CATALASA POSITIVA
5.	8 ⁻⁹ (2)	CATALAS POSITIVO
6.	8 ⁻¹⁰ (1)	CATALASA POSITIVA (RAPIDA)
7.	VI ⁻⁸ (1)	CATALASA POSITIVA

8.1.5. Reacción a las pruebas bioquímicas en medios de cultivo.

Mediante las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las cepas fueron *TSI*, *KIA*, *Citrato de Simmons (CS)*, *VP*, *Manitol (MAN)*, *MIO*, *SIM* y *Pruebas de Sensibilidad a Antibióticos (Penicilina, Kanamicina, Eritromicina y Oxitetraciclina)*, se obtuvo la identificación por Microbiología convencional de **3 cepas** como *Bacillus subtilis* ($X5^{-9}$ (2) C; $X5^{-9}$ (2) CD; $X2^{-10}$ (2)), aisladas de ciego derecho de pollo (Carlos Andrés Bastidas, 2016). El resumen del resultado se muestra más abajo (Tabla 12) y en el *Anexo 1, Imagen 19* se muestra parte del proceso realizado.

Tabla 12. Pruebas bioquímicas aplicada en los microorganismos de estudio.

No.	Cepa	TSI	KIA	CS	VP	MAN	MIO	SIM
1	8^{-9} (2) <i>B. Cereus</i>	K/K	K/K	+	+	-	Ornitina + Motilidad + Indol -	Sulfuro+ Movilidad + Indol -
2	8^{-9} (1) <i>B. Cereus</i>	K/K	K/K	+	+	-	Ornitina + Motilidad + Indol -	Sulfuro- Movilidad + Indol -
3	$X5^{-9}$ (2) C <i>B. Subtilis</i>	K/A	K/A	+	+	+	Ornitina - Motilidad + Indol -	Sulfuro- Movilidad + Indol -
4	$X5^{-9}$ (2) CD <i>B. Subtilis</i>	K/A	K/A	+	+	+	Ornitina - Motilidad + Indol -	Sulfuro- Movilidad + Indol -
5	$X2^{-10}$ (2) <i>B. Subtilis</i>	K/A	K/A	+	+	+	Ornitina - Motilidad + Indol -	Sulfuro- Movilidad + Indol -
6	$\alpha 8^{-9}$ (1) <i>B. Cereus</i>	K/K	K/K	+	+	-	Ornitina + Motilidad + Indol -	Sulfuro- Movilidad + Indol -
7	VI- 8^{-9} (1) <i>B. Turingensis</i>	K/K	K/K	+	+	-	Ornitina - Motilidad + Indol -	Sulfuro- Movilidad - Indol -
8	ATCC 6051 <i>B. Subtilis</i>	K/A	K/A	+	+	+	Ornitina + Motilidad + Indol -	Sulfuro- Movilidad + Indol -

8.1.6. Sensibilidad a antibióticos

Milián (Grethel Milián et al., 2014) evaluó comportamiento de las cepas de *Bacillus subtilis* frente a los diferentes antibióticos encontrando cepas sensibles a 25 antibióticos de uso humano y animal. *Surokulova et al.*, evaluaron en 2008 (Iryna B. Sorokulova et al., 2008) cepas de *Bacillus spp* frente a 32 antibióticos entre los que se encontraban *Tetraciclina*, *Kanamicina*, *Eritromicina* y *ampicilina (penicilina)* y demostraron la resistencia y sensibilidad de estas cepas de bacilos ante estos antibióticos, donde con un halo de 12 ± 1 mm los consideraron resistentes. *Huynh A. Hong et al.*, en el 2008 evaluaron la seguridad de *Bacillus subtilis* y *Bacillus indicus*, también enfrentándolas con antibióticos, con iguales resultados (Huynh A. Hong, J-M Huang, & Simon M Cutting, 2008). Los resultados obtenidos en esta prueba (Tabla 13), muestran que las tres cepas (**X2-10 (2)**, **X5-9 (2) C**, **X5-9 (2) CD**) son resistentes a la *Penicilina* y sensibles a la *Eritromicina*. Además, una de las cepas, la **X5-9 (2) C**, mostró sensibilidad adicional a *Oxitetraciclina* y *Kanamicina* como se muestra en la tabla 11.

Tabla 13. Resultados de las pruebas por sensibilidad a los antibióticos

No.	Antibiótico (μg) ^a	Diámetros de inhibición (mm) ^b		
		X2-10 (2)	X5-9 (2) C	C, X5-9 (2) CD
1	Eritromicina (15)	12 ± 1 (S)	14 ± 1 (S)	12 ± 1 (S)
2	Kanamicina (30)	0 (R)	12 ± 1 (S)	0 (R)
3	Oxitetraciclina (30)	0 (R)	16 ± 1 (S)	0 (R)
4	Penicilina (10)	0 (R)	0 (R)	0 (R)

^a Antibióticos en discos de 6 mm impregnados con microgramos entre paréntesis.
^b Diámetro de inhibición en milímetros por cepa. (S) Sensible y (R) Resistente

8.1.7. Prueba especial para determinar Proteólisis de Caseína

Abhrajyoti Ghosh en 2008 (Abhrajyoti Ghosh et al., 2008) y *Mohanasrinivasan Vaithilingam* en 2016 (Mohanasrinivasan Vaithilingam et al., 2016) determinaron la actividad enzimática de cepas del genero *Bacillus* a través de la hidrólisis de caseína. Al igual que en las referencias, en este estudio se inoculó 10 μl

de cultivo de caldo nutriente a placas de agar leche, de manera que los resultados sirvieran para seleccionar las mejores cepas. Como resultado, se seleccionaron las tres cepas que obtuvieron mayores halos de hidrólisis, destacándose entre ellas la cepa *X5⁻⁹(2) C*, la cual obtuvo un halo de 46.66 mm a las 48 horas de incubación (Tabla 14).

Tabla 14. Halo de hidrólisis obtenido

No.	Cepa	Halo de hidrólisis (mm)		
		24 h ^a	36h	48h
1	<i>X2⁻¹⁰ (2)</i>	10	15.33	20.33
2	<i>X5⁻⁹ (2) C</i>	15.33	35.33	46.66
3	<i>X5⁻⁹ (2) CD</i>	16.33	33.66	43.33
^a Horas de incubación a 37 °C				

8.1.8. Identificación molecular de los microorganismos seleccionados

Las cepas previamente seleccionadas como las de mayor actividad proteolítica (Tabla 18), pasaron al proceso de identificación molecular. Como punto de partida hay que tener en cuenta que la búsqueda de microorganismos o bioprospección genera una gran cantidad de microorganismos de interés potencial y, después de una selección Microbiológica Básica que incluye las pruebas bioquímicas, se identificaron las cepas *X2⁻¹⁰ (2)*; *X5⁻⁹ (2) C* y *X5⁻⁹ (2) CD*, dentro del género *Bacillus*. Sin embargo, esa identificación no es suficiente, por lo cual se pasaron a secuenciar tres cepas seleccionadas. Ya con esta base, se pasó a realizar el análisis de las secuencias, lo que permitió obtener la identificación de los microorganismos hasta especie.

Para la identificación de los aislados de las bacterias seleccionadas, se contó con la colaboración del *Ph.D. Leandro Paramo*¹, que se encargó de los trabajos de Biología Molecular. Las cepas se codificaron, para los trabajos de *Bioinformática* como *X5-9E2 (O)*, *X2-10(2)2 (R)* y *X5-9CD2 (S)*.

¹ Ph.D. Leandro Alberto Páramo Aguilera, científico, investigador y docente del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería UNI.

El resultado final es que las cepas se identificaron como *Bacillus cereus*. Los resultados obtenidos con las secuencias analizadas se utilizaron para elaborar el *Árbol Filogenético*, cuya sección de interés se muestra más abajo (Figura 16). Las secuencias completas corregidas y alineadas en formato FASTA se muestran en el *Anexo 3*.

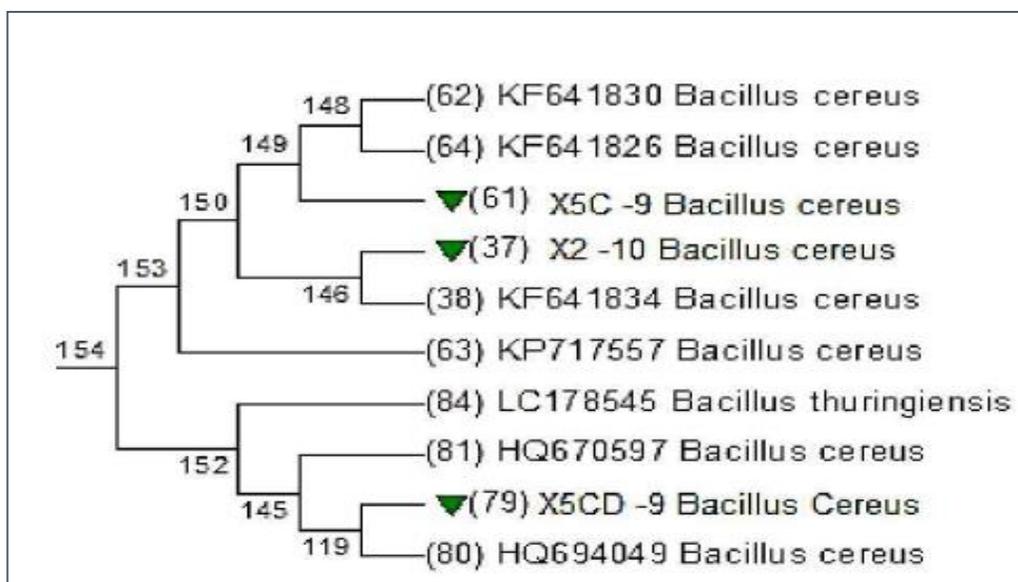


Figura 166. Sección del árbol filogenético de aislados bacteriano según el programa MEGA 7.0.14. El código de acceso a GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.

Más abajo se brinda un resumen de los resultados obtenidos en el análisis de las secuencias y la Identificación final de las bacterias (Tabla 15). Esta se obtuvo a partir del análisis del árbol filogenético (Anexo 1), obtenido con el programa MEGA 7.0.14. utilizando el método *Neighbor-Joining* y la información de las secuencias del *GenBank* que presentaban mayor homología.

En la Tabla se enlistan las bacterias aisladas de ciego de pollo (intestino). Cada especie bacteriana (cepa) confirma su identidad con las secuencias contenidas en el *Genbank*. El “*max scor*” se refiere a la puntuación de alineación más alta o cantidad de bases (*Adenina*, *Citosina*, *Timina* y *Guanina*) de la secuencia consulta, que coinciden en la misma posición con las bases de las secuencias contenidas en el *GenBank*, lo que depender del largo obtenido de la secuencia.

Tabla 15. Identificación por secuenciación de las cepas de estudio

Código de secuenciación	Posición en el árbol filogenético	*Código del microorganismo	Matriz	Vecino cercano (número acceso)	Máximo Puntaje	Identidad (%)	Identidad final
O	-61	X5-9E2	Ciego de Pollo	<i>Bacillus cereus</i> (KF641830)	1083	99	<i>Bacillus cereus</i>
R	-37	X2-10(2)2		<i>Bacillus cereus</i> (KF641834)	1555	98	<i>Bacillus cereus</i>
S	-79	X5-9CD2		<i>Bacillus cereus</i> (HQ694049)	1194	98	<i>Bacillus cereus</i>
*X5-9E2 corresponde al código de laboratorio X5 ⁻⁹ (2)C							
X2-10 corresponde al código de laboratorio X2 ⁻¹⁰ (2)							
X5-9CD corresponde al código de laboratorio X5 ⁻⁹ (2)CD							

8.1.9. Determinación de Actividad Enzimática como variable respuesta a la fermentación en medios modificados.

La actividad enzimática se mide a partir de la determinación de la cantidad de tirosina o triptófano que se forma en la hidrólisis de la caseína por la acción de las enzimas proteolíticas, que reaccionan con los hetero polímeros presentes en la composición del *Reactivo de Folin*. Esto provoca que la tirosina alcance una coloración azul, proporcional en intensidad a la cantidad de este aminoácido. Para obtener el valor de la Actividad Enzimática a partir de la intensidad de la coloración, se necesita con una Curva de Calibración, que convierta la lectura del espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Absorbancia), en *Unidades de Actividad Enzimática (UAE)*. Con ese objetivo se hizo la corrida de calibración de 0.05 a 10 μMol de tirosina, cuyos resultados se muestran a continuación (Tabla 16).

Tabla 16. Curva de calibración de la determinación de AE.

Identificación de muestra	Conct.Tirosina (μMol)	Abs a 660 nm
Blanco	0	0.003
St1	0.055	0.160
St2	0.111	0.220
St3	0.221	0.275
St4	0.442	0.380
St5	0.553	0.450
St6	1.000	0.540
St7	5.000	0.640
St8	10.000	0.736

A partir de esos datos, se obtuvo la *Curva de Calibración* a una longitud de onda de 660 nm con un R^2 o ajuste a la ecuación lineal de 0.9927 como se muestra más adelante en el anexo 4.

8.1.10. Selección del medio de cultivo industrial óptimo

Para la realización de las corridas en *Agitador Orbital Rotatorio*, que permitan definir la composición óptima del medio industrial en el cual se desarrollará posteriormente el proceso de producción del *Extracto Crudo Enzimático (ECE)*, se utilizaron las tres cepas que resultaron más eficientes en las corridas de proteólisis de caseína hidrólisis. Para seleccionar las fuentes de nitrógeno y de carbono en el medio, se partió del resultado de la búsqueda bibliográfica, que plantea que el requerimiento de un suplemento de carbono y de específico difiere de organismo a organismo y diferentes investigadores han utilizado diferentes fuentes de nitrógeno orgánico (simple o complejo), fuentes de nitrógeno inorgánico y aminoácidos para mejorar la producción de proteasas, por lo cual no hay una guía definida.

Con relación a las *fuentes de nitrógeno*, un factor que resultó tener una diferencia significativa en el medio de cultivo, es el Autolisado de Levadura. Éste es un medio complejo en su composición que, cuando se emplea a concentraciones adecuadas, induce la síntesis y secreción de enzimas proteolíticas. Como *fuentes de carbono*, la melaza es muy utilizada, aunque la glucosa es el metabolito represor más común; pero su acción puede ser prevenida con cantidades mínimas de esta fuente de carbono en el medio de cultivo microbiano (Manuel L. Pérez Quintana, 2000). De

igual forma se señala que el *nivel óptimo de Calcio* para la producción de enzimas proteolíticas por estas cepas se encuentra entre 1.5 y 2.0 g/l y su presencia es requerida e indispensable para la síntesis y la actividad enzimática. Para las pruebas, se realizaron cinco corridas por triplicado para cada cepa. La temperatura se varió entre 38 °C y 40°C, siendo que es el rango en que se produce una expresión más favorable en la expresión de la variable respuesta medida y la concentración de los componentes del medio de cultivo industrial es de 38 °C y 39 °C. Los valores obtenidos, para cada cepa, se muestran más abajo (Tablas 17) y con la figura 18 del gráfico con líneas de tendencia se puede observar la drástica disminución de la actividad enzimática a 40 °C.

Tabla 17. Actividades enzimáticas de las cepas en estudio

Corrida #	Cepa	Conct. Tirosina (µMol)	Unidades AE/ml	Levadura Torula	Melasa	Ca	Temperatura
1	X5cd 12	7.4310	27.2469	40	50	2.0	38
2	X5cd 4	9.9440	36.4613	40	50	1.0	38
3	X5cd 3	10.4922	38.4714	50	75	1.5	39
4	X5cd 15	1.8407	6.7494	40	50	1.0	40
5	X5cd 10	1.3766	5.0474	60	50	1.0	40

Corrida #	Cepa	Conct. Tirosina (µMol)	Unidades AE/ml	Levadura Torula	Melasa	Ca	Temperatura
1	X2 12	7.8832	44.0763	40	50	2.0	38
2	X2 4	8.6034	31.5460	40	50	1.0	38
3	X2 3	8.5354	31.6927	50	75	1.5	39
4	X2 15	0.6122	11.8261	40	50	1.0	40
5	X2 10	1.1965	3.7268	60	50	1.0	40

Corrida #	Cepa	Conct. Tirosina (µMol)	Unidades AE/ml	Levadura Torula	Melasa	Ca	Temperatura
1	X5C 12	7.8832	44.0763	40	50	2.0	38
2	X5C 4	8.6034	31.5460	40	50	1.0	38
3	X5C 3	8.5354	31.6927	50	75	1.5	39
4	X5C 15	0.6122	11.8261	40	50	1.0	40
5	X5C 10	1.1965	3.7268	60	50	1.0	40

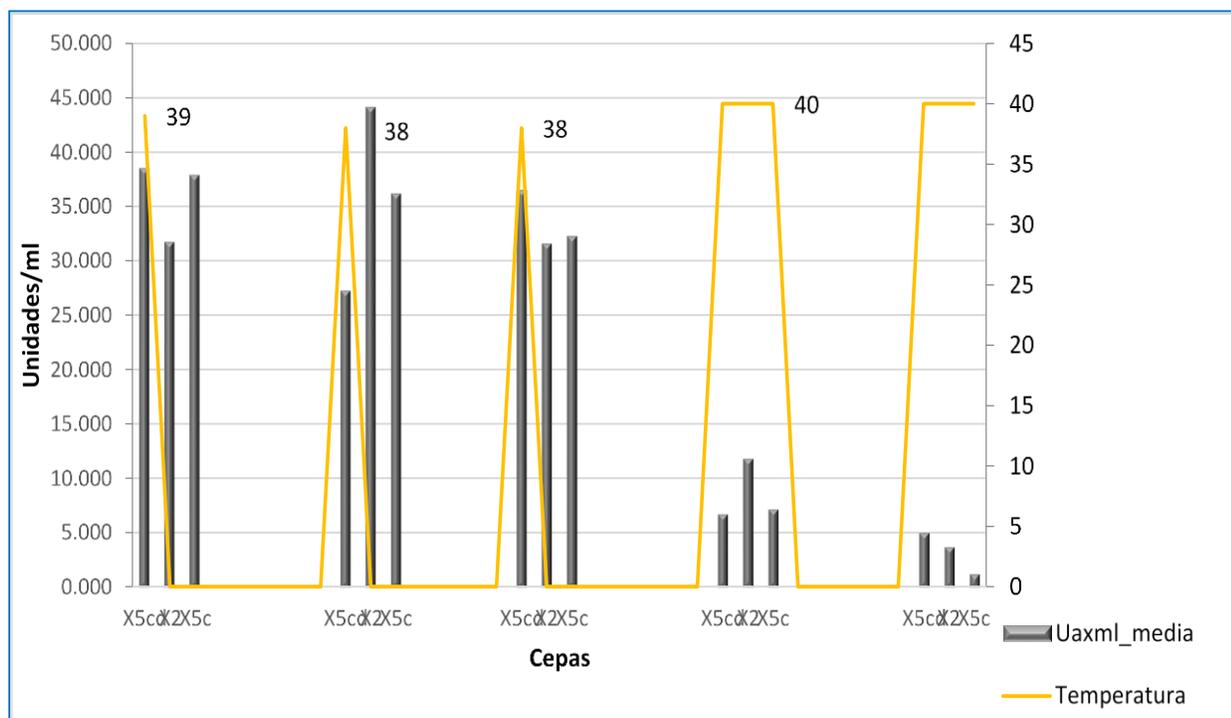


Figura 17. Unidades/ml de actividad enzimática por cada tratamiento

8.1.11. Análisis estadístico de los valores de Actividad Enzimática como variable respuesta a la fermentación en medios modificados de las tres cepas seleccionadas

Con el fin de analizar los datos de actividad enzimática y seleccionar el mejor medio de cultivo y la cepa de mayor actividad enzimática se realizó un *Análisis Estadístico de Varianza (ANOVA) con un diseño completamente al azar (DCA)*, considerando como variable dependiente o respuesta la actividad enzimática obtenida. En el ensayo, se evaluó cada corrida, en cada cepa, por triplicado. Se utilizó la función ANOVA de *InfoStat* para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Para comparar las medias se aplicó el *Estadístico de Rango Multifactorial de Tukey* con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$, con interacciones, sin interacciones y con particiones. (Henry Pedroza, & Luis Dicovskyi. 2007)

Modelo Paramétrico del DCA: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$ donde:

$i = 1, 2, 3, \dots$ tratamientos en estudio. En este caso, los tratamientos son las tres diferentes cepas de *Bacillus cereus* en estudio un medio modificado.

$j = 1, 2, 3, \dots$ observaciones o repeticiones estadísticas.

Y_{ij} = La j -ésima observación del i -ésimo tratamiento

μ = Es la media de Unidades/ml a estimar a partir de los datos del experimento

τ_i = Efecto del i -ésimo tratamiento a estimar a partir de los datos del experimento.

En este caso, el τ_i representa el efecto de los diferentes tratamientos donde se inoculó e incubó el microorganismo, sobre la variable respuesta *Unidades/ml de actividad enzimática..*

ε_{ij} = Efecto aleatorio de variación

La hipótesis estadística a verificar es:

H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

H_a : $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$

Para el análisis de los datos se utilizó la **transformada raíz cuadrada** (Anexo 5) y se probó la normalidad de los datos a través del cumplimiento de los principios:

1. Normalidad de residuos (Figura 19).
2. Homogeneidad de varianza de los residuos con respecto a los tratamientos (Tabla 26)
3. Independencia de los residuos (Figura 20).

7.1.11.1 Normalidad de residuos.

La prueba de normalidad examina el grado de asociación que existe entre los residuos y la función normal, la cual ha sido linealizada mediante la función logarítmica. Este grado de

asociación se mide por el coeficiente de correlación “ r ” y debe obtenerse $r \geq 0.94$, para aceptar la *Normalidad de los Residuos*, lo que demuestra que existe una correlación significativa entre los residuos y la función normal (Mónica Balzarini et al., 2015). En este caso, la prueba de Normalidad de los residuos realizada mediante el QQ Plot, para la variable respuesta Raíz de U/ml (Figura 19), demostró que, se cumple la condición de Normalidad de los residuos, puesto que se alcanzó un $r = 0.987$, es decir que $r \geq 0,94$.

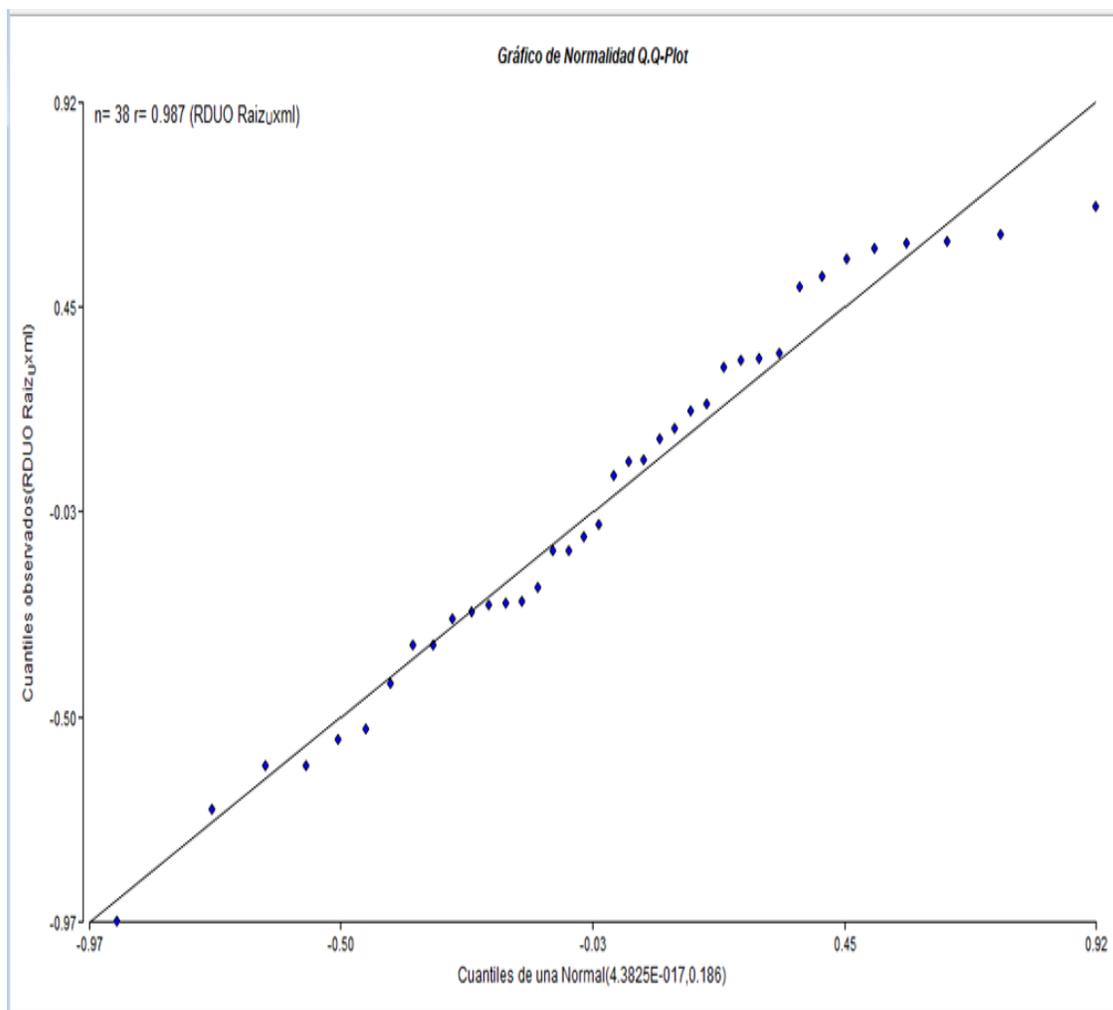


Figura 18. Diagnóstico de Normalidad de residuos. El valor de R en el gráfico QQ-Plot es >0.94 (0.987) por lo que se acepta H_0 , hay normalidad de los residuos.

Tabla 18. Resultados de Prueba de Homogeneidad de Levene, extraída de InfoStat, (Versión libre).

