

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Evaluación de la producción de PGA a partir de cepas de *Bacillus subtilis* aisladas en cultivos de cacao en Ecuador

Danilo Fernando Serrano Enríquez

Ingeniería Química

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero Químico

Quito, 20 de diciembre de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Evaluación de la producción de PGA a partir de cepas de *Bacillus subtilis*
aisladas en cultivos de cacao en Ecuador**

Danilo Fernando Serrano Enríquez

Nombre del profesor, Título académico

José Álvarez, Ph.D.

Quito, 20 de diciembre de 2022

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Danilo Fernando Serrano Enríquez

Código: 207070

Cédula de identidad: 1725349581

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2022

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el potencial de producción de ácido poliglutámico (PGA) de 7 cepas de *Bacillus subtilis* en función de su capacidad de aumentar la viscosidad del medio, su consumo de azúcares y su crecimiento celular. Se probó realizar fermentaciones de 48 horas en reactores batch, planchas de calentamiento y agitación y una incubadora agitada. Se determinó que las mejores condiciones para la fermentación se dan en la incubadora agitada a 180rpm, 37°C y regulando el pH a 7 cada 6 horas. Luego, se evaluó el efecto de la concentración de glutamato monosódico en el medio de cultivo variando su concentración a 12g/L y 48g/L. Se encontró que una alta concentración de este reactivo tiende a reducir el crecimiento celular, el consumo de azúcares y el aumento de la viscosidad en el medio. Finalmente, se determinó que BS03, BS23 y BS50 fueron las cepas con mejor potencial siendo esta última la cual mostró el mejor desempeño en general.

Palabras clave: ácido poliglutámico, fermentación, viscosidad, *Bacillus subtilis*, pH, glutamato monosódico.

ABSTRACT

In the present work, the potential for the production of polyglutamic acid (PGA) of 7 strains of *Bacillus subtilis* was evaluated based on their ability to increase the viscosity of the medium, their consumption of sugars and their cell growth. Fermentations of 48 hours were tested in batch reactors, heating and agitation plates and a stirred incubator. It was determined that the best conditions for fermentation occur in the shaken incubator at 180rpm, 37°C and regulating the pH to 7 every 6 hours. Then, the effect of the concentration of monosodium glutamate in the culture medium was evaluated by varying its concentration to 12g/L and 48g/L. It was found that a high concentration of this reagent tends to reduce cell growth, sugar consumption and increased viscosity in the medium. Finally, it was determined that BS03, BS23 and BS50 were the strains with the best potential, the latter one showed the best overall performance.

Key words: polyglutamic acid, fermentation, viscosity, *Bacillus subtilis*, pH, monosodium glutamate.

TABLA DE CONTENIDO

1.	Introducción.....	13
2.	Metodología y materiales.....	14
2.1	Activación.....	15
2.2	Preparación del inóculo.....	15
2.3	Fermentación.....	16
2.4	Establecimiento de un protocolo de fermentación para la producción de PGA ..	16
2.5	Evaluación del efecto del glutamato monosódico ..	17
2.6	Mediciones.....	17
2.7	Análisis estadístico.....	18
3.	Resultados.....	18
4.	Discusiones	36
5.	Conclusiones.....	38
6.	Recomendaciones	39
7.	Referencias bibliográficas.....	40
	Anexo A: fermentación exploratorias.....	43
	Anexo B: Comparación en parejas de Tukey a través de un estudio ANOVA para todos los resultados	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Matriz de decisión para escoger las 3 mejores cepas.....	30
Tabla 2. Matriz de decisión para escoger la cepa con mayor potencial.....	35
Tabla 3. Condiciones durante fermentaciones de exploración	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de bloque de la metodología general de trabajo.	15
Figura 2. Densidad óptica del inóculo luego de 48 horas de incubación para fermentación en reactores batch AMPTS.	19
Figura 3. Cinética de crecimiento de las cepas de <i>B. subtilis</i> en reactores AMPTS, expresada como densidad óptica del cultivo en función del tiempo.	20
Figura 4. Porcentaje remanente de azúcares reductores en el medio de fermentación utilizando reactores AMPTS en función del tiempo.	21
Figura 5. Viscosidad del medio de fermentación utilizando reactores AMPTS en función del tiempo, como medida indirecta de la cantidad de PGA producida.	22
Figura 6. Cinética de crecimiento celular en incubadora agitada expresada como densidad óptica medida a 600nm del en función del tiempo.....	23
Figura 7. Consumo de azúcares logrado en incubadora agitada expresado como concentración de azúcares disueltas en el medio de fermentación en función del tiempo	24
Figura 8. Cantidad de PGA contenida en el medio de fermentación preparado en incubadora agitada expresado como viscosidad en función del tiempo.	25
Figura 9. Densidad óptica del inóculo luego de 48 horas de incubación expresada como absorbancia a 600nm.....	26
Figura 10. Crecimiento celular logrado en una incubadora agitada expresado como densidad óptica medida a 600nm en función del tiempo.	27
Figura 11. Consumo de azúcares utilizando incubadora expresado como azúcares disueltas en el medio de fermentación en función del tiempo.	28
Figura 12. Cantidad de PGA contenida en el medio expresada como de viscosidad en función del tiempo.....	29

Figura 13. Densidad óptica del inóculo luego de 48 horas de incubación expresada como absorbancia a 600nm.....	31
Figura 14. Crecimiento celular conseguido en una incubadora agitada expresada como absorbancia del medio de fermentación a 600nm en función del tiempo. Los resultados logrados en 12 g/L de glutamato se grafican en azul y en 48 g/L, en naranja.	32
Figura 15. Consumo de azúcares logrado en una incubadora expresado como azúcares disueltas en el medio en función del tiempo. Los resultados logrados en medio 12 se grafican en azul y en medio 48, en naranja.	33
Figura 16. Viscosidad del medio de fermentación, como medida indirecta de producción de PGA, en la incubadora agitada. Los resultados logrados en medio 12 se grafican en azul y en medio 48, en naranja.....	34
Figura 17. Densidad óptica expresada como absorbancia a 600nm del medio de fermentación en función del tiempo.....	43
Figura 18. Consumo de azúcares expresado como azúcares disueltas en el medio de fermentación en función del tiempo.....	44
Figura 19. Cantidad de PGA contenida en el medio de fermentación en función del tiempo evidenciada como cambio de viscosidad.	44
Figura 20. Comparación estadística de la densidad óptica lograda después de 48 horas de inóculo para fermentación en reactores AMPTS.	45
Figura 21. Comparación estadística del consumo porcentual de azúcares logrado en reactores AMPTS.....	45
Figura 22. Comparación estadística de la densidad óptica lograda en reactores AMPTS a las 3 horas de fermentación	46
Figura 23. Comparación estadística de la densidad óptica lograda en reactores AMPTS a las 24 horas de fermentación	46

Figura 24. Comparación estadística de la densidad óptica lograda en reactores AMPTS a