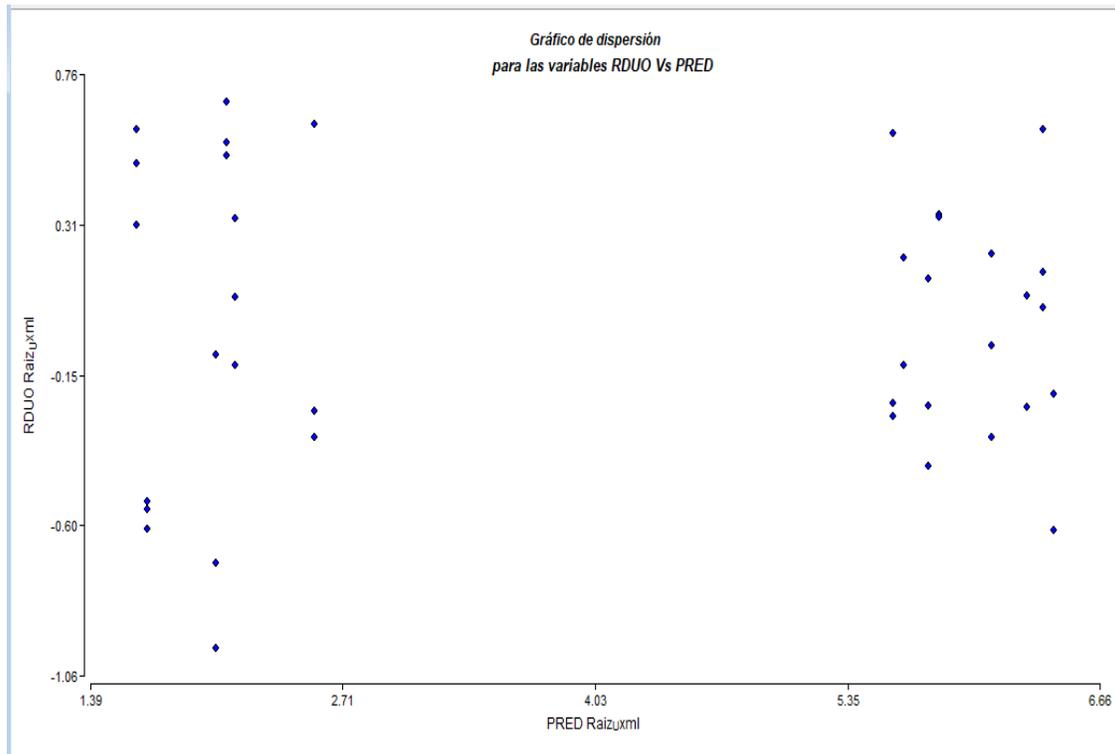
Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
RDUO Raiz Uxml	38	0.00	0.00	1.08408757710248E18	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.00	2	0.00	0.00	>0.9999
Cepa	0.00	2	0.00	0.00	>0.9999
Error	6.88	35	0.20		
Total	6.88	37			

Debido a que se obtuvo un r significativo en la prueba realizada, se cumple con el supuesto de normalidad para realizar correctamente el ANOVA con el *Modelo de Análisis de Diseño Completamente al Azar* (Henry Pedroza, & Luis Dicovskyi. 2007), (Douglas C. Montgomery 2017)

7.1.11.2 Prueba de Homogeneidad de los datos

La **Prueba de Levene** realizada (Tabla 18), permite afirmar que se acepta la H_0 : Los errores tienen varianzas homogéneas, debido a que se obtuvo un $p = 0,9999$, el cual resultó ser mayor que el nivel crítico de comparación, nivel de significancia previamente establecido en $\alpha = 0,05$. Dado que se obtuvo una respuesta no significativa (**NS**) a partir de la *Prueba de Levene*, se cumple con el segundo de los supuestos fundamentales para realizar correctamente el *Modelo del DCA*.

Figura 19. Gráfico de Dispersión de los datos



7.1.11.3 Prueba de Homogeneidad de los datos

El tercer y último supuesto es la dispersión de los datos, los que se pueden observar en la Figura 20. El gráfico de dispersión permite observar una tendencia de respuesta o patrón de comportamiento de los datos, para diagnosticar la hipótesis nula de **H₀: Los errores tienen varianzas homogéneas**. Para que se demuestre la *Homogeneidad de Varianza*, *no debe observarse ningún patrón o tendencia de respuesta de los residuos* (Mónica Balzarini et al., 2015).

En el gráfico de dispersión entre *RDUO_de la Raiz-U/ml* y *PRED_de la Raiz-U/ml.*, se observa claramente que *no hay patron o tendencia de respuesta de los residuos*. Por lo tanto, se cumple uno de los supuestos estadísticos. Posteriormente, una vez que se ha demostrado que se cumplen

con los supuestos estadísticos, se procedió a realizar el ANOVA sin interacciones, con interacciones y con particiones y los resultados obtenidos se describen a continuación:

1. *Análisis de ANOVA sin interacción* con el Test de Tukey con un $R= 0.95$ y 31 grados de libertad, no hay diferencia significativa entre las cepas con respecto a la variable respuesta la Raíz_U/ml de enzimas, no obstante, hay una diferencia significativa entre la temperatura de 38 °C a 40°C, obteniendo para las tres diferencias significativas con mejor actividad enzimática en el rango de 38°C a 39 °C, 2 a 1.5 g/l de Calcio, 50 g/l de Levadura y con la cantidad de 75 g/l de melaza (Anexo 6.1).
2. *Análisis de ANOVA con interacción* con el Test de Tukey con un $R= 0.96$ y 26 grados de libertad, se determina con el análisis de datos con interacciones hay una diferencia significativa con mejor actividad enzimática en el rango de 38°C a 39 °C, 2 a 1.5 g/l de Calcio, 50 g/l de Levadura y con la cantidad de 50 g/l de melaza (Anexo 6.2).
3. *Análisis de ANOVA con particiones* con el Test de Tukey con un $R= 0.98$ y 10 grados de libertad, hay diferencia significativa entre las cepas y los tratamientos con respecto a la variable respuesta la Raíz U/ml de actividad enzimática (AE), como se muestra en los gráficos de barras (Anexo 6.3). Como resultado final de la evaluación de las cepas con particiones, a continuación, se muestran los gráficos de resultados para cada una de ellas (Figuras 21, 22 y 23) y su AE con los tratamientos o medio de cultivos modificados, en estos gráficos es evidente la temperatura es uno de los factores más importantes para la actividad enzimática.

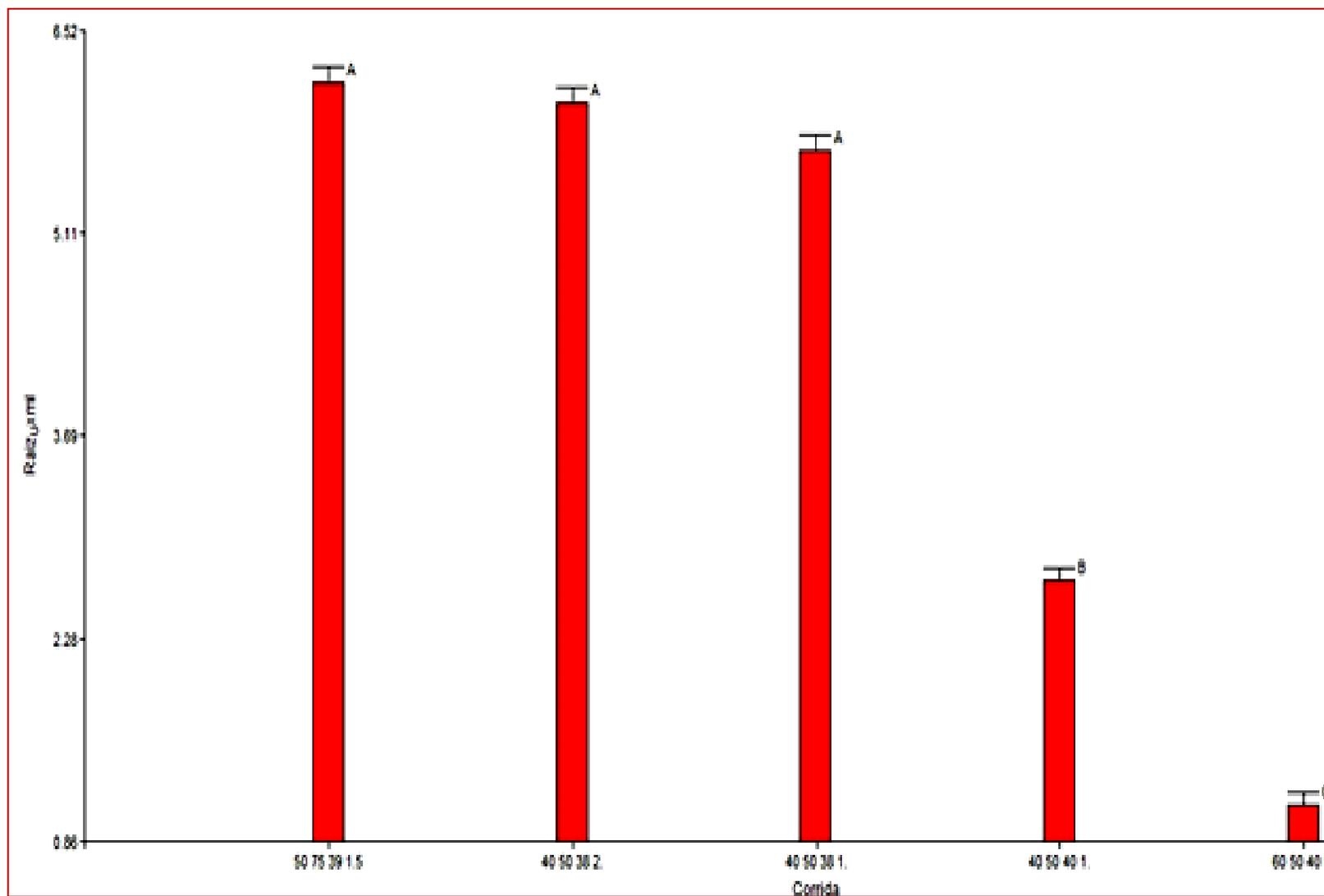


Figura 20. Cepa X5CD & Raíz U/ml donde el mejor tratamiento es de **50 g/l de Levadura Torula, 75 g/l de melaza, 1.5 g/l de Ca y 39 °C**

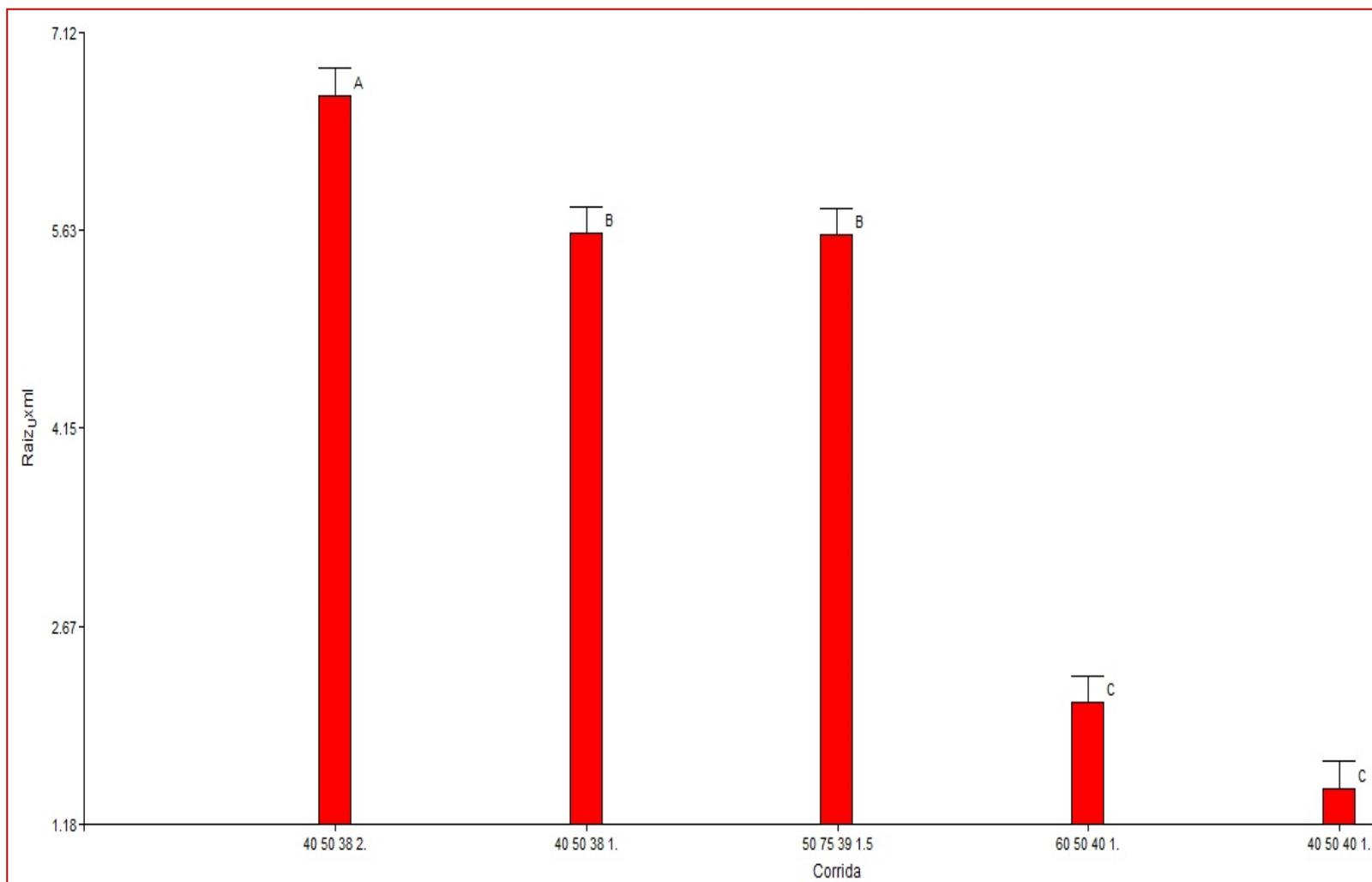


Figura 21. Cepa X2 & Raiz_U/ml donde el mejor tratamiento es de **40 g/l de levadura torula, 50 g/l de melaza, 2 g/l de Ca y 38 °C**

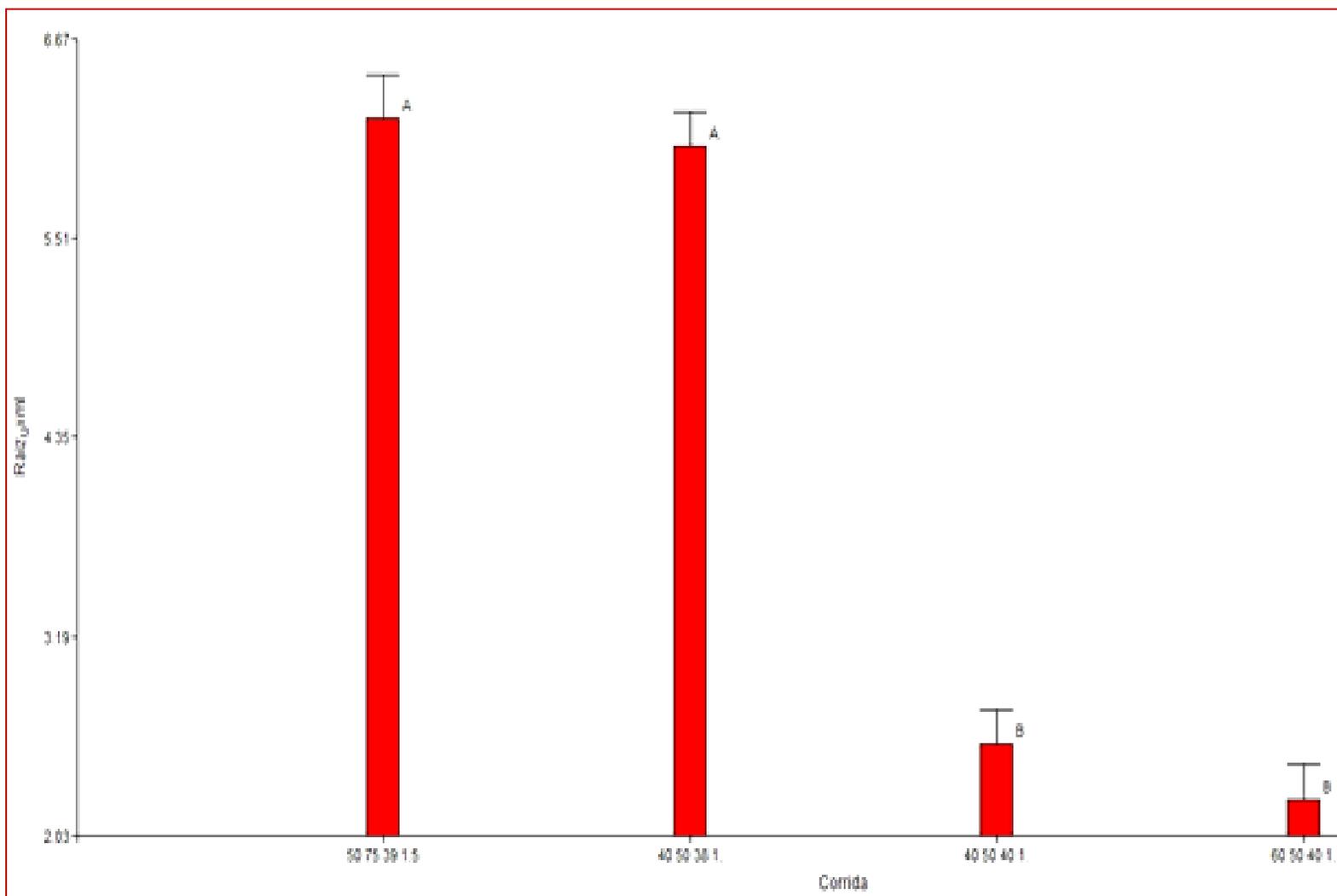


Figura 22. Cepa X5C & Raíz U/ml, cepa que al igual que la X5CD el mejor tratamiento es de **50 g/l de Levadura Torula, 75 g/l de melaza, 1.5 g/l de Ca y 39 °C**

4. En la tabla generada por el software estadístico *InfoStat* se puede observar del análisis ANOVA DCA de particiones en el que se obtiene el mejor medio para las dos mejores de las tres cepas estudiadas, con un p-valor mayor a $\alpha = 0.05$. En la tabla se presentan Medias con letras mayúsculas, las letras comunes no son significativamente diferentes. La letra A corresponde al mejor tratamiento, con una media de la AE más alta.

El resultado del análisis estadístico es *que existe un efecto significativo* del tratamiento *medio de cultivo*, sobre la variable respuesta *Actividad Enzimática.*, lo cual se evidencia con un $p = 0.0001$, (probabilidad aleatoria del suceso), que resultó ser **menor** que el nivel crítico de comparación, nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$. Esto quiere decir que la respuesta estadística es significativa, lo cual demostró que existe una relación de causa-efecto de la composición del medio de cultivo probado y la temperatura de crecimiento sobre la variable respuesta *Actividad Enzimática U/ml* para cada cepa estudiada. Siendo que con el análisis con interacciones se comprobó que no hay diferencia significativa entre las cepas, por lo que se puede seleccionar la cepa de mayor AE, en esta investigación *se selecciona X_2 para continuar la investigación in silico.*

8.1.12. Resultados de las corridas a Escala de Laboratorio (cepa seleccionada con medio optimizado).

El experimento se realizó por triplicado, Las mediciones se comenzaron a las 2 pm y se tomaron cada dos horas hasta las 12 de la noche. Después se comenzaron de nuevo las muestras a las 6 am, finalizando a las 2 pm, con lo que se completó el ciclo de 24 horas. Los resultados se presenta promedios obtenidos en las corridas se muestran a continuación (Figura 24 y 25)).

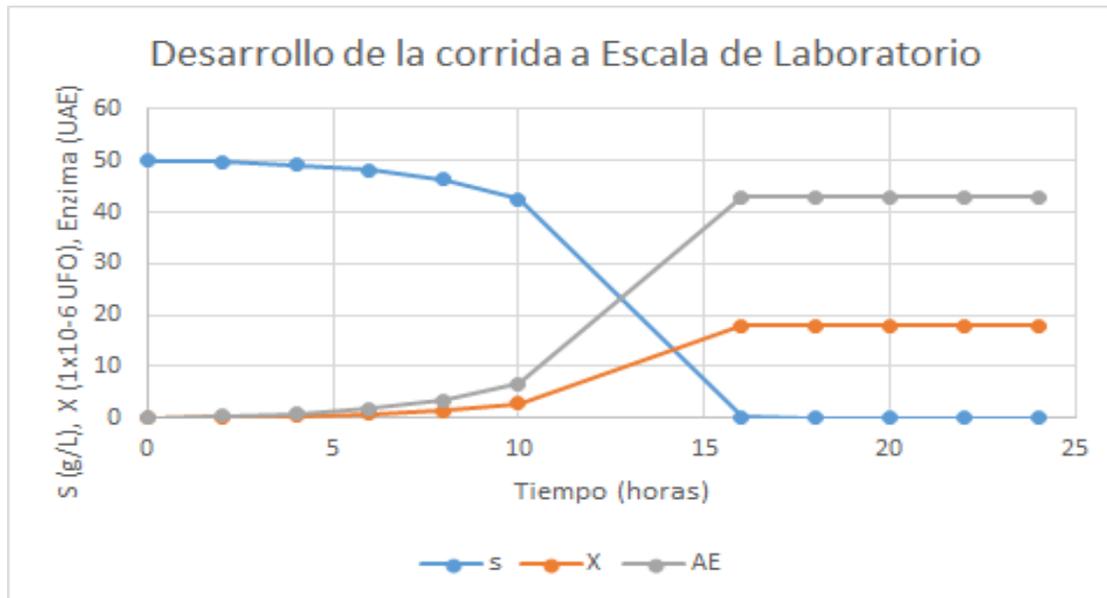


Figura 23. Evolución de la corrida de producción de ECE a Escala de Laboratorio.

Resultados de la corrida a escala de laboratorio con el medio definido

t	s	x	AE
0	50	0.1	0
2	49.7	0.2	0.5
6	49.2	0.4	0.9
8	48.2	0	1.8
10	46.3	7	34
16	42.6	1.4	6.6
18	0.3	2.8	42.9
20	0	18	42.9
22	0	18	42.9
24	0	18	42.9

t: Tiempo en horas

S: Sustrato limitante

X: células UFC

AE: Unidades de Actividad enzimática

Composición del medio

1. Miel final
2. Solución digerida de amino de nitrógeno
3. Autolizado de levadura
4. Cloruro de Calcio
5. Cloruro de sodio
6. pH 7.5 ajustado con Na OH
7. Utilizar agua desilada o suavizada

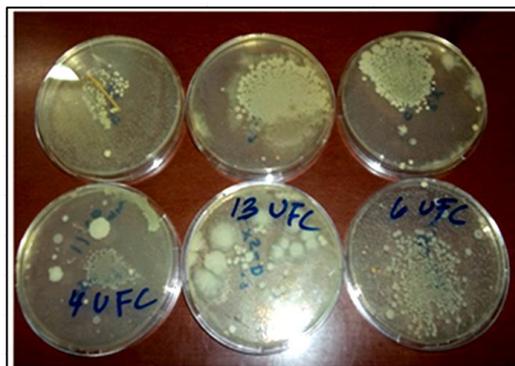


Figura 24. Datos experimentales con el medio seleccionado

El resultado final de la fermentación fue un contenido de *células* (X) de $18 \cdot 10^{-6}$ UFO, una *Actividad Enzimática* (UAE) de 43.3 una concentración celular de $1.8 \cdot 10^7$, y un consumo completo del Sustrato Limitante (S), la fuente de azúcar. Con estos datos se trabajará más adelante en el *Escalado* y la *Modelación*.

En la tabla 19, se presenta el resultado del estudio cinético de la capacidad de la cepa de hidrolizar la caseína. Se observó un halo de hidrólisis en la cepa X₂-10, con 20 mm a las 24 horas de incubación. La capacidad proteolítica de las cepas se reconoció mediante la medición de halos alrededor del inóculo.

Tabla 19. Halo de hidrolisis de caseína del crecimiento a las 24 horas.

Cepa	Halo de hidrolisis (mm)
X2	20

8.2. Fase de Simulación Escalado de la Producción del ECE in silico

8.2.1. Escala de Banco

Teniendo en cuenta que, para evitar la complejidad de los Modelos Matemáticos a desarrollar mediante *STELLA* y *Berkeley Madonna*, se recomienda considerar que *no hay limitaciones en la transferencia de oxígeno* (Roberto A. González Castellanos, 2014), resulta de especial importancia determinar los parámetros de *agitación* y *aireación* en cada una de las *Escalas*, que aseguren la Transferencia de Oxígeno adecuada, de manera de cumplir con este requisito.

Para determinar esos parámetros, se *comienza con la definición del nivel de aireación requerido* en cada Etapa y después se calcula la *agitación* correspondiente (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b). Para las demás Etapas de Escalado, para el cálculo de la *aireación* se utilizará, según lo analizado previamente en *Materiales y Métodos*, el criterio de *mantener constante el Coeficiente de*

Transferencia de Oxígeno (k_{La}), con igual Velocidad Superficial del Aire (vs), a partir del k_{La} obtenido en la Escala de Banco.

Ahora bien, en el caso de la *Escala de Banco* no se cuenta con el valor de k_{La} de la escala anterior, ya que esa variable no se pudo determinar durante las corridas a *Escala de Laboratorio*. Inicialmente se consideró calcularla a partir de correlaciones encontradas en la literatura (Heiner Giese, 2014) (Wolf Klöckner et al., 2007), pero finalmente se halló una correlación gráfica para determinar el k_{La} en matraces de vidrio convencionales, comparándolos con matraces de policarbonato de un solo uso. El experimento se hizo con un volumen del matraz de 250 ml, volumen de llenado 50 ml, temperatura de 37°C y diámetro de agitación de 5 cm (Wolf Klöckner, Sylvia Diederichs, & Jochen Büchs, 2015). La correlación se muestra más abajo (Figura 26).

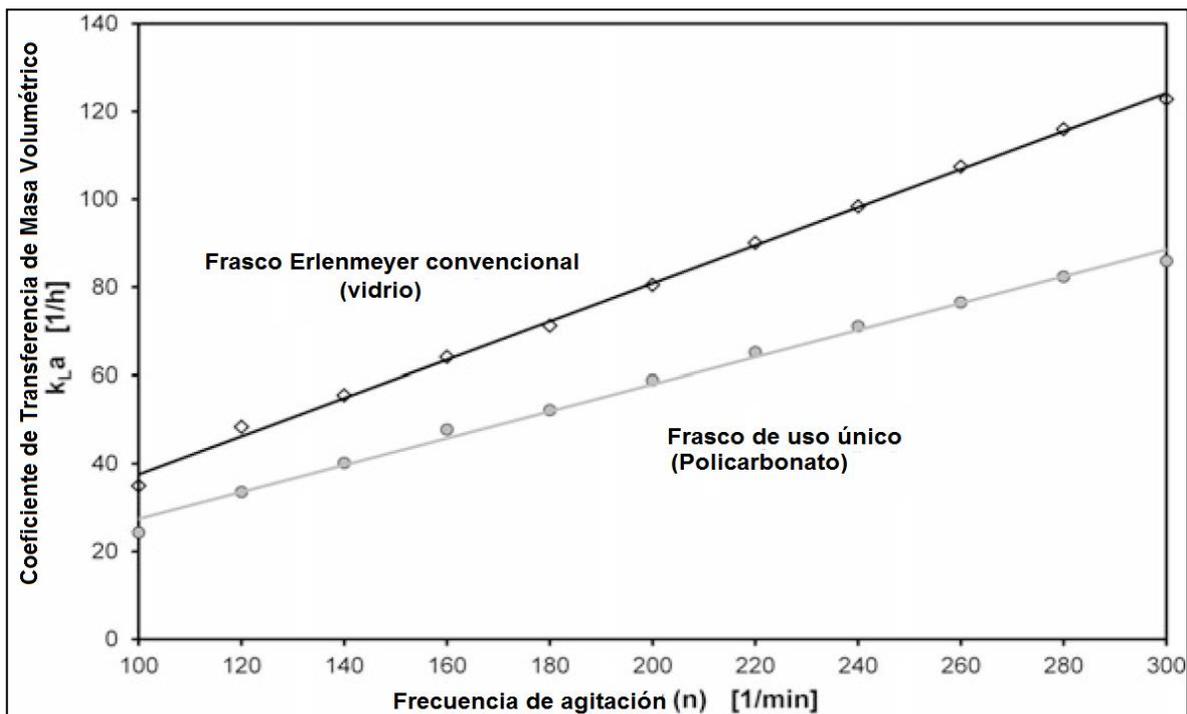


Figura 25. Determinación del k_{La} en Agitadores Orbitales Rotatorios, en función de la velocidad de agitación. Se comparan los clásicos de cristal con los desechables de policarbonato.

El valor obtenido con esa correlación, aproximadamente 60 h^{-1} , resulta muy pequeño, si se tiene en cuenta que en la búsqueda bibliográfica que se hizo sobre el coeficiente mínimo necesario para garantizar el crecimiento del microorganismo, se obtuvo que normalmente se requiere un k_{LA} de 250 h^{-1} para las fermentaciones con bacterias es y que, en el caso específico del proceso de producción de la *proteasa subtilisina* con el *Bacillus subtilis*, el k_{LA} requerido es de 237 h^{-1} (Roberto A. González Castellanos, 2014). Esta diferencia entre el k_{LA} obtenido a *Escala de Laboratorio* con el requerido para el crecimiento normal en las siguientes escalas resulta lógica, ya que nunca se puede obtener a *Escala de Laboratorio* el mismo rendimiento que en el resto de las escalas. A manera de ejemplo, se tiene que, en las experiencias en Cuba se obtuvo 28 UAE con las corridas con Agitador Orbital Rotatorio, mientras que en la Escala de Banco la actividad alcanzó 95 UAE (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009). Esta diferencia sólo se explica porque el *Agitador*, que no tiene aireación, se obtiene un menor coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{LA}) que los Fermentadores Tipo Tanque Agitado con aireación. Por lo tanto, para el escalado hasta la *Escala de Banco*, se tomará como base el valor de k_{LA} obtenido de la literatura (250 h^{-1}).

Para determinar la *agitación*, se comienza por definir la geometría de los equipos que se utilizarán en las distintas escalas, a partir de las dimensiones de referencia estándar definidas en Materiales y Métodos y teniendo en cuenta los equipos utilizados en los trabajos de referencia. En todos los casos la agitación se realizó con impelentes tipo turbinas *Rushton* de 6 paletas, con una relación constante $T/D=3$ donde, como se aprecia más abajo (Tabla 20), T es el diámetro del Fermentador y D es el diámetro del impelente (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009).

El criterio a utilizar, basado en la recomendación de Materiales y Métodos es el de mantener constante la Potencia por unidad de volumen (P/V) lo cual, en este caso, equivale es equivalente a mantener constante el Coeficiente de Transferencia de Masa (k_{LA}), puesto que el Escalado de la Aireación se hará considerando constante el *Flujo Volumétrico de Aire por Volumen de Reactor* (Q/V

= vvm). En el caso particular de la *Escala de Banco*, no hay otra alternativa que tomar como punto de partida el valor de agitación y aireación obtenidos en los trabajos de referencia, que son: **1.5 vvm** y **570 rpm** (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009). A partir de esos datos, se realizará entonces el Escalado para el resto de las Escalas de Producción previstas.

Tabla 20. Dimensiones geométricas de los Fermentadores a utilizar en el Escalado del proceso de producción de ECE.

Escala	Volumen \underline{V} (L)	Diámetro Tanque - \underline{T} (m)	Diámetro Impelente - \underline{D} (m)	Altura efectiva - \underline{H} (m)
Banco	5	0.470	0.049	0.206
Piloto (1)	20	0.235	0.078	0.329
Piloto (2)	100	0.399	0.135	0.559
Demostrativa	340	0.557	0.186	0.708
Industrial	1,600	1.070	0.357	1.498

8.2.2. Escalado de la Escala de Banco a la Escala Piloto

Como se definió anteriormente, el flujo de aire se escalará considerando *mantener constante el Coeficiente de Transferencia de Oxígeno ($k_L a$)*, para lo cual se aplica la siguiente:

- *Ecuación de Escala para aireación* (Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b):

$$vvm_2 = vvm_1 \left(\frac{H_{I2}}{H_{I1}} \right)^{-2/3}$$

Sustituyendo se tiene:

$$vvm_2 = 1.5 \left(\frac{0.559}{0.329} \right)^{-2/3}$$

Efectuando se obtiene:

$$vvm_2 = 1.1$$

- *Ecuación de Escala para agitación.*(Roberto A. Gonzalez Castellanos, 2018b)

Como se analizó en la introducción, escalar a igual P/V equivalen a escalar a igual **kla**, cuando es Escalado se ha hecho manteniendo constante las **vvm**. Por lo tanto, la Ecuación de Escalado a utilizar será:

$$N_2 = N_1 \left(\frac{D_1}{D_2} \right)^{2/3}$$

Sustituyendo y efectuando se obtiene: $N_2 = 420 \text{ rpm}$

8.2.3. Escalado de las Escalas Pilotos hasta la Escala Industrial

Se repite el proceso con las demás Escalas y el resumen se brinda a continuación (Tabla 21).

Tabla 21. Resumen del Escalado de los Fermentadores desde el Banco hasta la Industria.

Escala	Aireación (vvm)	Agitación (N)
Banco	2.5	570
Piloto (1)	1.1	420
Piloto (2)	0.8	290
Demostrativa	0.7	200
Industrial	0.4	160

8.2.4. Modelación Matemática de la Producción de ECE

8.2.4.1. Desarrollo del Modelo

Planteamiento del Modelo

- Los componentes dentro del Biorreactor (**S**, **X** y **V**) son los tres **Stocks** del modelo (el cuarto **Stock** sería el volumen **V** del Biorreactor, pero no se considera porque en el *Cultivo Discontinuo* permanece constante).
- Los convertidores son las constantes cinéticas: μ_{max} , K_s , Y_{xs} , Alfa , Beta , K_i , Y_{ps} , md , También se incluyen dos convertidores especiales para las expresiones cinéticas, uno para el cálculo de μ mediante la **Ecuación de Haldane** y otro para el cálculo de r_P mediante la **Ecuación de Luedeking-Piret**.
- El balance de sustrato es: $dS/dt = -r_S = X/Y_{XS}$
- El Balance de células es: $dX/dt = r_X = \mu * X$

- El Balance de Producto es: $dP/dt = rP$

Nota para la ecuación del Balance de Sustrato: En **STELLA** los flujos no pueden ser negativos. Finalmente, el signo sale en el balance en el **Stock**. Si se coloca el signo (-) en la ecuación del balance de Sustrato, **STELLA** le da el valor cero a la ecuación,

Con esta información resumen se puede comenzar a conformar el Modelo de Biorreactor. Para el Modelo se hacen uso de dos propiedades de **STELLA** que no se habían explicado: el trabajo en Sectores, lo que es muy útil para sistemas más complejos, ya que permite poner a punto cada Sector por separado. En este caso el Modelo es simple y no es imprescindible usar sectores, pero se dejó de esa forma como ejemplo para modelos futuros. El uso de los Sectores llevó a usar otra peculiaridad de **STELLA**, los “*ghosts*” (*fantasmas*), que representan en un Sector, un elemento del Modelo que está en otro Sector, para evitar líneas de comunicación muy largas entre un sector y otro, con lo cual se simplifica el modelo. Los *ghosts* se representan con el borde discontinuo y puede ser un *conversor* o un *Stock*.

Más abajo, el diagrama del Modelo en **STELLA** (Figura 27, izquierda). Note el “*fantasma*” de rX en el Sector de Sustrato; de X y μ en el de Productos y de S en el de Células. En esa misma figura, a la derecha, se muestran la relación de las principales variables, que han surgido del planteamiento del modelo, sin que haya sido necesario que se definan por el usuario. A continuación, se muestran el gráfico de las variables en la corrida del **STELLA** (Figura 28). Como se puede apreciar, la forma en que presenta los gráficos **STELLA** no es muy adecuada, aunque puede ajustarse. Pero de todas formas lo mejor es pasar las ecuaciones a **Berkeley Madonna** y seguir con ese software, el cual tiene posibilidades de mejores análisis gráficos y además de hacer otras funciones como *Ajustes de Curvas*, *Análisis Paramétrico*, *Análisis de Sensibilidad*, etc.

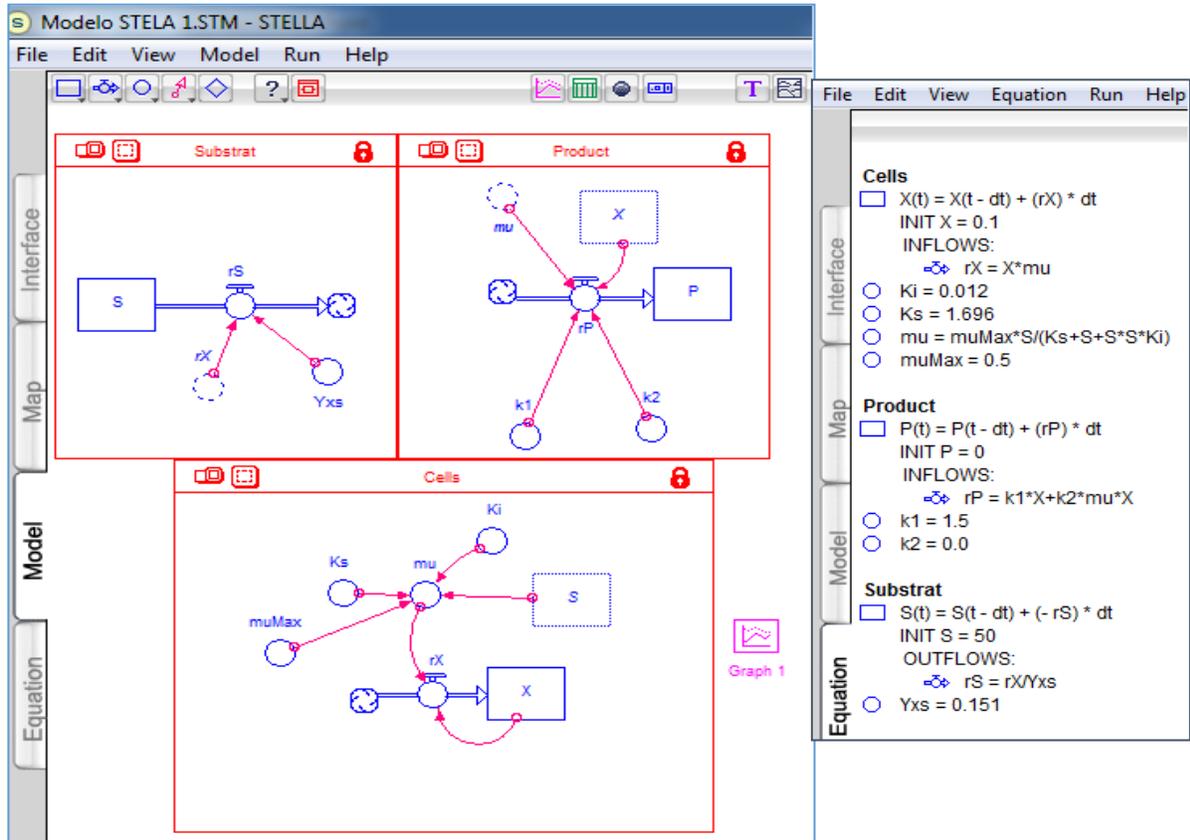


Figura 26. Modelo del Birreactor en STELLA. (Izquierda); Ecuaciones del modelo (derecha).

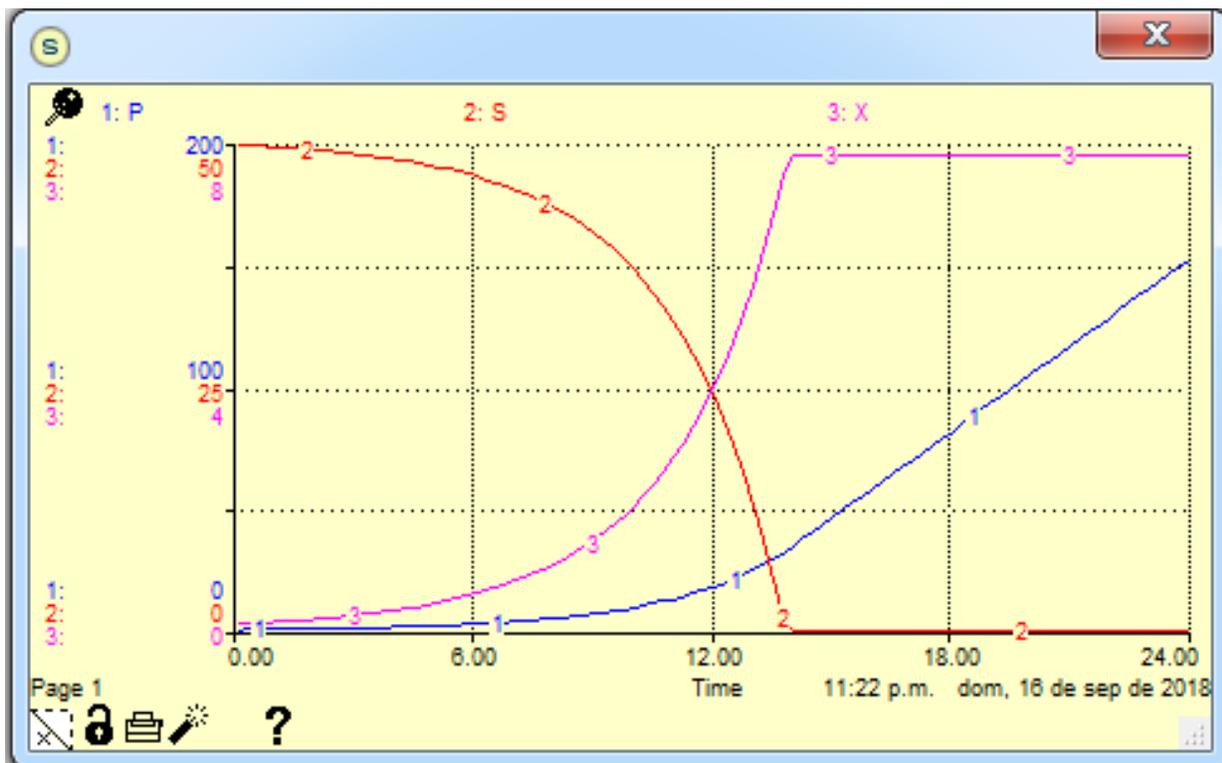


Figura 27. Gráfico de los principales parámetros de las corridas en STELLA.

El paso siguiente es llevar las ecuaciones de *STELLA* al *Berkeley Madonna*. Cuando el modelo es muy complejo, se debe ajustar el formato de las ecuaciones de *STELLA* para que se adapte mejor a los requerimientos de *Berkeley Madonna*, pero en la mayoría de los casos *Berkeley Madonna* puede asimilar directamente los modelos que genera *STELLA*, ya que precisamente fue creado para acelerar la corrida de los modelos desarrollados en *STELLA* (Diane Hoffoss, 2013). La importancia de este trabajo combinado es que *STELLA* permite generar ecuaciones diferenciales e integrarlas, sin que tengamos que pensar en la parte matemática del problema. Solamente tenemos que dibujar los iconos correspondientes, interconectarlos y dar los valores de entrada. *STELLA* produce entonces sus ecuaciones, las que se pasan de inmediato a *Berkeley Madonna*, que las puede procesar mucho mejor.

A continuación, se muestra el resultado de correr en *Madonna* las ecuaciones de *STELLA* (Figura 29). Observe como en la misma pantalla se tienen las ecuaciones y un gráfico (pudieran ser muchos más a la vez) y en el gráfico está la Leyenda y los Parámetros. También se cuenta con la ventana que permite cambiar los distintos parámetros de la simulación (Robert Macey et al., 2009, p. 2) (Diane Hoffoss, 2013).

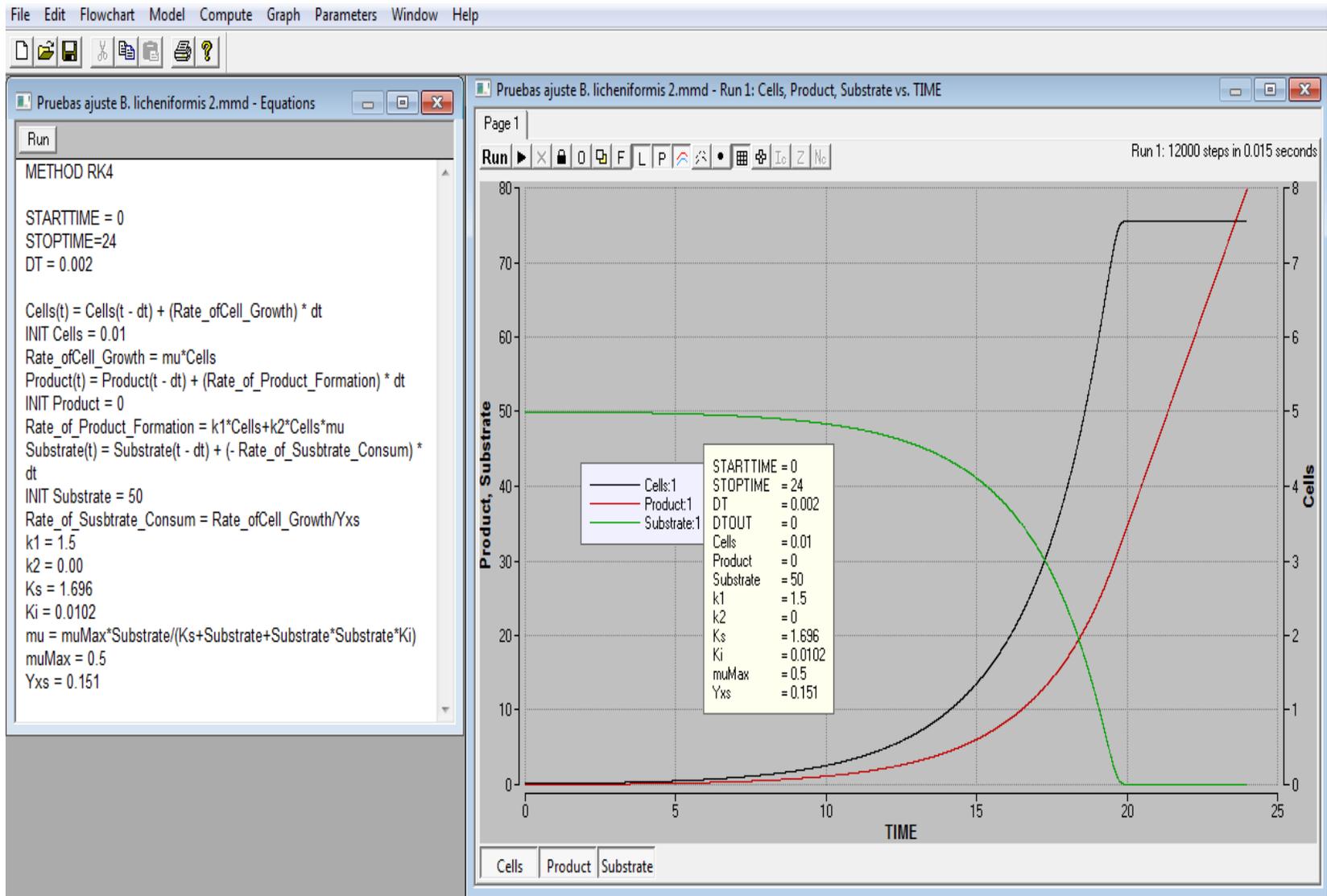


Figura 28. Resultado de la corrida, de las ecuaciones de STELLA, en Berkeley Madonna.

8.2.4.2. Ajuste del modelo

El modelo se corrió con coeficientes preliminares. Se requiere entonces ajustar los modelos para que cumpla con los resultados de la *Escala de Laboratorio*. En este aspecto hay que tener en cuenta que el ajuste obtenido no será el definitivo, ya que a partir de la *Escala de Banco* los resultados van a variar y por lo tanto va a ser necesario un nuevo ajuste. De todas formas, es importante contar con un primer ajuste, ya que no se espera que cambie mucho en un futuro y además resulta una herramienta muy importante para continuar el proceso de *Escalado de la Producción*.

Como se mencionó anteriormente, aunque hay muchas formas de lograr el ajuste de los coeficientes cinéticos, como se explicó en Materiales y Métodos, se decidió llevar a cabo el ajuste inicial con la función “*Curve Fitting*” de **Berkeley Madonna**. Para esto se requiere primero convertir los datos de salida de la corrida a *Escala de Laboratorio*, que es un fichero **Excel** de dos columnas en formato *csv*, con el nombre de la variable precedido del signo # o también un simple fichero *.txt*. Por ejemplo, #X, será el fichero que contenga los valores de X en el tiempo. De igual forma se procede con el tiempo, Sustrato (S) y Enzima (UAE). Esos ficheros constituyen una función lineal por tramos, que utiliza Madonna para ajustar el modelo con los datos experimentales. Por lo tanto, en base a los datos suministrados, **Berkeley Madonna** calcula los resultados mediante interpolación lineal de los puntos cercanos.

Los resultados de la corrida inicial de Madonna, con los valores cinéticos estimados, se mostró más arriba (Figura 29). Continúa el proceso, cargando en Madonna los “*Datasets*”, o sea con los ficheros de ajuste con los datos experimentales, y se repite la simulación. Más abajo se muestra el

resultado (Figura 30), donde se aprecia la gran diferencia entre los datos de la corrida inicial y los datos experimentales. A partir de este momento, comienza el proceso de “*Cuve Fit*” en *Madonna*.

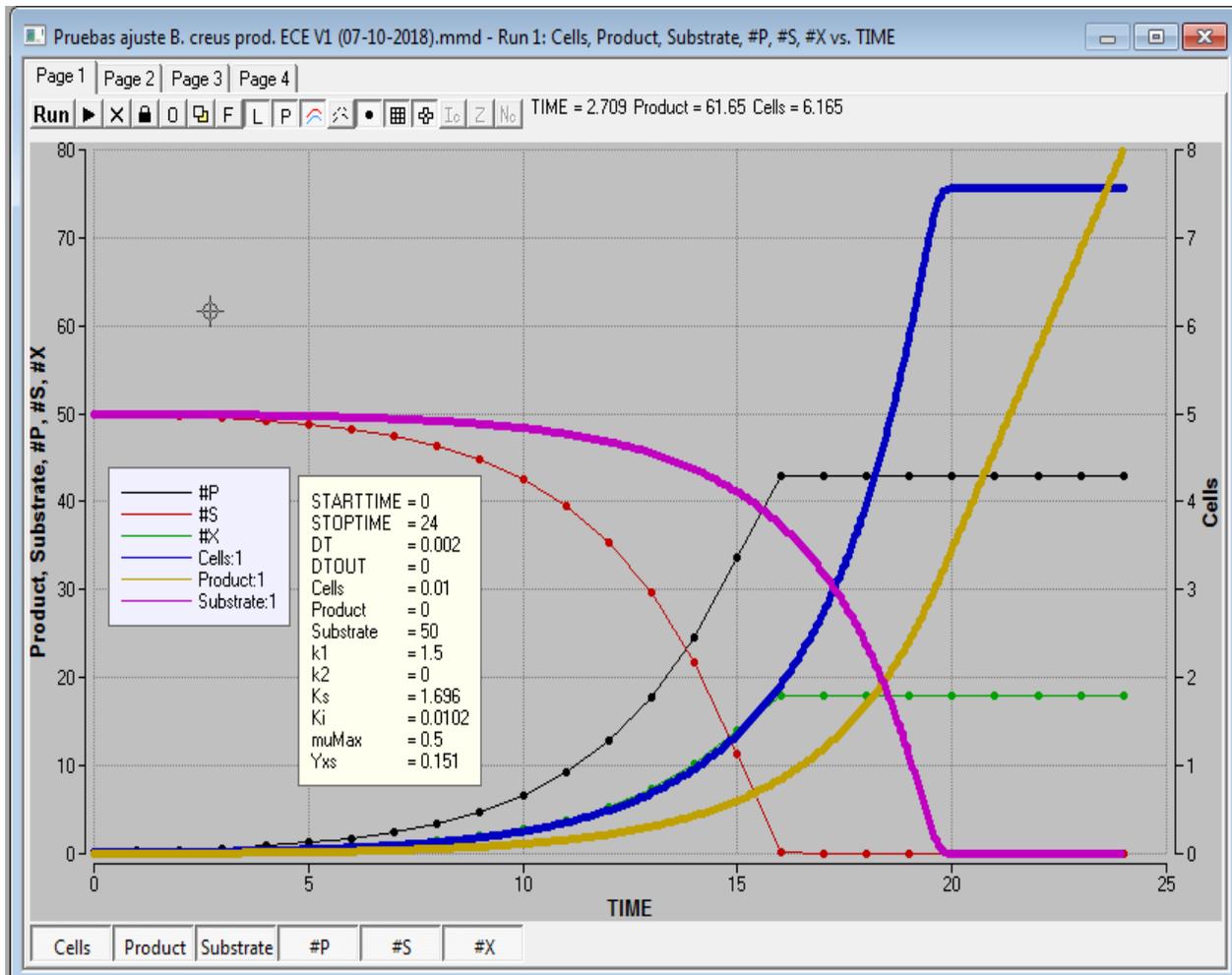


Figura 29. Corrida del Madonna con los coeficientes cinéticos aproximados y los datos experimentales.

Para el proceso de ajuste se seleccionan los parámetros a modificar, su rango de valores máximos y mínimos y el parámetro que deben ajustar. Se comenzará ajustado X y se seleccionan dos parámetros para ajustar en el modelo: μ_{max} y K_s , para los cuales se definen los valores máximos y mínimos y se dan dos valores de tanteo. En un primer ajuste, sólo con X , no se logra un resultado aceptable. Se hacen también ajuste con los otros parámetros y, después de varias pruebas, se obtiene un muy buen ajuste. A continuación (Figura 31), se muestra gráficamente el resultado de la última corrida. En el gráfico se aprecian los coeficientes cinéticos que quedaron después del ajuste. Nótese

la gran diferencia entre los resultados de la corrida inicial y la corrida después del ajuste. De esta forma se da por terminado el ajuste del modelo a los resultados de la Escala de Laboratorio.

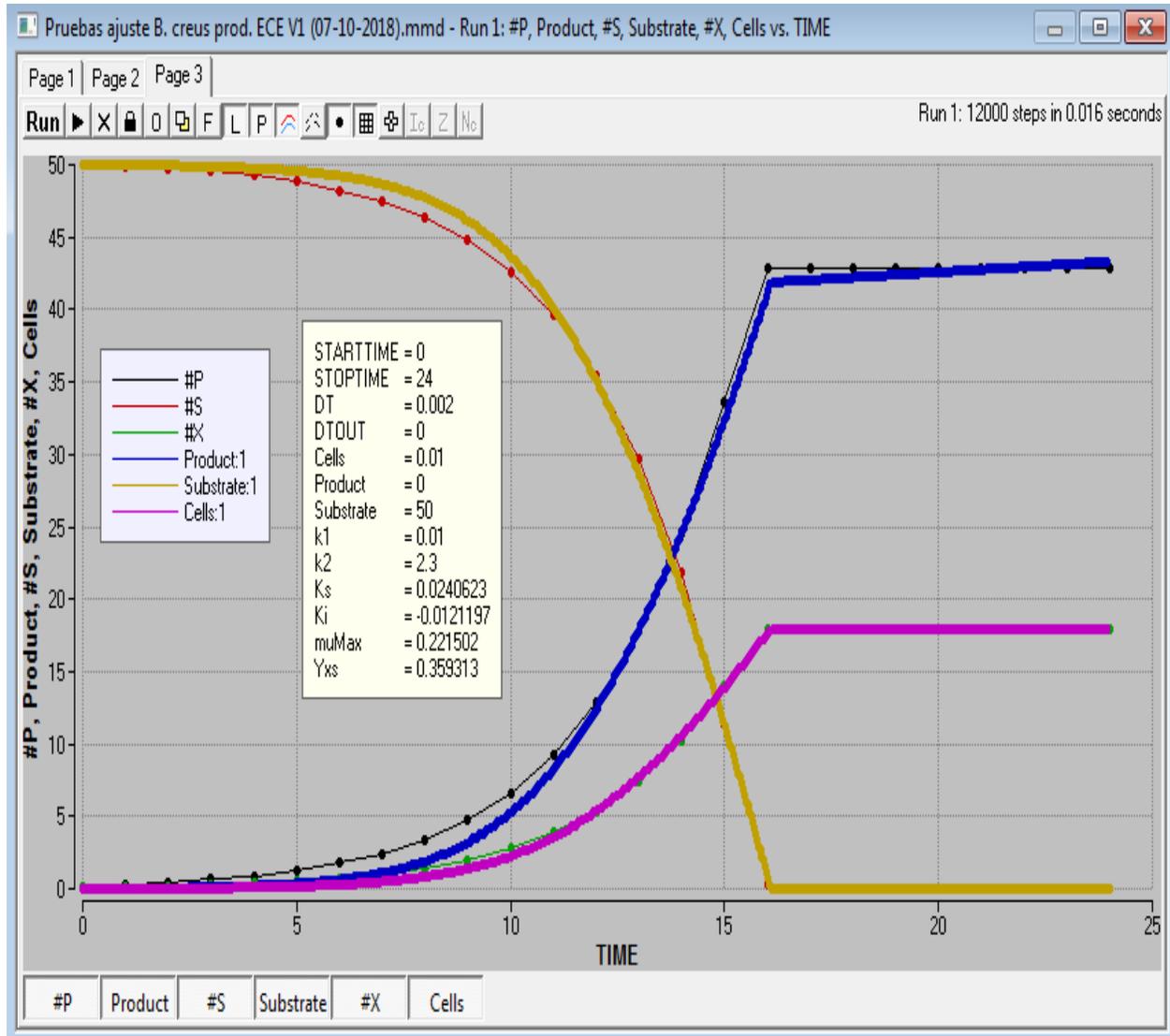


Figura 30. Resultado de la corrida del Madonna con los coeficientes. obtenidos con el Curve Fitting.

8.2.5. Modelación Matemática de la producción del Hidrolizado de Levaduras (HL)

8.2.5.1. Definición del Proceso Tecnológico

Para la definición del proceso tecnológico se parte del proceso desarrollado por la autora, en unión del Dr. Roberto A. González Castellanos y otros colaboradores, en el Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBiot) de la UPOLI, para el hidrolizado básico de la crema de levadura (Roberto A. Gonzalez Castellanos, Raúl E. Piad Barreras, Elda A. Gonzalez, Charlie Tinoco Mccrea, & Arlen María Gutiérrez, 2015), se adapta dicho proceso para el hidrolizado enzimático y se amplía para el aprovechamiento total de los productos de la hidrólisis. De esta forma se incluye como producto el extracto de levadura, además del concentrado de mananos y glucanos, que era el único producto del proceso original. El esquema general del proceso se describe más abajo (Figura 66). Este diagrama servirá posteriormente de base, para la elaboración del *Diagrama de Flujo de Proceso (FPD*, por sus siglas en inglés), el cual se desarrollará mediante el uso del *Simulador de Procesos Biotecnológicos SuperPro Designer (SPD)* (Intelligen Inc., 2013).

Con relación al tamaño del biorreactor de hidrólisis, se parte de las experiencias anteriores de Hidrólisis Enzimática de Levadura en Cuba, en las cuales, a diferencia de la que se proyecta en esta Tesis, se obtenía un producto crudo sin separar. El volumen de los equipos utilizados en ese proceso fue de 10L (*Escala de Banco*), 20 L(*Escala Piloto*) y 100 Litros (*Escala Demostrativa*) (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009). Considerando que en esta Tesis se ha proyectará la producción de hidrolizado a *Escala Piloto* y considerando también las experiencias de los hidrolizados básicos realizados en el CEBiot (Roberto A. Gonzalez Castellanos et al., 2015), se seleccionó un Biorreactor con volumen de 40 Litros (**20 L *fectivos***), para llevar a cabo este proceso a Escala Piloto, con un nivel apreciable de producción.

Una ventaja de este proceso es que, como la cantidad de *ECE* necesaria para producir la hidrólisis es un *5% del volumen de crema de levadura* (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009), sólo se necesita *1 L de ECE para realizar la hidrólisis*, lo que se puede hacer sin problemas a *Escala de Laboratorio*, con un *Agitador Orbital Rotatorio*. De esa forma se evita la necesidad de contar con biorreactores para realizar el cultivo aeróbico de la cepa de bacilo, lo que significaría una inversión mayor y mayor complejidad operacional. La producción del *ECE* a mayor escala, sólo sería necesaria para la *producción Industrial* del *HL*.

Más abajo se detalla el proceso de producción de hidrolizado, según el esquema elaborado (Figura 32):

8.2.5.2. Preparación de la materia prima

a. Metodología para la obtención de la Materia Prima

- La materia prima es la levadura residual de cervecería. Es práctica común en las industrias cerveceras que la levadura que se adiciona a los tanques de fermentación se utilice de tres a cuatro ciclos, posteriormente se considera agotada y se desecha. Ese desecho, conocido como crema de levadura, es la materia prima de este proceso.
- Antes de extraer el residuo es necesario asegurar que haya estado varias horas en reposo, de manera que decante y de esa forma se obtenga el mayor contenido posible de células de levadura en el residuo.
- El residuo se extrae de los tanques de fermentación por bombeo o por gravedad y debe colectarse en recipientes preferentemente de material plástico.

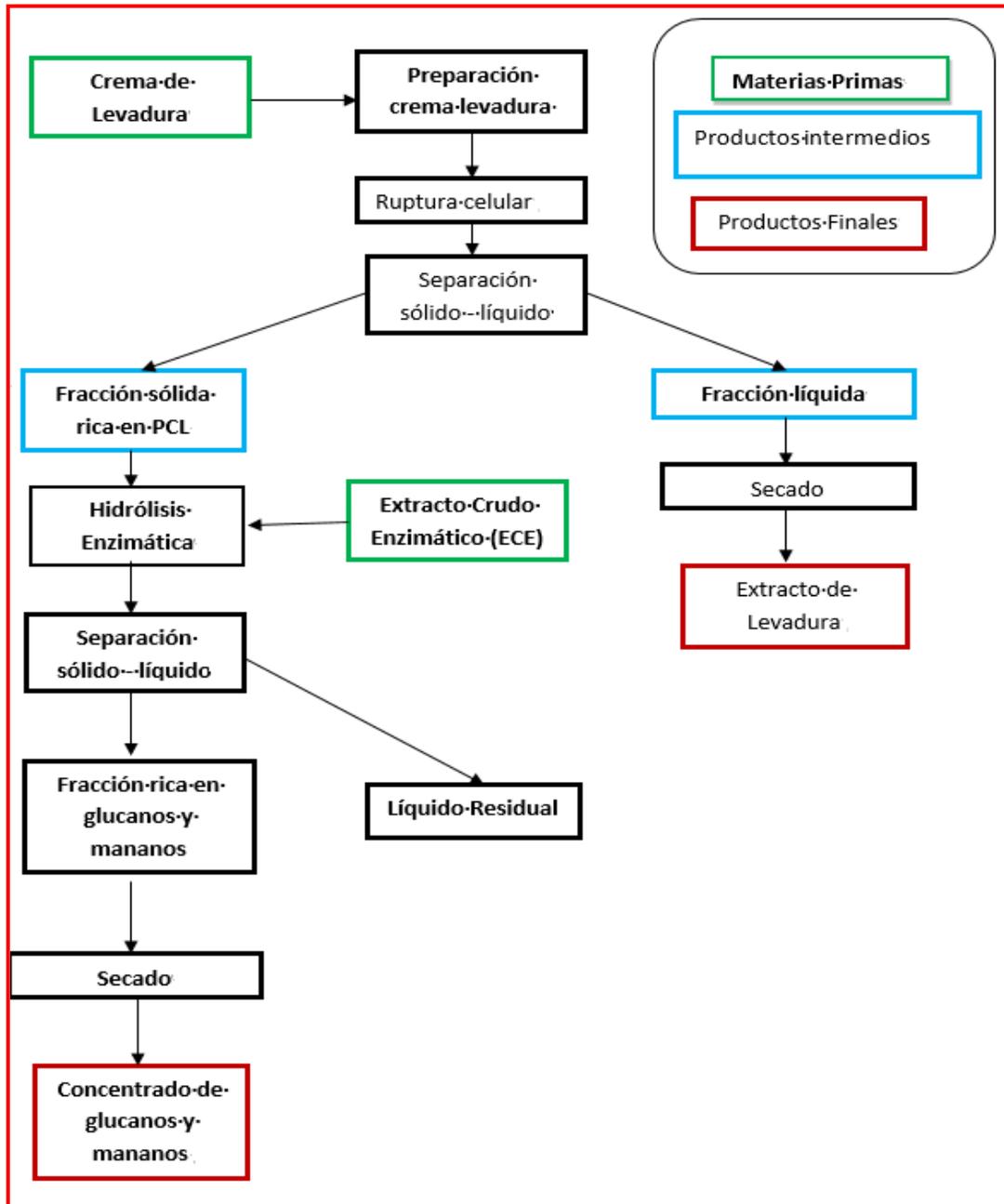


Figura 31. Esquema del proceso de hidrólisis enzimática de levadura (HL), con aprovechamiento total de los productos derivados.

b. Decantación

- Decantar la crema residual de levadura en los mismos recipientes en los que se colectaron por 12 horas y eliminar el sobrenadante de los recipientes.

c. *Procedimiento para el Lavado*

- Medir el volumen de la levadura semisólida resultante de la decantación y añadir 2 litros de agua por cada litro de levadura semisólida. Esa operación se realizará en recipientes adecuadamente esterilizados.
- Mezclar el agua y la levadura. Para asegurar la calidad del proceso se recomienda utilizar un tanque con agitación).

d. *Separar el producto por decantación*

e. *Ajuste del contenido de materia seca*

- Tomar muestras de la levadura semisólida ya lavada y determinar su contenido en materia seca.
- Ajustar el contenido de materia seca al 20%, añadiendo la cantidad de agua destilada que sea necesaria.

f. *Ruptura Celular*

- Utilizar un equipo para ruptura celular, que puede ser un molino de bolas

g. *Separación sólido - líquido*

- *Decantar* la crema para obtener una *fracción sólida con las paredes celulares de levadura* y una *fracción líquida con el Extracto de Levadura*.

h. *Tratamiento de la fracción líquida*

- *Secador* para la fracción líquida, para obtener el primer producto de la tecnología: ***El Extracto de Levadura***.

8.2.5.3. Tratamiento de la fracción sólida (Paredes Celulares de Levadura)

a. Hidrólisis

- Paso previo: Ajustar la fracción semisólida, mediante adición de agua destilada, para que alcance un 20% de materia seca.
- Utilizar el Biorreactor de 40 L con control de temperatura y agitación, para realizar la hidrólisis
- Introducir en el biorreactor los 20 L de crema de levadura ya preparadas
- Añadir a la suspensión de paredes celulares de levadura 5% en volumen del *ECE* y un 3% de sal común
- Ajustar pH entre 5.5 y 6.0, mediante la adición de NaOH al 40%
- Ajustar la temperatura entre 45 – 50° C
- Mantener el proceso durante 15 horas, con agitación.

b. Separación sólido líquido

- Sedimentar el producto para separar dos fracciones: *Fracción sólida (rica en glucanos y mananos*⁹ *y fracción líquida residual.*

c. Tratamiento de la fracción sólida rica en glucanos

- Secar la fracción sólida y se obtiene el segundo producto de la tecnología: ***El concentrado en Glucanos.***

8.2.6. Elaboración del Diagrama del Flujo de Proceso (PFD)

Para la elaboración del *PFD*, se considera el proceso de producción de *ECE* a *Escala de Laboratorio*, para lo cual se incluyó un *Agitador Orbital Rotatorio*, que está entre los equipos disponibles en el *SPD*. Para seleccionar el resto de los equipos, se tuvo en cuenta que el proceso se desarrolla a pequeña Escala (20 Litros) y que se necesitan que los equipos sean los más sencillos y

8.2.7. Definición del precio de venta del producto

Para que el SPD pueda realizar la evaluación económica del proyecto, se requiere definir el costo de la materia prima principal (crema de levadura residual de cervecería) y el precio de venta de los productos del proceso. Para determinar estos valores se comienza por revisar los valores definidos previamente en los perfiles y proyectos elaborados en el CEBiot, para la Planta de Derivados de Paredes Celulares de Levadura, basada en hidrólisis básica (Roberto A. Gonzalez Castellanos et al., 2015) (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009). En todos los documentos revisados se pudo apreciar que el precio de la crema de levadura es marginal, ya que es un residual que no tiene valor para la fábrica y se fijó, desde un inicio de los trabajos en la Escala de Laboratorio en US\$0.125/Kg.

Con relación al costo de producción del Hidrolizado, del análisis del Perfil del Proyecto para la Planta Piloto elaborado en enero 2011 se estimó, a partir de las experiencias de Laboratorio, un valor de **US\$9.00/Kg** y en todos los trabajos posteriores se ha mantenido ese mismo valor. Por su parte, para el precio de venta se fijó, en este trabajo, el valor de **US\$15.00/Kg**. Como referencia se tuvo que uno de los productos comerciales extranjeros similares, el **BioMos**, tenía un costo en México de **\$US64.00/Kg**.

Sin embargo, en un trabajo posterior, el Perfil del Proyecto para una Planta Industrial, de fecha 07-09-2011, se propuso un precio de venta entre **US\$15.00 y US\$20.00/kg** y, como referencia, se tomó que el **BioMos** tenía un costo en México de \$US35.00/Kg. Del análisis de ambos trabajos, no queda claro el motivo del cambio del estimado de costo del **BioMoss**. Por esta indefinición, se hizo necesario realizar nueva búsqueda bibliográfica y se obtuvo que el precio en Argentina de otro producto comercial similar (**Safmannan**) es de **US\$50/Kg**. (Alejandro Luis Soraci, Fabián Amando, María Belén Fernández Paggi, Juan J. Oneto Sorondo, & Lic. Horacio Gerde, 2015) y se decidió

tomar ese valor como costo internacional de referencia tope, ya que el producto nacional tiene que ser mucho más económico que el importado.

También se tuvo en cuenta que, en el Documento de Análisis Financiero del Proyecto de la Planta Piloto de Hidrólisis Básica, actualizado el 24-04-2015, se definió el precio de venta del producto en **US\$19.00**, durante el primer año de producción, a manera de promoción y en **US\$20.00/Kg** a partir del segundo año de producción. Teniendo en cuenta todos esos elementos, se decidió comenzar la Simulación con un precio de venta del concentrado de Glucanos y Mananos **US\$25.00/Kg**, y en **US\$22.00** el precio de venta del Concentrado de Extracto de Levadura. Posteriormente se realizará un Análisis de Sensibilidad del Proceso ante la variación de dicho precio, para definir finalmente el valor más conveniente, para asegurar una correcta eficiencia económica de la planta y a la vez un precio competitivo en el mercado.

8.2.8. Modelación del PFD

Los “**Procedures**” a utilizar en la simulación son: **Mixer (MX-101)** para representar el lavado de la levadura; **Mixer (MX-102)** para representar la dilución de la mezcla rica en PCL, para que esté en condiciones de ser hidrolizada; **Bead Milling (BM-10)**, para romper las células de levadura, separando los componentes del Extracto de Levadura (Compuestos Hidrosolubles, Lípidos, Ácidos Nucleicos y Proteínas) de las Paredes Celulares de Levadura (**PCL**), donde se concentran el Glucano y el Manano (María José Castañón Gonzalez, 2009). **Fermentor (FR-101)** para llevar a cabo la hidrólisis del producto, separando las PCL en Mananos y Glucanos. Para la separación sólido-líquido, **Decanter (V-101)** para eliminar el agua de lavado de la levadura; el **Decanter (V-102)** para separar la fracción con las Paredes Celulares de Levadura (PCL) de la fracción con el Extracto de Levadura. Para la separación de sólidos se utilizan secadores: **Tray Dryer (TDR 101)**, para obtener

el concentrado de Extracto de Levadura y el **Tray Dryer (TDR 103)**, para obtener el Concentrado de Glucanos y Mananos.

En cada uno de los equipos es necesario definir las operaciones a realizar y las características de las corrientes de entrada y salida, así como la información necesaria para que el SPD realice los balances de materiales y energía. A manera de ejemplo, presentaremos el proceso para el primer **Decantador, el V-101:**

Dar entrada a la Corriente de Entrada (S-101), que viene del equipo anterior (**Mezclador de Lavado MX-101**), con los datos siguientes: Flujo Másico de entrada, 120 kg/templa; Composición: 85.4 % agua y 14.6% Levadura.

Definir la eficiencia del Decantador , la que se fijó en este caso en 98% para el agua y 1 % para la levadura, tomando como base las experiencias de trabajos anteriores con la crema de levadura (Roberto A. Gonzalez Castellanos & Raúl E. Piad Barreras, 2009).

Obtener por balance la Corriente de Salida de Proceso S102, con el resultado de 19.4 kg/templa y una composición de 10.6% agua y 89.4% de levadura, que es la que pasa al siguiente equipo de proceso: **Ruptura Celular (BM-10)**.

Este procedimiento se repite con todos los equipos del **PFD**, con la única diferencia del **Fermentor (FR-101)**, el cual requiere además considerar la secuencia de operaciones que conforman este “Procedure” que son: **Transfer In**, en la que el equipo recibe la Corriente PCL proveniente del equipo **Mezclador MX-102, FERMENT 1**, que es la Fermentación Estequiométrica por Templá que produce la hidrólisis, la que necesita se le suministren los datos estequiométricos y el porcentaje en que se lleva a cabo la hidrólisis. Este equipo requiere, por lo tanto, definir los tiempos que

necesitan las tres operaciones que se realizan, para definir el tiempo total que se ocupa el equipo en cada templa.

Cuando se ha completado el proceso y se chequea que no hay errores de entrada de datos, se realiza la corrida del modelo y se obtienen los resultados.

8.2.9. Resultados de la Modelación

En el Anexo X, se muestran todos los Reportes que brinda el SPD, con los Balances de Materiales, Diagramas de GANTT del Uso de los Equipos en las Templas, Costos de Equipos, Costos de Operación y Análisis Económico del Proceso. A continuación, se muestran los resultados más relevantes:

Distribución diaria de los equipos: Más abajo (Figura 34) se muestra la distribución del tiempo por equipos en tres recetas completas, que se ejecutan en un periodo de 43 horas y después el Diagrama de GANTT del uso de equipos en las tres recetas completas (Figura 35).

Balance de materiales: Como resumen del Balance Completo de todo el proceso, se muestra el balance global por componentes, en kilogramos por templa (Tabla 22).

Nota: En las tablas 22, 23 y 24, los nombres están en inglés, puesto que son las que reporta directamente el SPD.

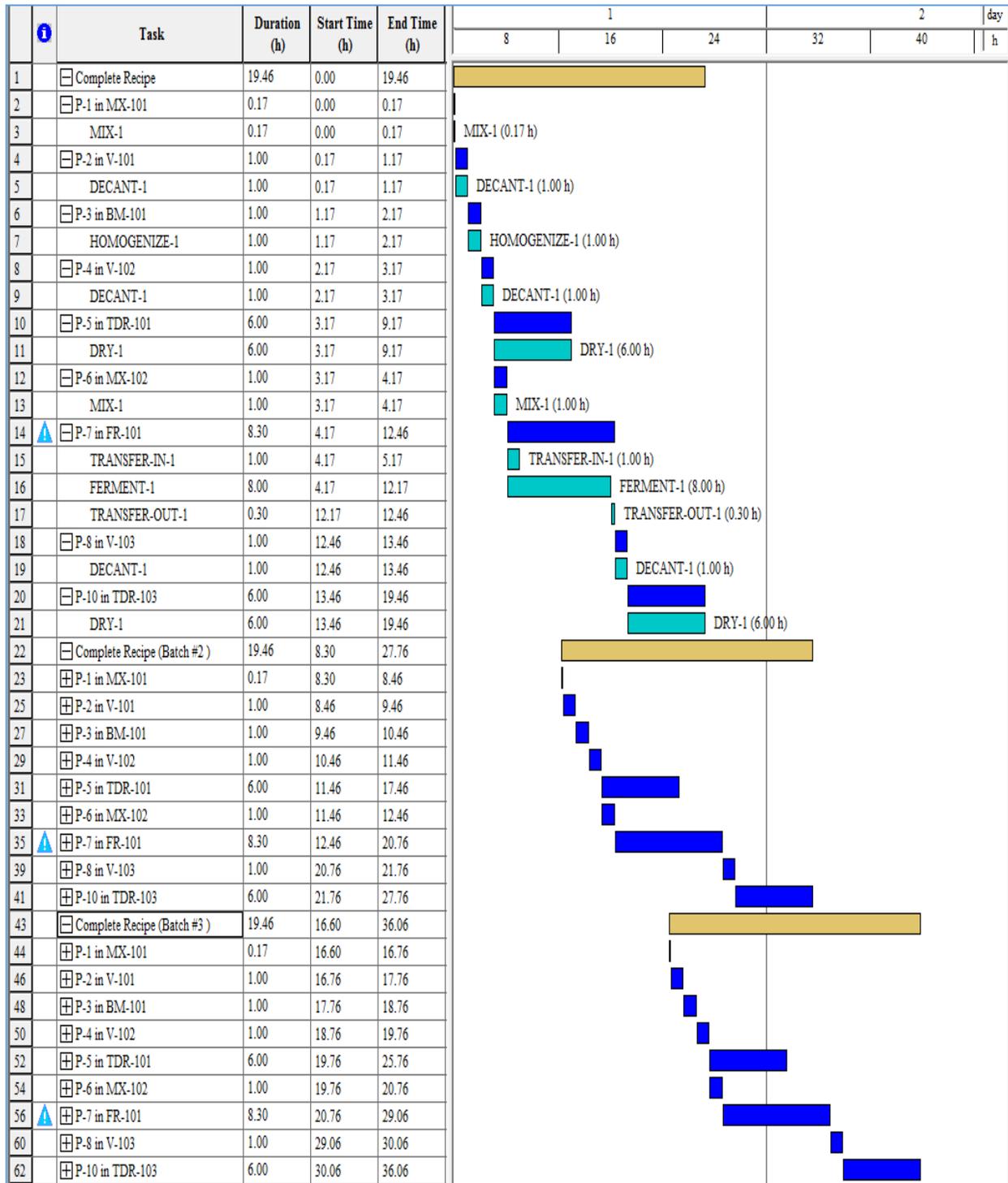


Figura 33. Diagrama de GANTT detallado del uso de los equipos, con la información del tiempo de duración de cada proceso y su correspondiente programación, (3 recetas completas en 43 horas).

Evaluación Económica: A manera de resumen de la Evaluación Económica del Proyecto, se presenta el Resumen Ejecutivo de la Evaluación Económica anual (Tabla 23) y el Flujo de Caja por 15 Años (Tabla 24).

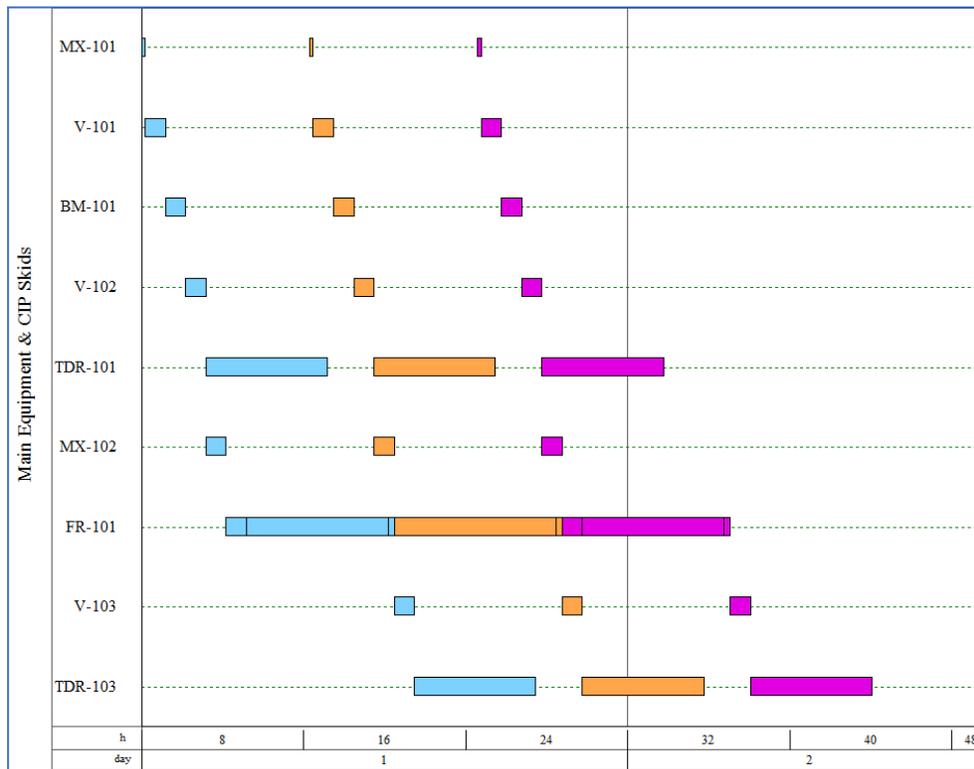


Figura 34. Diagrama de GANTT del uso de equipos en tres recetas completas.

Tabla 22. Balance global por componentes (kg x templa),

COMPONENT	INITIAL	INPUT	OUTPUT	FINAL	IN-OUT
Carbohidratos	0.000	0.000	0.085	0.000	- 0.085
Comp. Hidrosolu	0.000	0.000	0.858	0.000	- 0.858
Debris	0.000	0.000	0.025	0.000	- 0.025
Glucanos	0.000	0.000	1.719	0.000	- 1.719
Lípidos	0.000	0.000	2.572	0.000	- 2.572
Mananos	0.000	0.000	1.719	0.000	- 1.719
Nitrogen	0.033	0.000	0.027	0.006	0.000
Oxygen	0.010	0.000	0.008	0.002	0.000
Proteasa	0.000	0.093	0.043	0.000	0.049
Proteins	0.000	0.000	6.910	0.000	- 6.910
Water	0.000	125.046	125.788	0.000	- 0.742
Yeast	0.000	17.500	0.348	0.000	17.152
Ácidos nucleico	0.000	0.000	2.572	0.000	- 2.572
TOTAL	0.043	142.639	142.674	0.008	0.000

Tabla 23. Resumen Ejecutivo Evaluación económica anual.

Total Capital Investment	69,000 \$
Capital Investment Charged to This Project	69,000 \$
Operating Cost	134,000 \$/yr
Net Operating Cost	134,305 \$/yr
Main Revenue	62,000 \$/yr
Other Revenues	291,367 \$/yr
Total Revenues	353,000 \$/yr
Cost Basis Annual Rate	3,422 kg MP/yr
Unit Production Cost	39.24 \$/kg MP
Net Unit Production Cost	39.24 \$/kg MP
Unit Production Revenue	103.14 \$/kg MP
Gross Margin	61.95 %
Return On Investment	198.35 %
Payback Time	0.50 years
IRR (After Taxes)	77.11 %
NPV (at 7.0% Interest)	837,000 \$
MP = Total Flow of Stream 'Gluc-Man'	

Los resultados obtenidos muestran las posibilidades que tiene el Simulador **SuperPro Designer (SPD)**, para poder realizar una evaluación completa de un proyecto. Por ejemplo, el simulador cuenta con tablas de costo de los equipos de proceso, actualizadas hasta el año 2015, aunque también es posible que el usuario fije el costo de los equipos, como se ha hecho en este caso, ya que los equipos seleccionados para el proyecto no son exactamente los que ofrece el **SPD**. Pero para mayor capacidad esto no ocurre y se puede utilizar sin problemas la función de Cálculo de Costo de los Equipos del **SPD**, lo que simplifica el trabajo. El **SPD** tiene además herramientas para realizar, entre otras tareas, los Análisis de Sensibilidad y la determinación del Punto de Equilibrio de los Proyectos.

Además, es de especial interés que el **SPD** incluya la programación de los Procesos Discontinuos (en lotes), ampliamente utilizados en las industrias Biotecnológicas y Farmacéuticas, para los cuales resultan muy útiles los Diagramas de Gantt como los mostrados más arriba (Figuras 34 y 35). Finalmente, es de destacar las posibilidades de Simulación que brinda el **SPD**, a partir de los Modelos de **PFD** desarrollado, que permiten realizar el Escalado de la Producción, llevando, por ejemplo,

desde la Escala Piloto, como es el caso estudiado en este Proyecto, hasta la Escala Industrial, determinando el tamaño y costo de los equipos necesarios en cada caso.

Tabla 24. Resumen de la Evaluación Económica en un periodo de 15 años.

Year	Capital Investment	Debt Finance	Sales Revenues	Operating Cost	Gross Profit	Loan Payments	Depreciation	Taxable Income	Taxes	Net Profit	Net Cash Flow
1	-16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-16
2	-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-22
3	-28	0	59	123	-64	0	5	0	0	-59	-86
4	0	0	353	134	219	0	5	219	87	136	136
5	0	0	353	134	219	0	5	219	87	136	136
6	0	0	353	134	219	0	5	219	87	136	136
7	0	0	353	134	219	0	5	219	87	136	136
8	0	0	353	134	219	0	5	219	87	136	136
9	0	0	353	134	219	0	5	219	87	136	136
10	0	0	353	134	219	0	5	219	87	136	136
11	0	0	353	134	219	0	5	219	87	136	136
12	0	0	353	134	219	0	5	219	87	136	136
13	0	0	353	129	224	0	0	224	90	134	134
14	0	0	353	129	224	0	0	224	90	134	134
15	14	0	353	129	224	0	0	224	90	134	148

Como ejemplo de este tipo de aplicaciones del **SPD**, se tiene que E. Montserrat, en su Tesis de Maestría en Ingeniería Química (Alejandro Luis Soraci et al., 2015), utilizó con éxito la simulación con el **SPD**, para realizar el Escalado del proceso de producción del ácido giberélico, partiendo de los datos de Laboratorio para 5 litros hasta 20, 1000 y 10000 litros. Esa experiencia será muy útil para los trabajos que se deben continuar posteriormente, para el Escalado del Proceso de Producción de Hidrolizados de Levadura, hasta la Escala Industrial.

8.2.10. Análisis de Sensibilidad de la Evaluación Económica versus el precio de venta de los productos.

Como se explicó anteriormente, el precio de venta de los productos, Concentrado de Glucanos y Mananos y Concentrado de Extracto de Levadura, se fijó en base a referencias de trabajos anteriores y se consideró necesario un análisis posterior para fijar un precio que resulte más conveniente. Para esto se procede a realizar un Análisis de Sensibilidad de los indicadores financieros más importantes,

Valor Actual Neto (VAN), Plazo de Recuperación de la Inversión (TRI) y Tasa Interna de Retorno (TIR), ante la variación del precio de los productos. Para ello se realizó una disminución de precio proporcional para ambos productos, aunque el Análisis se brinda en función del precio de venta del producto principal: el Concentrado de Glucanos y Mananos.

A continuación, se muestra gráficamente el resultado de dicho Análisis de Sensibilidad, primero analizando la Variación del TIR (%) y del PRI (años) en función del Precio de Venta (USD/Kg) (Figura 36) y después, la Variación del VAN (US\$), en función del precio de Venta (US\$/Kg) (Figura 37).

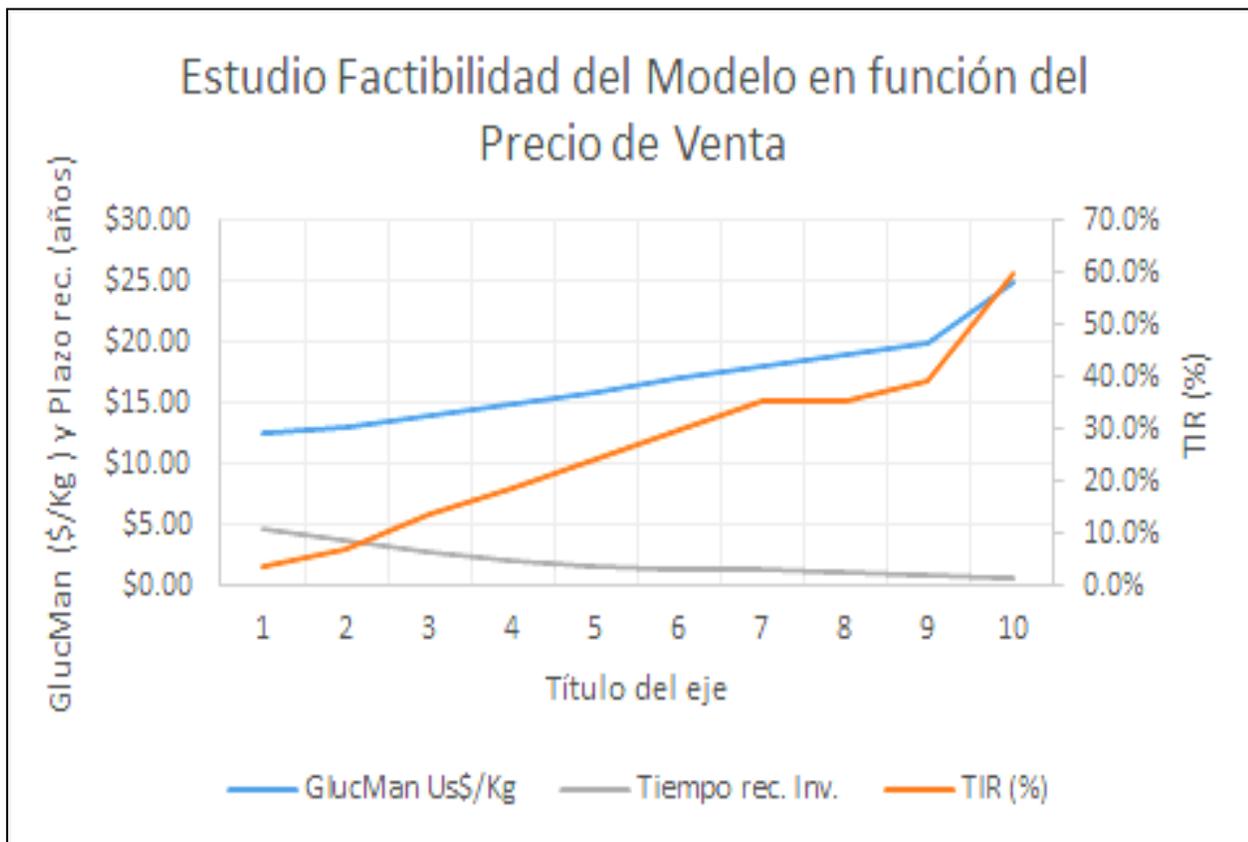


Figura 35. Análisis de Sensibilidad de los principales indicadores financieros (VAN y TIR) de la Evaluación Económica, ante el cambio del precio de venta de los productos.

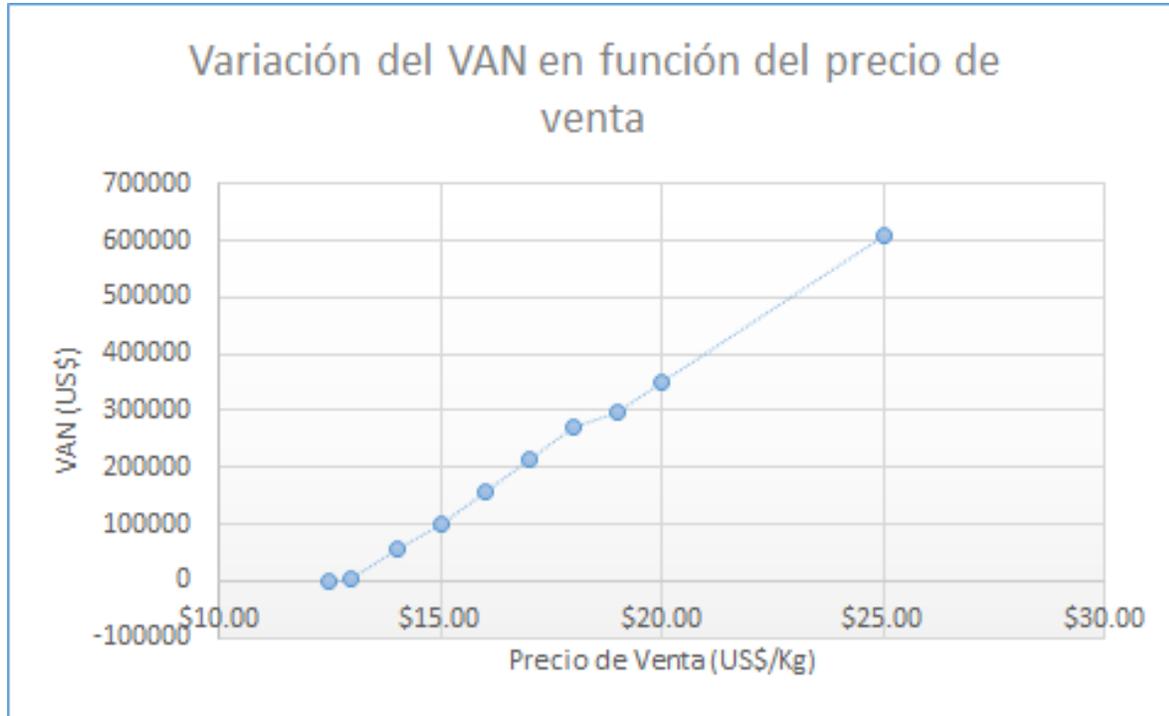


Figura 36. Análisis de Sensibilidad del VAN en función del precio de Venta de Concentrado de Glucanos y Mananos (US\$/Kg).

Los resultados del Análisis de Factibilidad muestran que, si el precio de venta disminuye de US\$13.00/Kg, el valor del TIR se reduce demasiado y el VAN se hace negativo. Ahora bien, cuando el precio de venta llega a US\$15.00/Kg los indicadores mejoran sensiblemente. En este caso, teniendo en cuenta que el estado actual del proyecto hace que todavía queden algunas indefiniciones en el equipamiento a utilizar y en general en distintos costos que pudieran no haberse considerado en la simulación, se decide tomar un valor más seguro (**17\$US/Kg**), como precio de venta mínimo para los estudios posteriores. Este valor pudiera llegar hasta **20 US\$/Kg** de ser necesario, siempre en dependencia de la ratificación del cálculo del costo de los productos de la competencia en el país.

IX. DISCUSIÓN

1. *Proceso de selección y caracterización de cepas*

Para el aislamiento y selección de cepas de *Bacillus* spp productoras de enzimas proteolíticas se empleó una metodología similar a la descrita por Grethel Milán 2014, donde el halo de hidrólisis de entre 15 y 35 mm obtenido al cabo de 36 horas en las pruebas de identificación bioquímica y con la cepa seleccionada **X₂** en medio de cultivo industrial con 20 mm a las 24 horas fue similar al encontrado por este Autor (27 mm hasta las 36 horas) para su cepa de mejor comportamiento. La importancia de esta determinación está dada por la existencia de una prueba física observable y la relación entre la actividad de las enzimas proteolíticas excretadas por estas cepas con otras hidrolasas según Ray et al, 1996 , y Abhrajyoti Ghosh, et all en 2008. Por otra parte también fueron seleccionas por la alta capacidad reproductiva de estas cepas y su entrada en la fase de esporulación que si bien es cierto que para efectos enzimáticos no se necesita gran cantidad de biomasa (células), la fase de esporulación se relacionan con los máximos niveles de excreción de enzimas según lo descrito en el por Pérez en el 2000 en su Tesis Doctoral y Michael T. Madigan en 2012, en la actualización en el libro Brock Brock Biology of Microorganism..

Para la producción del CE por la cepa de *Bacillus* spp X₂ se empleó un medio de cultivo de calidad industrial, lo cual se demostró con el uso de un diseño completamente al azar, donde se utilizó, entre sus componente, el autolizado de levadura torula que es complejo en su composición y empleado a concentraciones adecuadas, induce la síntesis y secreción de enzimas proteolíticas. Se hallaron mayores niveles de actividad proteasa cuando se empleó 40 g/litro de autolizado de levadura torula en el medio de cultivo que cuando se añadió 60 g/litro. Esto coincide con lo indicado por Grethel Milán 2014 y Perez en 2000 quienes observaron un efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteasas por cepas del género *Bacillus* al emplear autorizado de levadura torula

como fuente de nitrógeno a concentraciones mayores de 40 g/litro. Este componente tiene altos niveles de aminoácidos y péptidos en su composición, los cuales actúan inhibiendo la síntesis y secreción de proteasas a elevadas concentraciones en el medio de cultivo (Perez 2000) por ello, en la síntesis de proteasas y otras enzimas hidrolíticas por cepas seleccionadas, es muy importante tener en cuenta este fenómeno de inducción y represión catabólica, ya que muchas enzimas son producidas en cantidades, sólo en presencia de inductores específicos.

La miel final, como fuente de carbono en este trabajo, presenta altos niveles de glucosa. Ello explica los resultados más bajos en actividad enzimática, cuando se incorporaron, al medio de cultivo, 75 g/litro de ésta, lo cual está acorde a lo planteado por Raina M. Maier, & Ian L. Pepper en 2015 y de que la glucosa es el metabolito represor más común; pero su acción puede ser prevenida con cantidades mínimas de esta fuente de carbono en el medio de cultivo microbiano. Cabe destacar que se utiliza por ser una fuente de glucosa económica para su utilización a mayores escalas como es la producción industrial.

El calcio, por su parte, es importante para la producción de enzimas hidrolíticas por cepas de *Bacillus* spp. La literatura coincide en que los niveles óptimos de calcio para la producción de enzimas hidrolíticas por estas cepas se encuentra entre 1.5 y 2.0 g/litro y que su presencia es indispensable, tanto para la síntesis como para la actividad enzimática (Kobayashi y Hakamada, 1996, Ferrero et al, 1996 y Raina M. Maier, & Ian L. Pepper en 2015). Siendo en esta investigación el reactivo limitante en el medio calidad industrial definido.

Los mayores niveles de enzimas obtenidos en el medio de cultivo y las condiciones óptimas con la cepa de *Bacillus* spp X₂ seleccionada, coincide con los encontrados por varios autores que han empleado como sustrato diversas fuentes proteicas (Surówka y Fik, 1994, Pérez 2000, Grethel Milan 2014). La mayor actividad enzimática de la cepa en estudio, se logró a una temperatura de 38 °C con 43.3 UE/ml, lo cual coincide con lo hallado por Pérez en el 2000,

quienes encontraron una temperatura óptima de 38°C para el crecimiento de una cepa de *Bacillus* sp con una mayor producción de proteasas a, lo que contrasta con lo reportado por Pérez en el 2000 donde reporta mayor producción de proteasas a 40°C y de igual forma lo anterior no coincide con lo planteado por Izurieta en 2015 que obtuvo una mayor síntesis de proteasa de *Bacillus* spp a una temperatura de 28 °C incluso basó su protocolo de aislamiento en esta temperatura con un buen crecimiento.

Las cepas seleccionadas se sometieron a un proceso de identificación bioquímica, mediante el cual fueron clasificadas como *Bacillus subtilis*, esta metodología sigue siendo ampliamente utilizada y fue seguida por Cuervo en 2010, Grethel Milan en 2014, Izurite en 2015, Yang S en 2016 por lo que se considera importante la clasificación. En este estudio también se realizó la identificación molecular identificando a la cepa X₂ como *Bacillus cereus* con un 98% de similitud, esta identificación no se consideró como concluyente, debido a que es 98.5% el mínimo de similitud aceptable para la identificación como especie según German Bou en el 2011 (Germán Bou et al., 2011), por lo cual según el mismo investigador se requiere secuenciar más de una regiones específica, para definir la especie, esto mismo lo refuerza en su investigación Álvarez en 2014, Suarez en 2017, por lo anterior aunque para este estudio no hay diferencia significativa la especie del *Bacillus* aislado y tomando en consideración que tanto las especies *Cereus* como *Subtilis* son productores de proteasas y la secuenciación no tuvo la resolución suficiente para definir especie según la revisión de German Bou, hasta tanto no se haga una nueva identificación molecular con mayor resolución, se considerará la clasificación solamente hasta género, o sea como *Bacillus spp.*

La producción de enzimas ha sido evaluada a partir de sistemas sencillos de fermentación, hasta amplios modelos en birreactores por simulación en sistema líquido que permiten una combinación de variables que favorecen la obtención de metabolitos a partir de agentes

microbianos en todo tipo de industria. Por lo que fue importante en este estudio definir y comprender la curva de crecimiento de especies del género *Bacillus* spp aislada de bacilos Gram positivos anaerobios facultativos capaces de formar esporas, lo que permitió un acercamiento al modelo de cultivo para obtención de enzimas en los simuladores.

2. Producción del ECE a Escala de Laboratorio y desarrollo del modelo matemático correspondiente.

El modelo obtenido resulta válido hasta la Escala Industrial, siempre y cuando se apliquen, en las distintas escalas, la agitación y aireación obtenidas en esta Tesis, mediante la aplicación de las ecuaciones de escalado correspondientes a cada escala. Con los datos experimentales obtenidos, se realizó el ajuste del modelo a Escala de Laboratorio en el software *STELLA* y utilizando la mejor capacidad de ajuste de curvas del software *Berkeley Madonna* procedimiento descrito por González en 2009, se determinaron los coeficientes cinéticos a esa escala ($\mu_{\max} = 0.2215$; $K_s = 0.024$; $Y_{xs} = 0.359$; $\alpha = 2.3$; $\beta = 0.01$; $K_i = 0.012$; $Y_{ps} = 1$). Los coeficientes cinéticos obtenidos a Escala de Laboratorio son diferentes que los coeficientes que se deben obtener a partir de la Escala de Banco, debido al menor *Coefficiente de Transferencia de Oxígeno ($k_L a$) que se obtiene en la Escala de Laboratorio*, por lo cual según Shijie Liu. 2017 y González 2018 los coeficientes cinéticos deberán ser ajustados nuevamente con las corridas que se realicen a Escala de Banco, en trabajos posteriores.

X. CONCLUSIONES

1. La identificación molecular de las cepas seleccionadas hasta nivel de especie no resultó concluyente por lo cual, aunque las cepas se clasificaron como *Bacillus subtilis* por los métodos microbiológicos y bioquímicos tradicionales, se decidió dejar la clasificación a nivel de género por lo cual, hasta tanto no se proceda a un nuevo proceso de identificación molecular con mayor resolución, las cepas se clasifican como *Bacillus spp*,
2. Se obtuvo, como resultado de la determinación del medio de cultivo calidad industrial, que la mejor cepa es la X_2 por la variable respuesta de Actividad Enzimática y se estableció la composición óptima del medio de cultivo es de 50 g/L de mieles finales, 40 g/L de levadura, 2 g/L de Calcio y una temperatura de 38°C.
3. Se elaboró y ajustó, con los datos experimentales obtenidos a Escala de Laboratorio, el *Modelo Matemático del Proceso de Producción de ECE*, con los simuladores numéricos *STELA* y *Berkeley Madonna* para realizar la modelación cinética del proceso de producción que sirve de base para el escalado ulterior de la producción del ECE, hasta la *Escala Demostrativa*.
4. Se elaboró el Modelo del *Diagrama de Flujo de Proceso (PFD)* de la *Planta Piloto para la Producción de Hidrolizado de Levadura (HL)* y la *Evaluación Técnico-Económica del Proyecto* y, el Análisis de Sensibilidad del mismo, ante la variación del precio de venta de los productos del (*Extracto de Levadura y Concentrado de Glucanos y Mananos*).

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar las corridas de producción del **ECE** a *Escala de Banco*, con la cepa **X2** seleccionada en esta Tesis, de manera de obtener los *Coeficientes Cinéticos a esa Escala* y hacer el ajuste correspondiente del modelo matemático.
2. Completar la modelación y simulación del *Proceso de Producción de Hidrolizado de Levadura (HL)* utilizando el **SPD**, desde las Escala Piloto hasta la Industrial, de manera que se estime el financiamiento que será necesario para la producción del **HL** a las diferentes escalas y, a partir de esa información, realizar el *Estudio de Factibilidad* de ese proyecto.
3. Elaborar y presentar el Proyecto de una *Planta Productora de HL a Escala Piloto*, que permita obtener la cantidad de producto requerido para la introducción del mismo en el mercado y evaluar las posibilidades ulteriores de aumentar la escala de producción.
4. Evaluar, en base a los resultados que se obtengan con la *Planta de Producción de HL a Escala Piloto*, la conveniencia de elaborar un *Proyecto para la Producción de ECE a Escala Piloto*, con el cual se pueda realizar también un estudio de introducción en el mercado de ese nuevo producto y evaluar, además, si es factible técnica y económicamente, purificar el **ECE** para obtener una enzima purificada, con lo que se obtendría un nuevo producto.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Imágenes

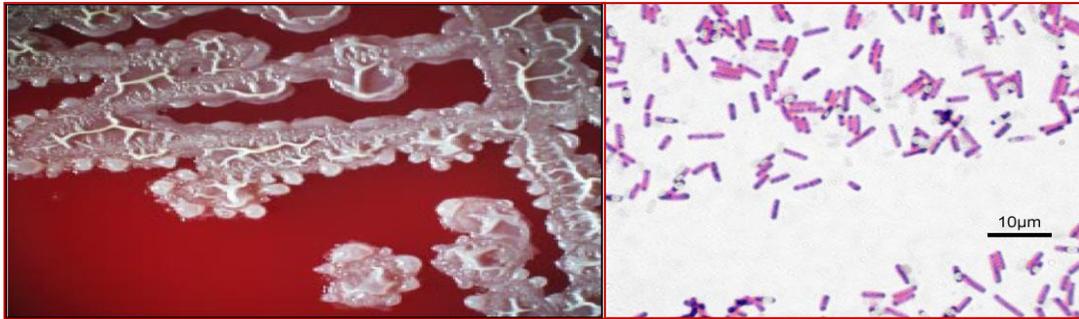


Imagen 1. Fotografías de colonias y cepas de *Bacillus subtilis* Colonias de bacilos de 2 a 4 mm de diámetro, beta-hemolíticas con hemólisis completa (izquierda); Cepas después de 24 horas de la tinción Gram, bacilos Gram positivos de 1,3 mm de diámetro por 3 a 5.

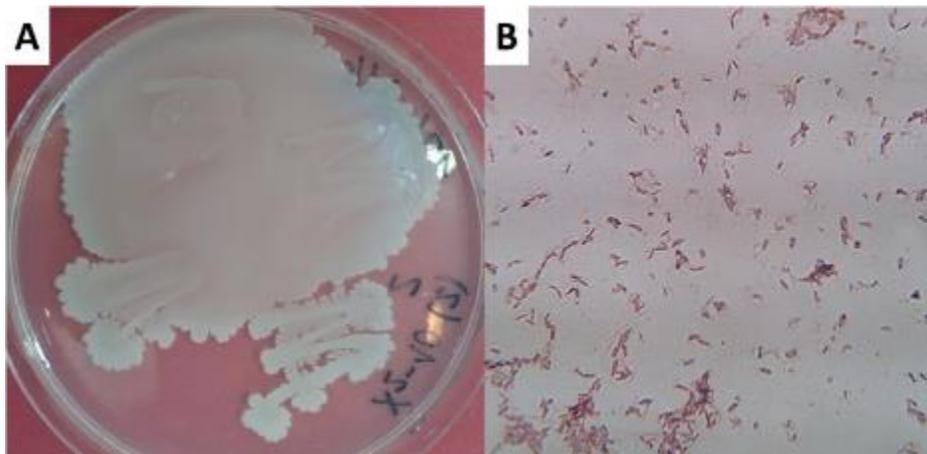


Imagen 2. Fotografías de cultivo puro obtenido y tinción de Gram vista en un microscopio con cabeza de tres oculares Olympus BX43 con cámara acoplada Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus X2-10(2)* (B).

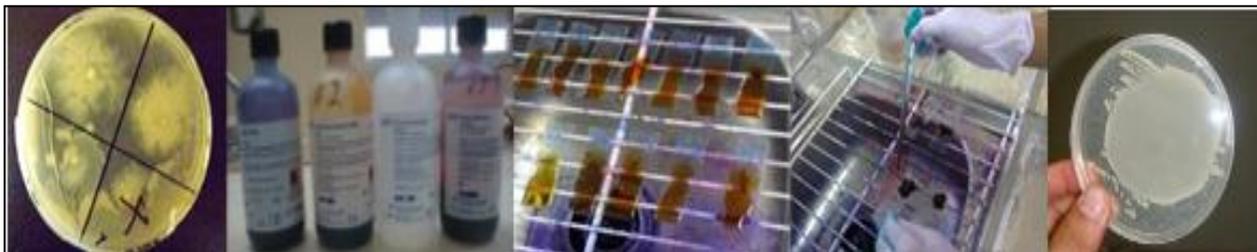


Imagen 3. Tinción de Gram y verde malaquita a utilizada en la selección microorganismos aislados.



Imagen 4. Medios y reactivos en la preparación de la bioquímica aplicada.



Imagen 5. Reactivación de microorganismos aislados y conservados en Caldo leche a -20°C



Imagen 6. . Frascos de fermentación para cultivo en medio modificado.



Imagen 8. Espectrofotómetro Nanodrop2000 para la medición de proteínas.

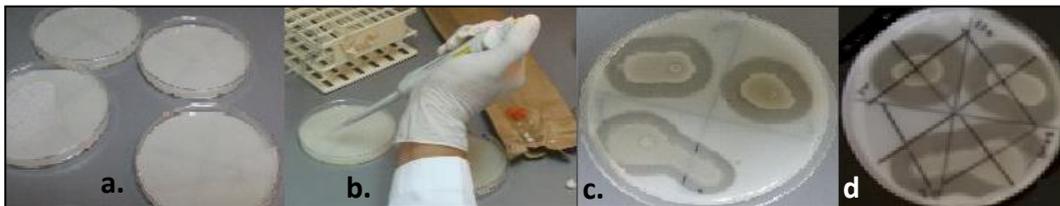
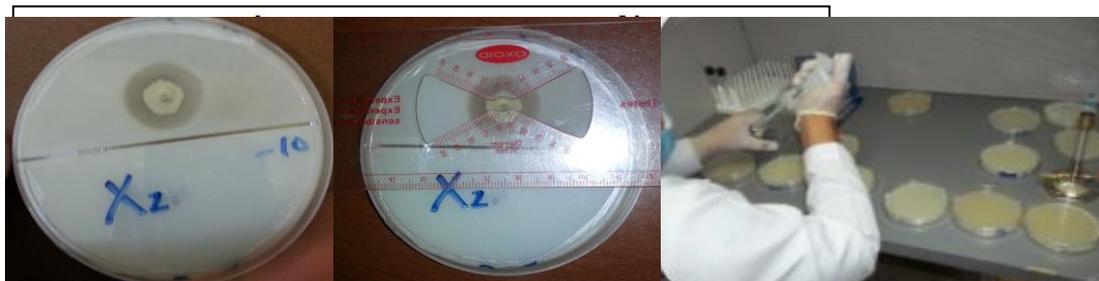


Imagen 10. Resultados de la prueba de hidrólisis de caseína: a. Placas de agar leche preparadas, b. Inoculación de placas, c. Crecimiento con formación de halo de hidrólisis a las 24 horas. d. Halo de hidrólisis a las 36 horas.



Imaaen 9. Halo de hidrólisis de cepa seleccionada (izquierda): Llenado de placas con medio caseína (derecha).



Imagen 7. Aislamiento de microorganismos puros, crecimiento en agar nutriente: AI-AII, tinción Gram positivo, bacilos en cadena; IB-IIB tinción Gram positiva, bacilos únicos; IC-IIC crecimiento y tinción bacilos formación mixta.

Anexo 2. Preparación de medios de cultivo y resultados de pruebas bioquímicas.

2.1 Preparación de medios de cultivo.

- **Agar Plate Count (PCA):** Se agregaron 23.5 g de *Agar Plate Count* comercial en un litro de agua destilada.
- **Medio Agar Nutritivo (AN):** Se agregaron 23 g de agar nutritivo comercial en un litro de agua destilada.
- **Müller Hinton Agar (MH):** Se suspendieron 38 g de medio comercial en 1 litro de agua destilada.
- **Triple Sugar Iron (TSI):** Se adicionaron 65 g del medio comercial en 1 litro de agua destilada, se vertió el medio en tubos de ensayo dejar enfriar con inclinación o pico de flauta e aproximadamente 1 pulgada.
- **Kliger Iron Agar (KIA):** Se suspendieron 55 g del medio comercial en 1 litro de agua destilada, se vertió en tubos de ensayo con una inclinación de aproximadamente 1 pulgada.
- **Simmons Citrate Agar (CS):** Se agregaron 23 g del agar comercial en un litro de agua destilada.
- **Methyl-Red and Voges Proskauer (MRVP):** Se agregaron 17 g de medio comercial en un litro de agua destilada.
- **Mannitol (MAN):** Se suspendieron 150 g de medio comercial en 1 litro de agua. Se agitó suavemente para homogenizar durante el vertido del medio.
- **Movilidad Indol Ornitina (MIO):** Se suspendieron 31 g del medio comercial en 1 litro de agua destilada. Se vertió en tubos de ensayo en posición vertical.
- **Sulfide Indol Motility (SIM):** Se suspendió 30 g del medio de sulfuro indol para movilidad en 1 litro de agua destilada. Se Vertió en tubos de ensayo en forma vertical.
- **Caldo Nutritivo (CN):** se rehidrató 23 g del medio en un litro de agua destilada.
- **Agar leche:** Se suspendió 24 g de agar comercial en 1 litro de agua.

Se prepararon los medios con agua destilada, sometiéndolos a calentamiento hasta comenzar a hervir en un plato caliente agitador *Fisherbrand™ Isotemp*. A continuación, se procedió a esterilizar por calor húmedo en la autoclave *All American* tipo olla (Figura 21), a 121°C durante 15 minutos a una presión de 100 kPa. Después de cumplido el tiempo se vertió el medio en placas Petri y tubos dejándolos solidificar a temperatura ambiente, dentro de la *Cabina de Flujo Laminar Labconco* (Hernando Alfonso Valencia Zapata, 2010).

2.2 Prueba de catalasa. La “*Prueba de Catalasa*”, La prueba de la catalasa tiene como principio detectar la presencia de la enzima catalasa, ya que en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que poseen citocromos está presente la catalasa, mientras que los anaerobios obligados carecen de ella (Carlos Andrés Bastidas, 2016). Esta prueba se utilizó para confirmar que los *Bacilos Gram Positivos esporulados, son aerobios*, que son las características de los microorganismos probióticos beneficiosos para la vida. La formación de burbujas indica que la bacteria es aerobia y de esta manera posee la enzima catalasa por lo cual entra en reacción con el peróxido de hidrógeno presente en el agua oxigenada.

Esta prueba se realizó de la siguiente manera:

- Se colocó con un asa bacteriológica estéril la parte de una colonia sobre un porta-objeto.
- Se le adicionó una gota de agua oxigenada sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur.
- Se observó la reacción de la muestra y se determinó positiva aquellas que presentaron formación de burbujas.

2.3 Clave de reacción El agar de TSI (Hierro- triple azúcar). Esta prueba es un medio diferencial que se emplea para determinar la fermentación de carbohidratos, la producción de H₂S y el gas proveniente del metabolismo de los carbohidratos. Además, el *TSI* identifica a las bacterias en función de la fermentación de lactosa, glucosa y sacarosa, y en la producción de sulfuro de hidrógeno; dado que el TSI contiene glucosa (0,1%), sacarosa (1%) y lactosa (1%). A menudo, también se utiliza el TSI para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* y de bacterias *Gramnegativas* (Carlos

Andrés Bastidas, 2016). Se realizó con medios de cultivo en forma de pico de flauta en tubos de ensayo. El medio de cultivo estéril posee un tono rojo oscuro, pero con la reacción tiende a cambiar de color o tonalidad.

- Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
- Superficie ácida/Profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- Superficie alcalina/Profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.
- El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

2.4 Clave de reacción Manitol Indol Ornitina (MIO). Este medio se preparó en tubos de ensayo en posición vertical el cual al estar estéril presenta una atonalidad púrpura, color que cambia frente a un microorganismo. La prueba de Indol se realiza una vez que se ha determinado la movilidad y la prueba de ornitina.

a. Movilidad:

- Resultado positivo: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.
- Resultado negativo: crecimiento solamente en la línea de siembra.

b. Ornitina decarboxilasa:

- Resultado positivo: color púrpura.
- Resultado negativo: color amarillo. A veces se puede desarrollar un color violáceo en la superficie del medio.

c. Prueba del indol:

- Resultado positivo: color rojo al agregar el reactivo revelador.
- Resultado negativo: el color del reactivo revelador permanece incoloro amarillento.

2.5 Clave de reacción Sulfuro Indol Movilidad (SIM). El medio SIM se emplea para detectar la producción de sulfuro, la formación de Indol y la motilidad. Los componentes de este medio son el sulfato de amonio ferrosos y el tiosulfato de sodio y, al actuar en conjunto, sirven como indicadores de la producción de H₂S, ya que forman un precipitado de color negro (Carlos Andrés Bastidas, 2016). Este medio es semisólido el cual se utiliza para determinar la movilidad de la cepa inoculada en él. Por ser semisólido se trabaja en tubos en forma vertical. Tiene un color amarillo claro el cual varía al inocular un cultivo en el medio y se puede observar la reacción de forma fácil.

- Cepas móviles: producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra.
- Cepas inmóviles: el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra.
- Cepas SH₂ positivas: ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.
- Cepas SH₂ negativas: el medio permanece sin cambio de color.
- Cepas Indol positivas: desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovacs o de Erlich.
- Cepas Indol negativas: sin cambio de color

2.6 Investigación de la producción de acetil metil carbinol (Voges Proskauer) y ácidos (rojo de metilo). Con estas dos pruebas se estudia qué tipo de fermentación (*butilenglicólica* o *ácido mixto*) realiza el microorganismo en estudio. La prueba de *Voges-Proskauer* sirve para comprobar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el *acetilmetilcarbinol* (*acetoína*) a partir de la fermentación (*butilenglicólica*) de la glucosa. Esta prueba permite diferenciar *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter* (+) de *Escherichia coli* y otras especies de *Klebsiella* (-). La prueba del *Rojo de Metilo* sirve para comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación (*ácido mixto*) de la glucosa. Esta prueba permite diferenciar *Escherichia coli* (+) de distintas especies pertenecientes a los géneros

Enterobacter* y *Klebsiella (-) (Departamento Química Biológica, 2010). Esta prueba al igual que la gran mayoría de pruebas bioquímicas se realiza en tubos de ensayo, ya que esto permite visualizar la reacción completa resultante de interactuar con otros reactivos como son:

Rojo de metilo: se agregan 3 gotas del reactivo de metilo, si en la superficie del medio aparece un color rojo intenso es RM (+) = microorganismos que utilizan la glucosa fermentándola hasta llegar a un pH menor a 4,4.

VP: Se agrega 0.6 ml de alfa-naftol seguidos de 0,2 ml de KOH al 40%. Es esencial que los reactivos se agreguen en este orden. El tubo se sacude suavemente y luego se deja quieto de 10 a 15 min. La aparición de color rojo = prueba (+) (presencia de acetil-metil-carbinol).

2.7 Agar Kligler Hierro (KIA). Permite determinar la capacidad de un microorganismo de metabolizar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio de crecimiento básico, así como la de producir gas y ácido sulfhídrico. Se utiliza para identificar diferentes especies bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Departamento Química Biológica, 2010). El medio de cultivo para esta prueba también se sembró en tubos de ensayo con forma de pico de flauta con el objetivo de determinar en qué parte del medio es que tiene mayor contacto el microorganismo y de esta forma obtener los resultados.

- Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
- Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, y lactosa.
- Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.

- El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

2.8 Manitol. Para la evaluación de esta prueba se prepara el medio en tubos de ensayo con la forma de pico de flauta largo. Este método se utiliza para determinar en qué parte del medio tiene mayor interacción el microorganismo y poder evaluar de esta manera como responde a la prueba. Los microorganismos fermentadores de manitol: forman colonias de color amarillo rodeadas o no de un halo amarillo. Microorganismos no fermentadores de manitol: colonias del color del medio, rojas rodeadas o no de halo rojizo-púrpura.

2.9 Citrato de Simmons. La prueba de citrato se basa en determinar si un microorganismo tiene la capacidad de emplear al citrato, como única fuente de carbono, para metabolizar y crecer con alcalinidad. Además, la prueba del citrato se utiliza para la identificar de la familia Enterobacteriaceae, microorganismos gramnegativos y bacterias no fermentadoras (Carlos Andrés Bastidas, 2016). Al igual que las pruebas anteriores, este medio de cultivo se preparó en tubos de ensayo en donde la superficie del medio obtuviera un ángulo de 45° esto con el objetivo de determinar en donde ejerce mayor acción el microorganismo. Si el microorganismo utiliza citrato, se produce alcalinización del medio de cultivo, pasando éste a color azul intenso, lo cual indica prueba positiva para el citrato.

2.10 Sensibilidad a antibióticos. En la realización de la prueba a la sensibilidad del antibiograma se utilizaron los siguientes antibióticos: Penicilina, *Eritromicina*, *Kanamicina*, *Tetraciclina*. Se realizó con el objetivo de determinar a qué antibiótico s es más sensible la bacteria aislada.

2.11 Proteólisis de Caseína. Para ver la actividad proteolítica de la cepa se utiliza la proteólisis de caseína. Esto se basa en que las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas y se usan para la digestión molecular y la reducción de proteínas no deseadas. Su rol fisiológico va desde la digestión de las proteínas de los alimentos hasta procesos como coagulación de la sangre por medio de la trombina. La hidrólisis de Caseína se lleva a cabo

para ver la producción de enzimas hidrolíticas que son las ayudan a mejorar la utilización de los alimentos y las transforman en nutrientes más simples. *Sólo las bacterias del género Bacillus (B. thuringiensis y B. subtilis) hidrolizan la caseína.*

Más abajo se muestra el Cuadro Resumen de la reacción de las cepas seleccionadas por *Tinción de Gram y Verde Malaquita*, a la prueba de la catalasa.

Tabla 25 Resultados Prueba de catalasa

No.	Código de cepa	Reacción
1	X4 ⁻⁹ (2)	CATALASA NEGATIVA
2	X2 ⁻⁸ (2)	CATALASA NEGATIVA
3	Y1 ⁻⁸ (2)C	CATALASA POSITIVA (LENTA)
4	Y1 ⁻⁹ (1)	CATALASA NEGATIVA
5	X5 ⁻⁸ (2)	CATALASA POSITIVA
6	X5 ⁻⁹ (2) CD	CATALASA POSITIVA
7	X9 ⁻⁹ (2)	CATALASA POSITIVA (LENTA)
8	X5 ⁻⁸ (1)	CATALASA NEGATIVA
9	X2 ⁻¹⁰ (2)	CATALASA POSITIVA
10	X5 ⁻⁹ (2) C	CATALASA POSITIVA
11	E ⁻¹⁰ (2)	CATALAS NEGATIVA
12	SC ⁻¹⁰ (1)	CATALASA NEGATIVO
13	SC ⁻⁹ ½	CATALASA NEGATIVA
14	8 ⁻⁹ (2)	CATALAS POSITIVO
15	3 ⁻¹⁰ (2)	CATALAS NEGATIVA
16	8 ⁻¹⁰ (1)	CATALASA POSITIVA (RAPIDA)
17	3 ⁻¹⁰ (2)	CATALAS NEGATIVA
18	VIII ⁻¹⁰ (1)	CATALAS NEGATIVA
19	VIII ⁻¹⁰ (1)D	CATALAS NEGATIVA
20	VI ⁻⁸ (1)	CATALASA POSITIVA
21	VII ⁻⁹ (1)	CATALAS NEGATIVA
22	VIII ⁻¹⁰ (2)	CATALAS NEGATIVA
23	5 ⁻⁹ (1)	CATALSA POSITIVA (LENTA)
24	VIII ⁻¹⁰ (1)	CATALAS NEGATIVA
25	5 ⁻¹⁰ (2)	CATALSA POSITIVA (LENTA)
26	α ⁻⁸ (1)	CATALASA POSITIVA

Anexo 3. Resultados de la Identificación molecular

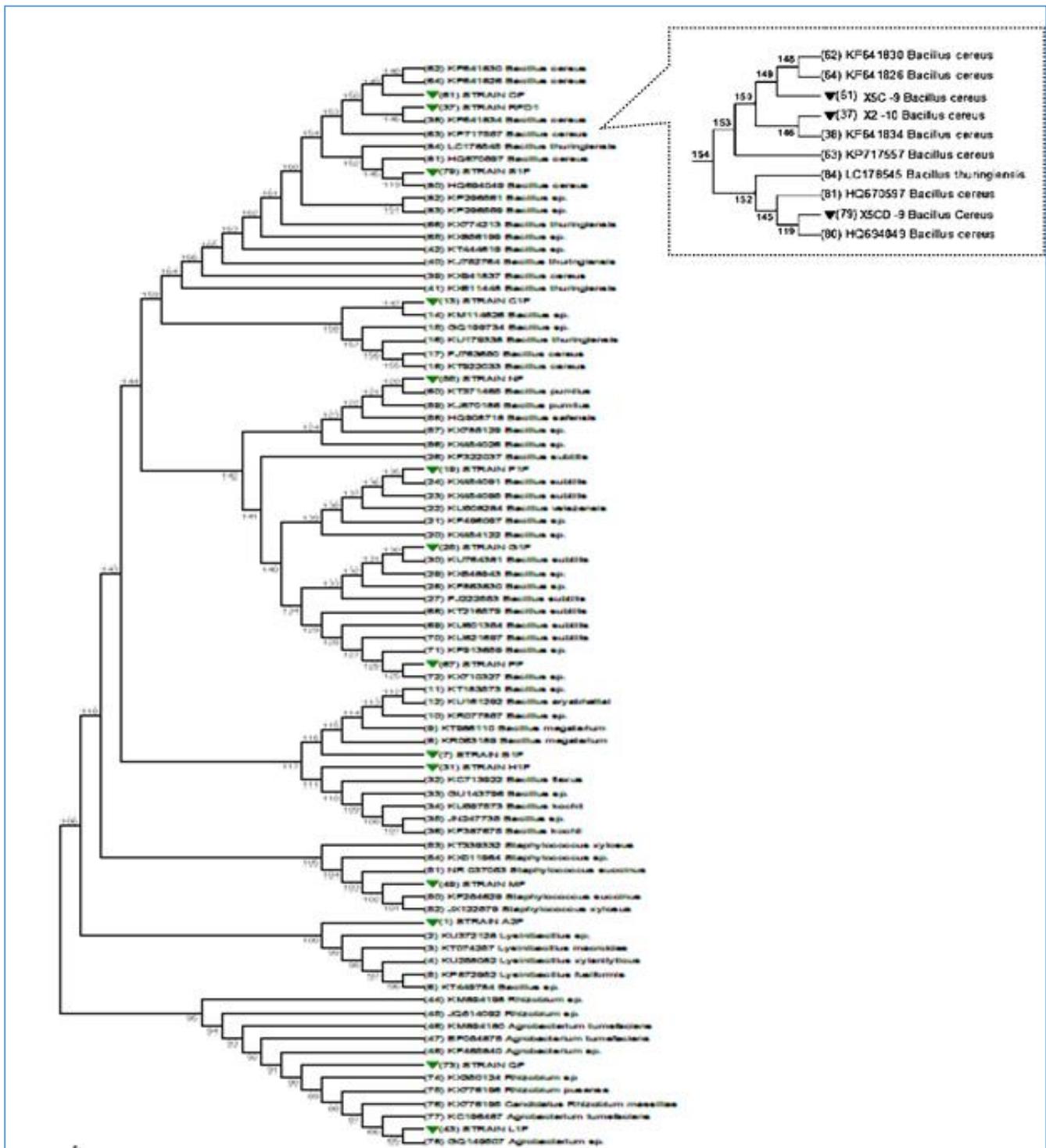


Imagen 11. Árbol filogenético de bacterias y hongos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol se realizó en el programa MEGA 5.0, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.

Secuencias formato FASTA. A continuación, se muestran las secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de microorganismos identificados vía molecular:

>STRAIN OF

AGTCGAGCGAATGGATTAAG

AGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGCTGTGTAACACGTGGGTAACCTGCCATA

AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGT

TCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAG

TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC

CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG

CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAA

AACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCT

AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG

TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG

CCCACGGCTCAACC-GTGGAGGGTCATTGG

Secuencia 10. Cepa X5-9E2 (O) (*Bacillus cereus*)

>STRAIN RFD1

GGGGGGGGGGGGAGGAGGGGTTTTTTCCTTTCTTATTGGGAGCAAGTAAGGGGGGCTAC

A--GTCGAGCGA-TGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGTTTTTGT

ACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG

ATAACATTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGAT

GGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAG

CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA

GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT

GATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATA

AGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC

GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGG

TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA

GACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATA

TGG-AGGAACCCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT-AACTGACACTGGAGGCGCG

AAA---GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG--ATACCCT--GGTAGTCCCC-GCCGTAAAC

GAAGAAGTGGC--AAGGGTTAAAAGGGTTTCC-GCCCTTT---TGCTGAAGTTAACGCAT

TAAGCCACTCCG--CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG

GGCCCCACAAGCGGGG

Secuencia 13. Cepa X2-10(2)2 (R) (*Bacillus cereus*)

>STRAIN S1F

GGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCGGATATCGGGAAATCTACCGGGGGGGG
 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTGCTTCACTTTTT
 TCGGGGGGGCGGTACCCTCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGATGAGGGTCTCACCGCC
 CCTATGACAGCTTAGGAGCAATACGTAAAACTTCCAGGCGAACGAGGGGATTAATATAA
 ATTTGCTCTTATGAAATTAGCGCCCGA---CCCCGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG-
 -CCCATAAGACTGGGATAA-----CTCCGGAAAAACGGGGCTAATACCGGATAACATTT
 TGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCG
 TCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA
 GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGC
 TTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCAC
 CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
 TAGGTGGCTAGCATTATCC-GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCCGGTGGTTTCTTAA
 GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCC-TGGAGGG-TCAT-TGGAAACTGGGAGACTT
 GTGTACAGAAGAGGAAAGTGAAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAA
 GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGGCCCC--
 ----CCCCCGGGTTTGCACCCCCCCCCAGTTGTACGCTTCGACAAGAGCCGAATGAAT
 ACAGTGGA

Secuencia 14. Cepa X5-9CD2 (S) (*Bacillus cereus*)

Anexo 4. Cálculo de actividad enzimática utilizando caseína como sustrato

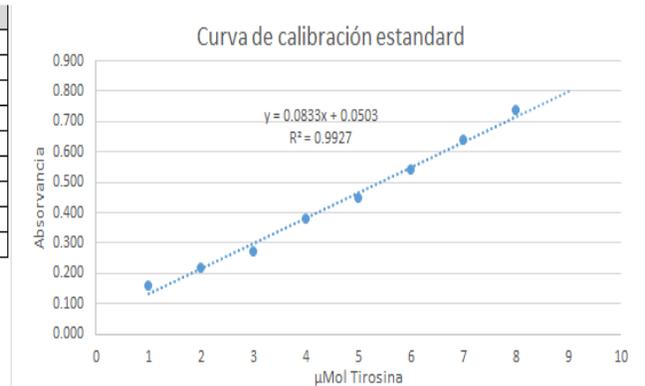
Corrida #	Sample ID	Conct. μMol tirosina	(Abs)
1	Blanco	0	0.003
2	St1	0.0550	0.160
3	St2	0.1110	0.220
4	St3	0.2210	0.275
5	St4	0.442	0.380
6	St5	0.553	0.450
7	St6	1.0000	0.540
8	St7	5.0000	0.640
9	St8	10.0000	0.736

Ecuación: $\text{Abs}=0.0831\text{Conc}+0.0517$

$m= 0.0833$

$b= 0.0503$

$r^2= 0.99$



Corrida #	Sample ID	1 (Abs)	Unidades/ml
Blanco	Blanco	0.050	
Corrida #12 a 38 C-	X5cd	0.669	27.247
Corrida #12 a 38 C-	X5c	0.815	33.673
Corrida #12 a 38 C-	X5c	0.927	38.603
Corrida #12 a 38 C-	X2	0.534	42.609
Corrida #12 a 38 C-	X2	0.986	41.200
Corrida #12 a 38 C-	X2	0.600	48.419
Corrida #4 a 38 C	X5cd	0.955	39.836
Corrida #4 a 38 C	X5cd	0.877	36.403
Corrida #4 a 38 C	5cd	0.803	33.145
Corrida #4 a 38 C	X5c	0.741	30.416
Corrida #4 a 38 C	X5c	0.824	34.070
Corrida #4 a 38 C	X2	0.912	37.943
Corrida #4 a 38 C	X2	0.689	28.127
Corrida #4 a 38 C	X2	0.699	28.567
Corrida #3 a 39 C	X2	0.698	28.523
Corrida #3 a 39 C	X2	0.842	34.862
Corrida #3 a 39 C	X2	0.743	30.504
Corrida #3 a 39 C	X5 cd	0.877	36.403
Corrida #3 a 39 C	X5 cd	0.971	40.540
Corrida #3 a 39 C	X5 c	0.911	37.899
Corrida #3 a 39 C	X5 c	0.908	37.767
Corrida #15 a 40 C	X2	0.137	3.830
Corrida #15 a 40 C	X2	0.076	1.144
Corrida #15 a 40 C	X2	0.09	1.761
Corrida #15 a 40 C	X5c	0.210	7.043
Corrida #15 a 40 C	X5c	0.225	7.703
Corrida #15 a 40 C	X5c	0.205	6.823
Corrida #15 a 40 C	X5cd	0.278	10.036
Corrida #15 a 40 C	X5cd	0.162	4.930
Corrida #15 a 40 C	X5cd	0.170	5.282
Corrida #10 a 40 C	X2	0.162	4.930
Corrida #10 a 40 C	X2	0.152	4.490
Corrida #10 a 40 C	X2	0.135	3.741
Corrida #10 a 40 C	X5c	0.080	1.329
Corrida #10 a 40 C	X5c	0.079	1.277
Corrida #10 a 40 C	X5c	0.076	1.144
Corrida #10 a 40 C	X5cd	0.188	6.074
Corrida #10 a 40 C	X5cd	0.143	4.094
Corrida #10 a 40 C	X5cd	0.163	4.974
Blanco enriquecido		0.091	1.805

Control de Calidad

Estandar testigo: St4

Concentración Teórica: 0.442

Concentración real: 0.492

%recobro 111.36 Pasa

El recobro del blanco enriquecido del laboratorio

debe estar en un límite de 85 a 115 de recobro

U.S EPA Method 200.7 Experimental Instrumentation Requirements

Anexo 5. Datos de Actividad enzimática corridas en el agitador con medio

modificados y transformada de datos raíz cuadrada. (Raiz_ UaXml).

NPO	Cepa	Corrida	Long	Abs	UaXml	Raiz_Uax mi	Levadura _Torula (g/l)	Melasa (g/l)	Temperat ura (g/L)	Ca (g/l)	Corrida
1	x5cd	1	660	0 669	27 247	5 220	40	50	38	2 0	40 50 38 2
2	x5cd	2	660	0 955	39 836	6 312	40	50	38	1 0	40 50 38 1
3	x5cd	2	660	0 877	36 403	6 033	40	50	38	1 0	40 50 38 1
4	x5cd	2	660	0 803	33 145	5 757	40	50	38	1 0	40 50 38 1
5	x5cd	3	660	0 877	36 403	6 033	50	75	39	1 5	50 75 39 1 5
6	x5cd	3	660	0 971	40 540	6 367	50	75	39	1 5	50 75 39 1 5
7	x5cd	4	660	0 278	10 036	3 168	40	50	40	1 0	40 50 40 1
8	x5cd	4	660	0 162	4 930	2 220	40	50	40	1 0	40 50 40 1
9	x5cd	4	660	0 170	5 282	2 298	40	50	40	1 0	40 50 40 1
10	x5cd	5	660	0 188	6 074	2 465	60	50	40	1 0	60 50 40 1
11	x5cd	5	660	0 143	4 094	2 023	60	50	40	1 0	60 50 40 1
12	x5cd	5	660	0 163	4 974	2 230	60	50	40	1 0	60 50 40 1
13	x2	1	660	0 534	42 609	6 528	40	50	38	2 0	40 50 38 2
14	x2	1	660	0 986	41 200	6 419	40	50	38	2 0	40 50 38 2
15	x2	1	660	0 600	48 419	6 958	40	50	38	2 0	40 50 38 2
16	x2	2	660	0 912	37 943	6 160	40	50	38	1 0	40 50 38 1
17	x2	2	660	0 689	28 127	5 304	40	50	38	1 0	40 50 38 1
18	x2	2	660	0 699	28 567	5 345	40	50	38	1 0	40 50 38 1
19	x2	3	660	0 698	28 523	5 341	50	75	39	1 5	50 75 39 1 5
20	x2	3	660	0 842	34 862	5 904	50	75	39	1 5	50 75 39 1 5
21	x2	3	660	0 743	30 504	5 523	50	75	39	1 5	50 75 39 1 5
22	x2	4	660	0 137	3 830	1 957	40	50	40	1 0	40 50 40 1
23	x2	4	660	0 076	1 144	1 070	40	50	40	1 0	40 50 40 1
24	x2	4	660	0 090	1 761	1 327	40	50	40	1 0	40 50 40 1
25	x2	5	660	0 162	4 930	2 220	60	50	40	1 0	60 50 40 1
26	x2	5	660	0 152	4 490	2 119	60	50	40	1 0	60 50 40 1
27	x2	5	660	0 135	3 741	1 934	60	50	40	1 0	60 50 40 1
28	x5c	1	660	0 815	33 6735	5 803	40	50	38	2 0	40 50 38 2
29	x5c	1	660	0 927	38 6034	6 213	40	50	38	2 0	40 50 38 2
30	x5c	2	660	0 741	30 4162	5 515	40	50	38	1 0	40 50 38 1
31	x5c	2	660	0 824	34 0696	5 837	40	50	38	1 0	40 50 38 1
32	x5c	3	660	0 911	37 8992	6 156	50	75	39	1 5	50 75 39 1 5
33	x5c	3	660	0 908	37 7671	6 145	50	75	39	1 5	50 75 39 1 5
34	x5c	4	660	0 210	7 0428	2 654	40	50	40	1 0	40 50 40 1
35	x5c	4	660	0 225	7 7031	2 775	40	50	40	1 0	40 50 40 1
36	x5c	4	660	0 205	6 8227	2 612	40	50	40	1 0	40 50 40 1
37	x5c	5	660	0 080	1 3293	1 153	60	50	40	1 0	60 50 40 1
38	x5c	5	660	0 079	1 2765	1 130	60	50	40	1 0	60 50 40 1
39	x5c	5	660	0 076	1 1445	1 070	60	50	40	1 0	60 50 40 1

Anexo 6 Análisis estadístico de datos por ANOVA

Anexo 6.1 Análisis ANOVA con la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey, sin Interacción

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Raiz Uxml	38	0.96	0.95	11.46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	152.55	6	25.42	114.53	<0.0001
Cepa	0.84	2	0.42	1.88	0.1689
Levadura Torula	72.83	2	36.41	164.02	<0.0001
Temperatura	77.09	1	77.09	347.26	<0.0001
Ca	1.80	1	1.80	8.10	0.0078
Error	6.88	31	0.22		
Total	159.43	37			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.46473

Error: 0.2220 gl: 31

Cepa	Medias	n	E.E.	
x5c	4.33	12	0.14	A
x2	4.28	15	0.13	A
x5cd	4.27	11	0.15	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.40212

Error: 0.2220 gl: 31

Melasa	Medias	n	E.E.	
75	5.96	7	0.19	A
50	3.84	31	0.09	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.49682

Error: 0.2220 gl: 31

Temperatura	Medias	n	E.E.	
38	6.02	13	0.14	A
39	5.96	7	0.19	A
40	2.03	18	0.12	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.58468

Error: 0.2220 gl: 31

Ca	Medias	n	E.E.	
2.0	6.40	5	0.22	A
1.5	5.96	7	0.19	A
1.0	3.28	26	0.10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.59894

Error: 0.2285 gl: 26

Ca	Medias	n	E.E.	
2.0	6.33	5	0.23	A
1.5	5.99	7	0.19	A
1.0	3.28	26	0.10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.47607

Error: 0.2285 gl: 26

Cepa	Medias	n	E.E.	
x5c	4.33	12	0.15	A
x2	4.28	15	0.13	A
x5cd	4.26	11	0.15	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.08194

Error: 0.2285 gl: 26

Cepa	Melasa	Medias	n	E.E.	
x5cd	75	6.21	2	0.35	A
x5c	75	6.16	2	0.35	A
x2	75	5.60	3	0.29	A
x2	50	3.95	12	0.14	B
x5c	50	3.88	10	0.16	B
x5cd	50	3.62	9	0.17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.22254

Error: 0.2285 gl: 26

Cepa	Temperatura	Medias	n	E.E.	
x5cd	39	6.21	2	0.35	A
x5c	39	6.16	2	0.35	A
x2	38	6.13	6	0.20	A
x5cd	38	6.04	3	0.29	A
x5c	38	5.85	4	0.25	A
x2	39	5.60	3	0.29	A
x5cd	40	2.40	6	0.20	B
x5c	40	1.90	6	0.20	B
x2	40	1.77	6	0.20	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.24663

Error: 0.2285 gl: 26

Cepa	Ca	Medias	n	E.E.	
x5cd	2.0	sd	0	sd	A
x2	2.0	6.64	3	0.29	B
x5cd	1.5	6.21	2	0.35	B
x5c	1.5	6.16	2	0.35	B
x5c	2.0	6.02	2	0.35	B
x2	1.5	5.60	3	0.29	B
x5cd	1.0	3.62	9	0.17	C
x5c	1.0	3.16	8	0.18	C
x2	1.0	3.05	9	0.17	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 6.2 Análisis ANOVA con la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey, con interacciones

Anexo 6.3 Análisis ANOVA con la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey, con particiones de la variable de clasificación cepa.

Análisis de la varianza

Cepa	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
x2	Raiz Uxml	15	0.98	0.97	8.28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	65.56	4	16.39	130.43	<0.0001
Corrida	65.56	4	16.39	130.43	<0.0001
Error	1.26	10	0.13		
Total	66.82	14			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.95257

Error: 0.1257 gl: 10

Corrida	Medias	n	E.E.	
40 50 38 2.	6.64	3	0.20	A
40 50 38 1.	5.61	3	0.20	B
50 75 39 1.5	5.60	3	0.20	B
60 50 40 1.	2.09	3	0.20	C
40 50 40 1.	1.45	3	0.20	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Cepa	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
x5c	Raiz Uxml	12	1.00	1.00	3.78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	53.15	4	13.29	601.80	<0.0001
Corrida	53.15	4	13.29	601.80	<0.0001
Error	0.15	7	0.02		
Total	53.30	11			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.49494

Error: 0.0221 gl: 7

Corrida	Medias	n	E.E.	
50 75 39 1.5	6.16	2	0.11	A
40 50 38 2.	6.02	2	0.11	A
40 50 38 1.	5.68	2	0.11	A
40 50 40 1.	2.68	3	0.09	B
60 50 40 1.	1.12	3	0.09	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 7. Reglas del Lenguaje de STELLA

Una de las características básicas del software de modelación *STELLA* es que utiliza un procedimiento simple para elaborar los modelos, partiendo de los conceptos básicos de cada especialidad. En el caso de los Bioprocesos, se basa en la Cinética del Crecimiento de Microbiano, y se basa en el esquema general de un Biorreactor con composición de entrada, salida e interior (Figura 36).

A continuación se brindan las características de *STELLA*®, es necesario comenzar por los elementos principales del idioma con que trabaja *STELLA*® (Barry Richmond, 2003) el cual, como verán a continuación, es muy sencillo e intuitivo.

La mayoría de los idiomas reconocen la distinción fundamental entre *sustantivos* y *verbos* y el lenguaje *STELLA*® no es una excepción. Los *sustantivos* representan cosas y estados del ser; los *verbos* representan acciones o actividades. Como veremos más adelante, se necesita al menos **un nombre** y **un verbo** para constituir una "*oración*" gramaticalmente correcta en el *lenguaje STELLA*, tal como se hace en otros idiomas. Así que se está en terreno muy familiar con este lenguaje. La gran diferencia es que los iconos del lenguaje *STELLA* son de naturaleza operacional. Esto significa que cuando se cuenta una historia con ellos, se puede ver la historia no solo en la mente, sino también con los ojos reales. Y todos los demás pueden verlo también con sus ojos reales. En este caso "*operativo*" significa "*contarlo como realmente es*". Y cuando lo hace, las ambigüedades y las posibilidades de falta de comunicación se reducen en gran medida. Con este lenguaje no se pueden componer sonetos para un ser querido, pero si se trata de hacer explícito un modelo mental de cómo funciona realmente algo, ¡no tiene limitaciones!

Como se dijo antes, los sustantivos representan *cosas* y *estados del ser*. Las "*cosas*" pueden ser de naturaleza física, como: Población, Agua, Efectivo y Contaminación. También pueden ser de naturaleza no física, tales como: Calidad, Ira, Hambre, Sed, Autoestima, Compromiso y Confianza.

Las cosas no físicas a menudo son "*estados de ser*". Por lo tanto, el software **STELLA** es aplicable tanto en Literatura, Filosofía, Sociología, Psicología y Antropología, como en Física, Biología, Química o Ingeniería.

Los *sustantivos* en el lenguaje **STELLA** están representados por rectángulos. El rectángulo se eligió por una buena razón. Los *rectángulos parecen bañeras vistas desde un lado*. Y las *bañeras resultan ser una buena metáfora, físicamente intuitiva, de lo que representan todos los sustantivos: es decir, la acumulación*. Por ejemplo: las células cancerosas se acumulan en un tumor; el dinero se acumula en las cuentas bancarias; la ira crece en todo tu cuerpo y se incrementan los niveles de adrenalina en el torrente sanguíneo, presión arterial y tensión en los músculos; el amor crece en el transcurso de una relación. Entonces, cuando se piensa sobre *nombres* en el lenguaje **STELLA**, y se ven *rectángulos*, hay que pensar en ellos como *bañeras que llenan y drenan*. La diferencia es que estas "*bañeras*" rara vez contienen agua, aunque, por supuesto, también pueden contenerla. Los *nombres*, en el lenguaje **STELLA**, se llaman "*Stocks*", que se puede traducir como **Inventario**. La convención para nombrar acciones en el lenguaje **STELLA** es designarlos con letras mayúsculas en la primera letra. Como verá, esto ayudará a distinguirlos visualmente de los *flujos*, que generalmente están escritos en letras minúsculas.

Hay cuatro variedades de *Stocks (Inventarios)*: **Reservoir (Depósitos)**; **Conveyor (Cintas Transportadoras)**; **Oven (Queue (Colas) y Oven (Hornos)**. Se mantienen los nombres en inglés y español porque existen muchos modelos disponibles en inglés y es importante estar familiarizado con la terminología en ambos idiomas. Una información más detallada sobre las características de los distintos tipos de **Inventarios** se encuentra en la Ayuda del software, pero para esta revisión introductoria sólo es necesario conocer que el **Stock** más utilizado y que será el que se utilice en esta Tesis es el **Reservoir (Depósito)**. El símbolo de cada una de estas variedades se muestra más abajo (Figura 38) (Barry Richmond, 2003).

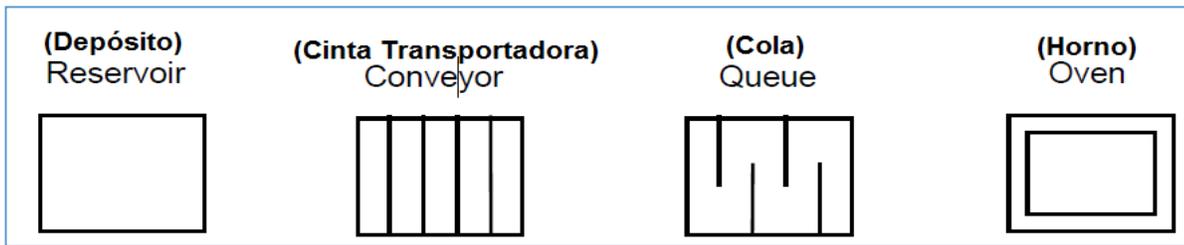


Figura 37. Las cuatro variedades de Stock (Inventario).

De lo visto hasta ahora se aprecia que los *sustantivos* son muy útiles, pero sin *verbos*, ¡no se puede llegar muy lejos al escribir algo significativo! Los *verbos* representan **acciones o actividades**. A diferencia de los *sustantivos*, que existen en un punto en el tiempo, los *verbos* existen a lo largo del tiempo. A medida que se producen los flujos, se actualizan las magnitudes de las existencias. La única forma de que cambie el nivel del agua en una bañera es que fluya agua nueva o que salga agua que está en la bañera. Sin flujos, las condiciones dentro de un sistema permanecerían estáticas. Entonces, ¡los flujos dan la dinámica!

Al igual que las acciones, los flujos pueden ser de *naturaleza física o no física*. En el aspecto físico, hay actividades como: erosionando, naciendo, entregando, muriendo, produciendo, migrando, descargando y lloviendo. En el lado no físico, hay actividades como: enojándose, generando confianza en sí mismo, frustrando, alabando, engatusando, debatiendo, discutiendo y aprendiendo. Note el uso del gerundio en todos los casos (“**ing**” en inglés). Es una buena práctica nombrar los flujos de esa forma, usando el gerundio del verbo. Al hacerlo, se elimina la ambigüedad (en particular, la confusión con los conceptos de **Stock**) y también se comunica mejor el movimiento. Considere, por ejemplo, la diferencia entre las palabras “*contratando*” y “*nuevas contrataciones*”. En la conversación, ambas se usan para referirse al volumen de personas que se han unido recientemente a una organización. Pero el primero es un concepto de *tasa*, o “*por tiempo*”, mientras que el segundo es un concepto “*en un punto en el tiempo*” (es decir, **Stock**). Por ejemplo, alguien podría decir que

se tienen diez "*nuevas contrataciones*". Esas "*nuevas contrataciones*" podrían haber ingresado a la empresa durante, por ejemplo, un período de seis meses. En ese sentido, constituyen una acumulación de personas, ¡un *Stock!* Pero si alguien utilizara el término "*contratando*", necesariamente estarían hablando de una acción. Estamos contratando a diez nuevas personas de aquí a fin de año. Por lo tanto, al nombrar sus flujos, en general, trate de usar los gerundios de los verbos, siempre que sea posible.

Uno de los beneficios reales que se derivan de usar el lenguaje *STELLA* de forma continua es que se aumenta la precisión y la claridad de las descripciones verbales. Las ambigüedades disminuirán y la comunicación será mucho más eficiente y efectiva. Y gran parte de esto proviene de simplemente *tener cuidado con la distinción entre Stocks y flujos*, una distinción que es vital para hacer una simulación mental o por computadora, de forma precisa. Ser capaz de hacer esta distinción es una habilidad central de pensamiento operacional. Los flujos vienen en menos sabores que las acciones. Hay dos variedades, y un "especial", pero para este enfoque inicial introductorio se utilizará sólo el tipo de flujo estándar, que se denomina "*uniflow*", que es la abreviatura de "*uni direccional*", o sea flujo en una sola dirección (Figura 39) (Barry Richmond, 2003).

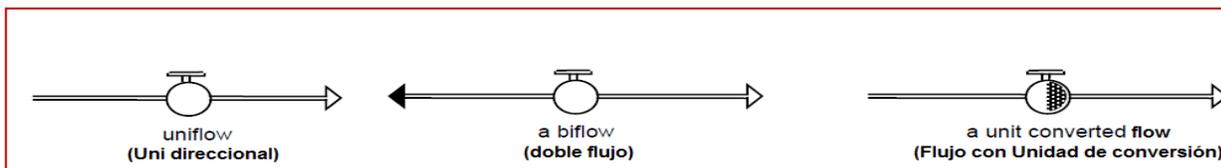


Figura 38. Variantes de flujos en STELLA.

En el camino hacia la escritura de historias cortas usando *STELLA*, el siguiente paso importante es aprender cómo unir oraciones. Para ello se utilizan los *conectores*, los que se usan para comunicarse con los *flujos*, que equivalen a las conjunciones en un lenguaje. Aquí es importante considerar que los *Stock* sólo pueden llenarse o vaciarse con los *flujos*, lo que impide que un *conector* pueda comunicar dos *Stocks*. Más abajo se verán las tres (aparentes) posibilidades que tienen de unirse los conectores a los demás componentes del Modelo en *STELLA* (Figura 40), de la que se aprecia que hay tres posibilidades, pero que la tercera no es posible, ya que comunica dos *Stocks* entre sí, lo que ya se conoce que no se permite.

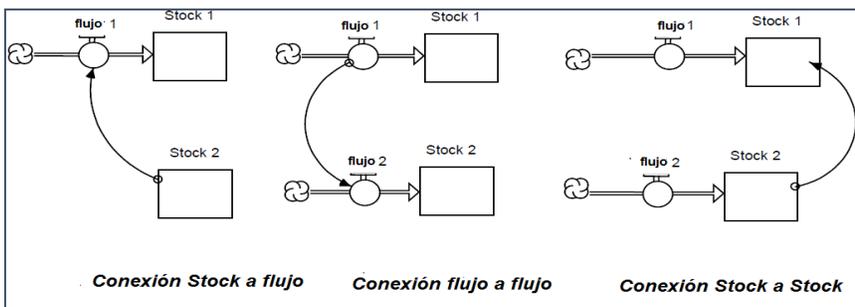


Figura 39. Variantes de uso de conectores en *STELLA*. Sólo la de la izquierda y del centro son válidas, la de la derecha no lo es.

Finalmente se introducen los *convertidores*, que se pueden considerar como los *adverbios* que modificar los *verbos* (*flujos*). A continuación, un modelo en *STELLA* en el que se introduce un *convertidor* y que servirá de base para explicar el funcionamiento de estos “*adverbios*” (Figura 41).

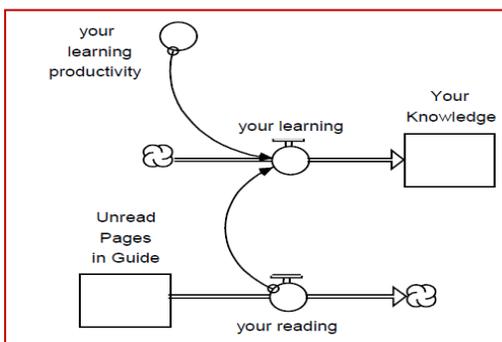


Figura 40. Modelo en *STELLA* que ejemplifica el uso de un convertidor.

En la Figura se aprecia un **convertidor** con el nombre de “su productividad de aprendizaje”, que actúa como *adverbio* que modifica al *verbo* (**flujo**), que tiene el nombre de “**aprendiendo**”. En este ejemplo el **convertidor** indica cuánto aprendizaje se produce para una unidad determinada de la “*actividad de conducción*” (en este caso, su *lectura*). Desde un punto de vista de coherencia unitaria, “*convierte*” las unidades que se introducen en el *flujo aprendiendo* a través del *flujo leyendo* (es decir, *páginas / tiempo*) a las unidades de aprendizaje apropiadas (*conocimiento / tiempo*), que incrementa el contenido del **Stock** “*Su conocimiento*”. Si se desea examinar el álgebra, se vería así:

$$\mathbf{aprendiendo} = \mathbf{leyendo} \times \mathbf{productividad\ de\ aprendizaje} \text{ (conocimiento / tiempo) (páginas / tiempo) (conocimiento / página)}$$

Hay que tener en cuenta que (*páginas / tiempo*) por (*conocimiento / página*) es igual a (*conocimiento / tiempo*), de modo que las unidades de medida en el lado izquierdo de la ecuación se equilibran con aquellas en el lado derecho de la Ecuación, lo que es bueno para todos. Finalmente, debemos aclarar que los **convertidores** pueden funcionar como algo más que adverbios: como adjetivos, participios colgantes y casi cualquier otra cosa. Los **convertidores** se transforman en un “*cajón de sastre*”, que sirve para: realizar operaciones algebraicas (como sumar o dividir), representar entradas exógenas y servir como sustitutos de acciones o flujos que se elijan (por razones de simplificación) para no representarse como tales. Estos detalles en el uso de los **convertidores** se aprenden en la práctica, por lo tanto, para la introducción actual es suficiente con los elementos brindados.

Anexo8. Resumen de Resultados de la Modelación del Proceso con SPD

8.2 Indicadores generales del proyecto.

1. Economía			
1.1 Inversión Total		68765	\$
1.2 Ingresos Totales		352968	\$/yr
2.3 Costos de Operación		134305	\$/yr
2.4 Tasa de Referencia/Unidad Prod.		3422.28	kg MP/yr
2.5 Costo Unitario de Producción			
	incluye depreciación	39.24	\$/kg MP
	excluye depreciación	37.72	\$/kg MP
MP = Flujo Total de la Corriente 'Gluc-Man'			
2. Índices del Proyecto			
2.1 Margen Bruto		61.95	%
2.2 Retorno de la Inversión		198.35	%
2.3 Tiempo de recuperación de inv.		0.50	years
2.4 TIR Antes de Impuestos		109.61	%
2.5 TIR Después de Impuestos		77.11	%
2.6 VAN (7.00 %)		836833	\$
3. Tamaño			
3.1 Rendimiento por Lotes		3.59	kg MP/batch
3.2 Rendimiento Anual		3422.28	kg MP/yr
MP = Flujo Total de la Corriente 'Gluc-Man'			

8.3 Resumen de materiales por kg de producto

1.1 Consumo de Materiales			
Material	kg/yr	kg/batch	kg/kg MP
Proteasa	88.42	0.09	0.03
Agua	119169.25	125.05	34.82
Levadura	16677.50	17.50	4.87
TOTAL	135935.17	142.64	39.72

8.4 Costo de materiales por año de producción

1.2 Costo de Material

Materiales al granel	Unit Cost (\$)	Annual Amount		Annual Cost (\$)	Cost (\$/kg MP)	%
Proteasa	0.00	88.00	kg	0.00	0.00	0.00
Agua	0.00	119169.00	kg	0.00	0.00	0.00
Levadura	0.50	16678.00	kg	8339.00	2.44	100.00
TOTAL	-	-	-	8339.00	2.44	100.00

1.3 Balance Global

(kg/Batch)

COMPONENTES	INITIAL	INPUT	OUTPUT	FINAL	OUT-IN
Carbohidratos	0.00	0.00	0.09	0.00	0.09
Comp. Hidrosolu	0.00	0.00	0.86	0.00	0.86
Restos celulares	0.00	0.00	0.03	0.00	0.03
Glucanos	0.00	0.00	1.72	0.00	1.72
Lípidos	0.00	0.00	2.57	0.00	2.57
Mananos	0.00	0.00	1.72	0.00	1.72
Nitrogen	0.03	0.00	0.03	0.01	0.00
Oxígeno	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00
Proteasa	0.00	0.09	0.04	0.00	- 0.049
Proteins	0.00	0.00	6.91	0.00	6.91
Agua	0.00	125.05	125.79	0.00	0.74
Levadura	0.00	17.50	0.35	0.00	- 17.152
Ácidos nucleicos	0.00	0.00	2.57	0.00	2.57
TOTAL	0.04	142.64	142.67	0.01	0.00

8.5 Resumen de Equipos (precios 2018).

Nombre	Tipo	Unid. Reserva o Escalonadas	Tamaño (Cap.)	Unidad	Material de Const.	Costo Const. (\$/Undad)
MX-101	Mixer	1	720	kg/h	CS	0
V-101	Decanter Tank	1	0.46	L	SS316	0
BM-101	Bead Mill	1	2.92	L	SS316	1,000
V-102	Decanter Tank	1	0.42	L	SS316	0
TDR-101	Tray Dryer	1	0.64	m2	SS316	1,000
MX-102	Mixer	1	24.26	kg/h	CS	0
FR-101	Fermentor	1	37.93	L	SS316	4,000
V-103	Decanter Tank	1	554.87	L	SS316	0
TDR-103	Tray Dryer	1	0.25	m2	SS316	1,000

8.6 Materiales auxiliares y mano de obra.

1.1 Demanda de Agente de Transferencia de Calor			
1.1a Demanda Total de Agente de Transferencia de Calor			
Heat Transfer Agent	kg/yr	kg/batch	kg/kg MP
Steam	4115.66	4.32	1.20
Steam (High P)	0.00	0.00	0.00
Cooling Water	0.00	0.00	0.00
Chilled Water	3877986.98	4069.24	1133.16
1.1b Demanda de Agente de Transferencia de Calor (Desglose por Sección)			
	kg/yr	kg/batch	kg/kg MP
Sección Principal	4115.66	4.32	1.20
TOTAL	4115.66	4.32	1.20
Vapor (Alta presión)			
	kg/yr	kg/batch	kg/kg MP
TOTAL	0.00	0.00	0.00
Agua de Enfriamiento			
	kg/yr	kg/batch	kg/kg MP
TOTAL	0.00	0.00	0.00
Agua enfriada			
	kg/yr	kg/batch	kg/kg MP
Sección Principal	3877986.98	4069.24	1133.16
TOTAL	3877986.98	4069.24	1133.16
1.1c Demanda de Agente de Transferencia de Calor (Desglose por Procedimiento)			
Vapor	kg/yr	kg/batch	kg/kg MP
Sección Principal			
P-5	1696.17	1.78	0.50
P-10	2419.48	2.54	0.71
Total de Sección	4115.66	4.32	1.20
TOTAL	4115.66	4.32	1.20
Vapor (Alta presión)			
	kg/yr	kg/batch	kg/kg MP
TOTAL	0.00	0.00	0.00
Agua de Enfriamiento			
	kg/yr	kg/batch	kg/kg MP
TOTAL	0.00	0.00	0.00
Agua enfriada			
	kg/yr	kg/batch	kg/kg MP
Sección Principal			
P-3	3856494.58	4046.69	1126.88
P-7	21492.40	22.55	6.28
Total de Sección	3877986.98	4069.24	1133.16
TOTAL	3877986.98	4069.24	1133.16

1.2 Demanda de Energía			
1.2a Demanda de Energía Total			
Tipo de Energía	kW-h/yr	kW-h/batch	kW-h/kg MP
Energía Estándar	40794.18	42.81	11.92
TOTAL	40794.18	42.81	11.92
1.2b Demanda de Energía (Desglose por Sección)			
Energía Estándar	kW-h/yr	kW-h/batch	kW-h/kg MP
Sección Principal	40794.18	42.81	11.92
TOTAL	40794.18	42.81	11.92
1.2c Demanda de Energía (Desglose por Procedimiento)			
Energía Estándar	kW-h/yr	kW-h/batch	kW-h/kg MP
Sección Principal			
P-3	32077.98	33.66	9.37
P-7	557.36	0.58	0.16
Equipos no incluidos en la relación	2039.71	2.14	0.60
Carga General	6119.13	6.42	1.79
Total de Sección	40794.18	42.81	11.92
TOTAL	40794.18	42.81	11.92

1.3 Demanda de Fuerza de Trabajo			
1.3a Demanda de Fuerza de Trabajo Total			
Tipo de Trabajo	trabajo-hrs/yr	trabajo-hrs/batch	trabajo-hrs/kg MP
Operador	23977.98	25.16	7.01
1.3b Demanda de Fuerza de Trabajo (Desglose por Sección)			
Operador	trabajo-hrs/yr	trabajo-hrs/batch	trabajo-hrs/kg MP
Sección Principal	23977.98	25.16	7.01
TOTAL	23977.98	25.16	7.01
1.3c Demanda de Fuerza de Trabajo (Desglose por Procedimiento)			
Operador	labor-hrs/yr	labor-hrs/batch	labor-hrs/kg MP
Sección Principa			
P-3	794.17	0.83	0.23
P-5	4765.00	5.00	1.39
P-7	13653.82	14.33	3.99
P-10	4765.00	5.00	1.39
Total de Sección	23977.98	25.16	7.01
TOTAL	23977.98	25.16	7.01

Indice de Imágenes

Imagen 1. Fotografías de colonias y cepas de <i>Bacillus subtilis</i> Colonias de bacilos de 2 a 4 mm de diámetro, beta-hemolíticas con hemólisis completa (izquierda); Cepas después de 24 horas de la tinción Gram, bacilos Gram positivos de 1,3 mm de diámetro por 3 a 5.	142
Imagen 2. Fotografías de cultivo puro obtenido y tinción de Gram vista en un microscopio con cabeza de tres oculares Olympus BX43 con cámara acoplada Morfología en placa (A) y tinción Gram para <i>Bacillus X2-10(2)</i> (B).....	142
Imagen 3. Tinción de Gram y verde malaquita a utilizada en la selección microorganismos aislados.....	142
Imagen 4. Medios y reactivos en la preparación de la bioquímica aplicada.	143
Imagen 5. Reactivación de microorganismos aislados y conservados en Caldo leche a -20°C.....	143
Imagen 6. . Frascos de fermentación para cultivo en medio modificado.	143
Imagen 8. Aislamiento de microorganismos puros, crecimiento en agar nutriente: AI-AII, tinción Gram positivo, bacilos en cadena; IB-IIB tinción Gram positiva, bacilos únicos; IC-IIC crecimiento y tinción bacilos formación mixta.	144
Imagen 7. Espectrofotómetro Nanodrop2000 para la medición de proteínas.....	144
Imagen 11. Halo de hidrólisis de cepa seleccionada (izquierda); Llenado de placas con medio caseína (derecha).	144
Imagen 9. Resultados de la prueba de hidrólisis de caseína: a. Placas de agar leche preparadas, b. Inoculación de placas, c. Crecimiento con formación de halo de hidrólisis a las 24 horas. d. Halo de hidrólisis a las 36 horas.....	144
Imagen 10. Árbol filogenético de bacterias y hongos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol se realizó en el programa MEGA 5.0, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.....	152

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- A. Calderoli Priscila. (2016). *Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos* (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. Recuperado de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/52022/Documento_completo__.pdf?sequence=3
- Abhrajyoti Ghosh, Krishanu Chakrabarti, & Dhruvajyoti Chattopadhyay. (2008). Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35, 825–834. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0354-5>
- Alejandro Luis Soraci, Fabián Amando, María Belén Fernández Paggi, Juan J. Oneto Sorondo, & Lic. Horacio Gerde. (2015, Agosto). *Efecto del uso de Levaduras Células Vivas y Paredes Celulares de Levaduras*. Presentación en evento científico internacional presentado en V Congreso Argentino de Nutrición Animal - CAENA 2015, Parque Norte, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Recuperado de <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/efecto-uso-levaduras-celulas-t32432.htm>
- Alex Armando Sáez Vega. (2006). Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* sp Alcalófilico. *Ingeniería y Ciencia*, 2(3), 29–38.
- Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz, Beatriz Rendón Aguilar, & Martha Graciela Rocha Munive. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (1a ed.). Mexico, D. F.: Semarnat.
- Angela B. Shiflet, & George W. Shiflet. (2006). *STELLA Version 9 Tutorial 1* (1a ed.). Princeton: Princeton University Press. Recuperado de <https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https://notendur.hi.is/sigridua/STELLA%20v9%20Tutorial%201.doc>
- Avelina Suárez Moya. (2017). Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Española de Quimioterapia Advance Access*, 1–7. Recuperado de <http://seq.es/seq/0214-3429/30/5/suarez17jul2017.pdf>
- Barry Richmond. (2003). *An Introduction to Systems Thinking* (1a ed.). Richmond, VA: Isee Systems, Inc.
- Basma Ghorbel, Alya Sellami, & Kamoun Moncef Nasri. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(5), 513–518. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00004-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00004-8)
- Biswanath Bhunia, Bikram Basak, Pinaki Bhattacharya, & Apurba Dey. (2012). Kinetic Studies of Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* NCIM - 2042. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 22(12), 1758–1766. Recuperado de <http://www.jmb.or.kr/journal/download.php?FileDir=./submission/Journal/022/&num=5159>
- Brian Mcneil, & Linda M. Harvey. (2008). *Practical Fermentation Technology*. West Sussex ,England: John Wiley & Sons Ltd,. Recuperado de <https://www.ifsc.usp.br/~ilanacamargo/FFI0740/4.pdf>
- Bruce Budowle, Steven E. Schutzer, James P. Burans, & et alii. (2006). Quality Sample Collection, Handling, and Preservation for an Effective Microbial Forensics Program. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6431–6438. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.01165-06>
- Carlo Pirola. (2016). *Main Guidelines of Scale up methodology*. Lecture in International Course presentado en Course Industrial Processes and Scale-up, Milano, Italia. Recuperado de <http://super.chem.polimi.it/academic-2/teaching/unimi-courses/scale-up/>
- Carlos Andrés Bastidas. (2016). Guía para Prácticas de Laboratorio de Microbiología (Carrera Biotecnología). Universidad Nacional de las Américas. Recuperado de <https://www.udla.edu.ec/laboratorios/wp-content/uploads/2016/06/IBT502-MICROBIOLOG%20C3%8DA-PARA-BIOTECNOLOG%20C3%8DA.pdf>
- Carrie Cupp-Enyard. (2008). Sigma’s Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *Journal of Visualized Experiments*, 19. <https://doi.org/10.3791/899>
- D. H. Bergley, & John G. Holt. (2000). *Bergey’s manual of determinative bacteriology* (9a ed.). Lippincott Williams&Wilki.

- Critical Studies on Kinetic Parameters for the Production of Protease from SSF By *Bacillus Subtilis* NCIM 2724. *Int. J. Chem. Sci.*, 8(2), 935–942. Recuperado de <https://www.tsijournals.com/articles/critical-studies-on-kinetic-parameters-for-theproduction-of-protease-from-ssf-by-bacillus-subtilis-ncim-2724.pdf>
- Microbiología e Inmunología. (2013). Pruebas Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3b_PruebasBioquimicas_17458.PDF
- Microbiología e Inmunología. (2010).. Guía de Trabajos Prácticos. Universdad de Buenos Aires.
- Diane Hoffoss. (2013). *How To Get Berkeley Madonna Working* (Parte de una asignatura). San Diego: University of San Diego. Recuperado de <http://home.sandiego.edu/~dhoffoss/teaching/math330/berkeley.pdf>
- Dirección Aplicaciones Meteorología. (2008). *Caracterización Climática del Departamento de Managua* (1a ed.). Managua: INETER. Recuperado de https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=http://www.bvsde.org.ni/Web_textos/INETER/INETER0065/7.%20Caracterizaci=n%20Climatica%20de%20MANAGUA.doc
- Dirk Nehring, Roberto A. Gonzalez-Castellanos, Peter Czermak, & Ralf Portner. (2006). Experimental and modelling study of different process modes for retroviral production in a fixed bed reactor. *Journal of Biotechnology*, 122, 239–253. Recuperado de www.elsevier.com/locate/jbiotech
- Dirk Nehring, Roberto González, Ralf Protner, & Peter Czermak. (2004). Experimental and modeling study of a membrane filtration process using ceramic membranes to increase retroviral pseudotype vector titer. *Journal of Membrane Science*, (237), 25–38.
- Douglas C. Montgomery. (2017). *Design and Analysis of Experiments* (9a ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Edward L. Paul, Victor A., Atiemo-Obeng, & Suzanne M. Kresta. (2004). *Handbook of Industrial Mixing. Science & Practice* (1a ed.). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Elizabeth Lira Silva, & Ricardo Jasso Chávez. (2013). Respuestas al problema bioquímico. *Revista de Educación Bioquímica*, 32(3), 112–118. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/reb/v32n3/v32n3a7.pdf>
- Erlendur Helgason, Nicolas J. Tourasse, Roger Meisal, Dominique A. Caugant, & Anne-Brit Kolstø. (2004). Multilocus Sequence Typing Scheme for Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 191–201. [https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.191–201.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.191-201.2004)
- Esveidi Montserrat Valdovinos García. (2014). *Síntesis del Proceso de Obtención de Ácido Giberélico en un Reactor de Tanque Agitado de Mezcla Completa* (Maestría en Ciencias en Ingeniería Química). Instituto Tecnológico de Celaya. Departamento de Ingeniería Química, Celaya, Guanajuato, México. Recuperado de http://www.iqcelaya.itc.mx/~jcfierro/index_archivos/topicos/valdovinos.pdf
- Fabian Galvis Serrano, & Laura Yolima Moreno Rozo. (2014). Caracterización molecular mediante rep-PCR de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis*, obtenidos de muestras de suelo. *Agronomía Costarricense*, 38(1), 223–229. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/267984422_Caracterizacion_molecular_mediante_rep-PCR_de_aislados_nativos_de_Bacillus_thuringiensis_obtenidos_de_muestras_de_suelo
- Francis X. McConville. (2006). *Pilot Plant Real Book. A Unique Handbook for the Chemical Process Industry* (2a ed.). Worcester MA: FXM Engineering and Design. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z730181?lang=en®ion=NI>
- Francisco Castillo-Reyes, Francisco Daniel Hernández-Castillo, Gabriel Gallegos-Morales, Alberto Flores-Olivas, Raúl Rodríguez-Herrera, & Cristóbal N. Aguilar. (2015). Efectividad in vitro de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 549–562. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n3/v6n3a9.pdf>
- Germán Bou, Ana Fernández-Olmos, Celia García, Juan Antonio Sáez-Nieto, & Sylvia Valdezate. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Gold Biotechnology. (2015, abril). Enzyme Units FAQ. For proteinase K and other proteases. GoldBio. Recuperado de <https://www.goldbio.com/documents/3629/Enzyme+Units-TechDoc.pdf>

- Grethel Milián, A. J. Rondón, 1, M. Pérez, L.M. Samaniego, 1, J. Riaño, R Bocourt, ... M. Laurencio. (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus* spp. en diferentes ecosistemas con fines probióticos. Su utilización en animales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(4), 347–351. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/1930/193033033007/>
- Heiner Giese. (2014). *Process Design Aspects for Small-Scale Fermentation Systems* (PhD Thesis). Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, Aachen. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/304783517_Process_Design_Aspects_for_Small_Scale_Fermentation_Systems
- Henry Pedroza, & Luis Dicoyski. (2007). *Sistema de análisis estadístico con SPSS*. Managua: IICA,.
- Hernando Alfonso Valencia Zapata. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales* (TRABAJO DE GRADO Presentado como requisito parcial para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8434/tesis404.pdf?sequence=1&isAllOwed=y>
- Huynh A. Hong, Ellen To, Saad Fakhry, Loredana Baccigalupi, Ezio Ricca, & Simon M. Cutting Our understanding of the genetics and physiology of the spore-forming genus *Bacillus* is remarkable. On the other hand, though, where these. (2009). Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Research in Microbiology*, (160), 375e379. <https://doi.org/doi:10.1016/j.resmic.2009.06.006>
- Huynh A. Hong, J-M Huang, & Simon M Cutting. (2008). The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology* 5}, 105(2), 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x>
- Intelligen Inc. (2013). *SuperPro Designer (SPD) Manual*. Intelligen Inc. Recuperado de <http://www.intelligen.com/demo.html>
- Iryna B. Sorokulova, Iryna V. Pinchuk, Muriel Denayrolles, Irina G. Osipova, Jen M. Huang, Simon M. Cutting, & Maria C. Urdaci. (2008). The Safety of Two *Bacillus* Probiotic Strains for Human Use. *Dig Dis Sci*, 53, 954–963. <https://doi.org/0.1007/s10620-007-9959-1>
- Isee System Inc. (2016). *Getting Started with iThink and STELLA*. Lebanon, NH: ISEE Inc. Recuperado de <http://static1.1.sqspcdn.com/static/f/64551/22912839/1371220918343/Getting+Started+with+iThink+and+STELLA.pdf?token=Nq5pjTmPFzgHFM3J1TGoLkKio1c%3D>
- Isabel Larrea Izurieta, Carlos Falconí Borja, Andrea Arcos Andrade. (2015). Isolation and characterization of strains of *Bacillus* spp. With activity against *Tetranychus urticae* Koch in commercial crops of roses. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 17, Núm. 2. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54291>
- J. M. Méndez-Úbeda, M. S. Flores Hernández, & L. A. Páramo-Aguilera. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96–110.
- James M. Lee. (2009). *Biochemical Engineering (Chapter 19 of Albright's Chemical Engineering Handbook)*. Boca Raton, FLA: CRC Press.
- Jason S. Crater, & Jefferson C. Lievens. (2018). Scale-up of industrial microbial processes. *FEMS Microbiology Letters*, (365). <https://doi.org/doi:10.1093/femsle/fny138>
- Jeanny Paola Cuervo Lozada. (2010). *Aislamiento y Caracterización de Bacillus Spp como Fijadores Biológicos de Nitrógeno y Solubilizadores de Fosfatos en dos Muestras en Biofertilizantes Comerciales* (Requisito parcial para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Recuperado de www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf
- Jeff Lievens. (May 10th 2016). *Scaling up Industrial Biotechnology*. Conference Presentation presentado en 7th Life Science Symposium, Delf. Recuperado de <https://www.genomatica.com/wp-content/uploads/2017/01/20160510-7th-Life-Sci-Symp-Lievens.pdf>
- Jeff Lievens. (2014). *Successfully Scaling Up Industrial Fermentations of Chemicals and Fuels*. Presentacion in Conference presentado en 2014 BIO World Congress on Industrial Biotechnology, Filadelfia.

- Recuperado de <http://www.ascension-publishing.com/BIZ/scaleup-Genomatica-Lievens-052014.pdf>
- Jim Lane. (2014). No Shortcuts to the Top: A Digest Special Report on Scale-up in Industrial Biotechnology [Renewable Energy]. Recuperado de <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/05/20/no-shortcutsto-the-top-a-digest-special-report-on-scale-up-in-industrialbiotechnology/>
- José Antonio García-García, Arturo Reding-Bernal, & Juan Carlos López-Alvarenga. (2013). Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en Educación Médica*, 2(8), 217–224. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=349733226007>
- Kanupriya Miglani Sharma, Rajesh Kumar, Surbhi Panwar, & Ashwani Kumar. (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15, 115–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>
- M. L. E. Halmi, M. S. Shukor, W. L. W. Johari, & M.Y. Shukor. (2014). Mathematical modelling of the degradation kinetics of *Bacillus cereus* grown on phenol. *Journal of Environmental Bioremediation and Toxicology*, 2(1), 1–5. Recuperado de <http://journal.hibiscuspublisher.com/index.php/JEBAT/article/download/138/173>
- M. Pérez, Lilian Sánchez, R. Piad, D. Bocourt, Grethel Milián, G. Alfonso, ... Janet Tambara. (2001). Caracterización físico química de un hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* y su comparación con diferentes tipos de hidrolizados. *Revista de Salud Animal*, 23(3), 153–159. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Yanet_Tambara_Hernandez/publication/257958881_Caracterizacion_fisico_quimica_de_un_hidrolizado_enzimatico_de_Saccharomyces_cerevisiae_y_su_comparacion_con_diferentes_tipos_de_hidrolizados/links/02e7e5267c55c76929000000/Caracterizacion-fisico-quimica-de-un-hidrolizado-enzimatico-de-Saccharomyces-cerevisiae-y-su-comparacion-con-diferentes-tipos-de-hidrolizados.pdf
- Manuel L. Pérez Quintana. (2000). *Obtención de un hidrolizado de Saccharomyces cerevisiae y evaluación de su actividad probiótica* (Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias). Instituto de Ciencia Animal y Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, La Habana.
- Manuel Pérez Quintana, Grethel Milian Florido, Ramón Bocourt Salabarría, & Reinaldo Alemán Pérez. (2016). Evaluación in vitro de prebióticos en hidrolizados de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) preparados por diferentes métodos. *La Técnica. Revista de las Agrociencias*, 16(julio-diciembre), 64–75. Recuperado de <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/latecnica/article/view/537/408>
- Marcela Alejandra Ferrero. (1995). *Estudios de producción de proteasas en especies del género Bacillus* (Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. Recuperado de http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n2745_Ferrero.pdf
- María Elena Realpe, Carlos Arturo Hernández, & Clara Inés Agudelo. (2002). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Biomédica, En línea*(22), 106–109. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84322204>
- María José Castañón Gonzalez. (2009). *Efecto de la adición de hidrolizados de levadura Saccharomyces cerevisiae en la obtención de leches acidificadas* (Memoria para optar al Título de Ingeniero en Alimentos). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Santiago de Chile. Recuperado de http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-castanon_mj/pdfAmont/qf-castanon_mj.pdf
- Michael T. Madigan, John M. Martinko, David A. Stahl, & David P. Clark. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13a ed.). San Francisco, CA: Pearson Education, Inc.,.
- Mohanasrinivasan Vaithilingam, Subathra Devi C, Sayanti Gupta, Debarati Paul, Priyanka Sahu, Jemimah Naine, & Vaishnavi Babu. (2016). Extraction of Nattokinase Enzyme from *Bacillus cereus* Isolated from Rust. *National Academy Science Letters*, 39(4), 263–267. <https://doi.org/DOI: 10.1007/s40009-016-0476-7>

- Mónica Balzarini, Julio Di Rienzo, Margot Tablada, Laura Gonzalez, Cecilia Bruno, Mariano Córdoba, ... Fernando Casanoves. (2015). *Estadística y Biometría. Ilustraciones del Uso de InfoStat en Problemas de Agronomía* (2a ed.). Argentina: Editorial Brujas.
- Mónica G. Balzarini, Laura A. Gonzalez, Elena M. Tablada, Fernando Casanoves, Julio A. Di Rienzo, & Carlos W. Robledo. (s/f). *InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario* (1a ed.). Córdoba, Argentina: Editorial Brujas. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/283569520_Software_estadistico_InfoStat_Manual_de_usuario_Version_1
- Nurul Sa'adah Sulaiman. (2015). *Scale-Up of Chemical Engineering Process*. Lecturer in Course presentado en Chemical Engineering Scaleup Post Graduate Course, Kuantan. Recuperado de http://ocw.ump.edu.my/pluginfile.php/6764/mod_resource/content/4/Chapter%201.pdf
- Paul Cos, Arnold J. Vlietinck, Dirk Vanden Berghe, & Louis Maes. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, (106), 290–302. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jep.2006.04.003>
- Raina M. Maier, & Ian L. Pepper. (2015). *Bacterial Growth (Chapter 3 from Environmental Microbiology, Editors: Ian Pepper Charles Gerba Terry Gentry*. (3a ed.). Elsevier.
- Rajasekar Vinayagam¹, Ramachandra Murty Vytla, & Muthukumaran Chandrasekaran. (2015). Development of a Simple Kinetic Model and Parameter Estimation for Biomass and Nattokinase Production by *Bacillus subtilis* 1A752. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 2(2), 5. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/273085725_Development_of_a_Simple_Kinetic_Model_and_Parameter_Estimation_for_Biomass_and_Nattokinase_Production_by_Bacillus_Subtilis_1A752
- Raúl E. Piad Barreras. (2001). *Obtención y evaluación de probióticos para la producción avícola* (Tesis en opción al Título de Doctor en Ciencias Veterinarias). Instituto de Ciencia Animal y Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos", La Habana.
- Raúl E. Piad Barreras, & Roberto A. Gonzalez Castellanos. (2008). Resultados obtenidos con la aplicación en Nicaragua del hidrolizado de levadura con crudo enzimático microbiano, en la producción animal, a pequeña escala. GENERIFAR S. A.
- Raúl E. Piad Barreras, Roberto A. Gonzalez-Castellanos, Elda Alejandra Gonzalez, Nadir Reyes, & Hermes Gonzalez. (2011). Evaluación de un nuevo producto prebiótico producido a Escala de Banco, en indicadores productivos y fisiológicos digestivos en pollos de engorde. *El Acontecer Digital UPOLI*, 1, 4–13. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/266374376_Evaluacion_de_un_nuevo_producto_prebiotico_producido_a_Escala_de_Banco_en_indicadores_productivos_y_fisiologicos_digestivos_en_pollos_de_engorde
- Robert Macey, George Oster, & Tim Zahnley. (2009, diciembre). Berkeley Madonna User's Guide Version 8.0.2. University of California. Recuperado de <http://www.berkeleymadonna.com/BM%20User%27s%20Guide%208.0.2.pdf>
- Roberto A. Gonzalez Castellanos. (2014a). *Introducción General a los Bioprocesos*. Presentación en Curso de Maestría presentado en Maestría Interinstitucional en Biotecnología, Universidad Politécnica de Nicaragua, Managua, Nicaragua. Recuperado de https://www.academia.edu/36813528/Introducci%C3%B3n_a_los_Bioprosesos_act._2018_
- Roberto A. González Castellanos. (2014). *Simulación de Reactores Biológicos*. Presentación en Curso de Maestría presentado en Maestría Interinstitucional en Biotecnología, Universidad Politécnica de Nicaragua, Managua, Nicaragua. Recuperado de <https://zenodo.org/record/1295739/files/Modelaci%C3%B3n%20y%20Simulacion%20Biotecnol%C3%B3gica%20%28act.%2009-06-2018%29.pdf>
- Roberto A. Gonzalez Castellanos. (2014b, febrero). *Simulación del flujograma de los procesos biotecnológicos*. Presentación en Curso de Maestría presentado en Maestría Inter institucional en

- Biología, Universidad Politécnica de Nicaragua (UPOLI). Recuperado de <https://zenodo.org/record/1295741#.W4th7s4zZpg>
- Roberto A. Gonzalez Castellanos. (2018a). *Dinámica de Sistemas. Softwares disponibles* (1a ed.). Seattle, Washington: Independent Publisher.
- Roberto A. Gonzalez Castellanos. (2018b). *Escalado de Procesos. Principios Básicos* (1a ed.). Seattle, Washington: Independent.
- Roberto A. Gonzalez Castellanos. (2018c). *Introducción a la Modelación Matemática y la Simulación* (1a ed.). Seattle, Washington: Independent Publisher.
- Roberto A. Gonzalez Castellanos. (2018d). *Softwares matemáticos. Su uso en Ingeniería y Ciencias* (1a ed.). Seattle, Washington: Independent Publisher.
- Roberto A. González Castellanos, M. L. Pérez, N. L. Velunza, Bárbara Rodríguez, G. Ascunse, M. Redondo, ... W. García. (2000). Desarrollo de la producción industrial de hidrolizado de sangre bovina con el uso de enzimas proteolíticas microbianas. *Tecnología Química*, XX(3). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/282576862_DESARROLLO_DE_LA_PRODUCCION_INDUSTRIAL_DE_HIDROLIZADO_DE_SANGRE_BOVINA_CON_EL_USO_DE_ENZIMAS_PROTEOLITICAS_MICROBIANAS_TITLE_INDUSTRIAL_PRODUCTION_DEVELOPMENT_OF_BOVINE_BLOOD_HYDROLYZED_BY_USING_MICRO
- Roberto A. Gonzalez Castellanos, & Manuel L. Perez. (2000). Desarrollo de la Producción Industrial de un Extracto Crudo de Enzimas Proteolíticas Microbianas. *Tecnología Química*, XX(2). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/327253907_Desarrollo_de_la_Produccion_Industrial_de_un_Extracto_Crudo_de_Enzimas_Proteoliticas_Microbianas
- Roberto A. Gonzalez Castellanos, & Raúl E. Piad Barreras. (2009). Resumen del Escalado de la producción de hidrolizados proteicos con un crudo de enzimas proteolítica microbianas. Universidad Politécnica de Nicaragua (UPOLI).
- Roberto A. Gonzalez Castellanos, Raúl E. Piad Barreras, Elda A. Gonzalez, Charlie Tinoco Mccrea, & Arlen María Gutiérrez. (2015, abril). Proyecto Tecnológico de la Planta de Producción y Comercialización del Aditivo Alimentario PCL Glucano. UPOLI.
- Roberto A. Gonzalez, Mehrdad Ebrahimi, & Peter Czermak. (2009). Experimental and Modeling Study of Galactosyl-Oligosaccharides Formation in Continuous Recycle Membrane Reactors (CRMR). *The Open Food Science Journal*, 3, 1–9. Recuperado de <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOFSJ-3-1>
- Roberto A. González, Raúl E. Piad Barreras, & Elda Alejandra Gonzalez. (2010). *Sustitución de antibióticos promotores del crecimiento en la producción animal, por aditivos alternativos producidos en Nicaragua (Capítulo 12 del libro Aspectos probióticos y tecnológicos de las bacterias lácticas)* (1a ed.). La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Roberto_A_Gonzalez/publication/275464388_Sustitucion_de_Antibioticos_Promotores_del_Crecimiento_en_la_Produccion_Animal_por_Aditivos_Alternativos_Producidos_en_Nicaragua/links/553d46490cf29b5ee4bcc2e4/Sustitucion-de-Antibioticos-Promotores-del-Crecimiento-en-la-Produccion-Animal-por-Aditivos-Alternativos-Producidos-en-Nicaragua.pdf
- Roger G. Harrison, Paul W. Todd, Scott R. Rudge, & Demetri P. Petrides. (215d. C.). *Bioseparations Science and Engineering* (2a ed.). New York, NY: Oxford University Press.
- S. Yang, Q. Yan, Q. Bao, J. Liu, & Z. Jiang. (2016). Expression and biochemical characterization of a novel type I pullulanase from *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Lett.*, 39(3), Biotechnol Lett. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2255-4>
- Sathyanarayana N. Gummadi. (2017). *Biochemical Reaction Engineering (Chapter 6 of Coulson & Richardson's Chemical Engineering Volume 3A, Chemical & Biochemical Reactors)* (4a ed., Vol. 1). Cambridge, MA, United States: Butterworth-Heinemann.
- Shijie Liu. (2017). *Bioprocess Engineering. Kinetics, Sustainability, and Reactor Design* (2a ed.). Amsterdam: Elsevier.

- Syed Tanveer, & Ahmed Inamdar. (2012). *Biochemical Engineering. Principles and Concepts* (3a ed.). Phi Learning Pvt. Ltd.
- Víctor Manuel Trejos, Javier Fontalvo Alzate, & Miguel Ángel Gómez García. (2009). Descripción matemática y análisis de estabilidad de procesos fermentativos. *DYNA*, 76(158), 111–121. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/10251/13419>
- Vijai K. Pasupuleti, & Steven Braun. (2010). *State of the Art Manufacturing of Protein Hydrolysates (Chapter 2 of "Protein Hydrolysates in Biotechnology", V.K. Pasupuleti and A.L. Demain (eds.),* (1a ed.). Springer Science+Business Media B.V.
- Wikipedia. (2016, enero). Hydrolysate. Wikipedia. Recuperado de <https://en.wikipedia.org/wiki/Hydrolysate>
- Wikipedia. (2017, junio). Scale (chemistry). Wikipedia Commons.
- Wikipedia. (2018a, julio). Bacillus. Wikipedia Commons. Recuperado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus>
- Wikipedia. (2018b, agosto). Enzyme assay. Wikipedia. Recuperado de https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme_assay
- Wikipedia. (2018c, septiembre). Cinética Enzimática. Wikimedia. Recuperado de https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Cinética_enzimática&oldid=110437823
- William L. Cody, James W. Wilson, David R. Hendrixson, Kevin S. McIver, Kayla E. Hagman, C. M. Ott, ... Michael J. Schurr. (2008). Skim Milk Enhances the Preservation of Thawed -80°C Bacterial Stocks. *J Microbiol Methods*, 75(1), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.006>
- Wolf Klöckner, Riad Gacem, Tibor Anderlei, Nicole Raven, Stefan Schillberg, Clemens Lattermann, & Jochen Büchs. (2007). Correlation between mass transfer coefficient $k_L a$ and relevant operating parameters in cylindrical disposable shaken bioreactors on a bench to pilot scale. *Journal of Biological Engineering*, 7(28). <https://doi.org/10.1186/1754-1611-7-28>
- Wolf Klöckner, Sylvia Diederichs, & Jochen Büchs. (2015). Orbitally Shaken Single-Use Bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 138, 45–60. https://doi.org/10.1007/10_2013_188
- Wolfgang Aehle. (2007). *Enzymes in Industry. Production and applications* (3a ed.). Leiden, The Netherlands: WILEY-VCH Verlag GmbH.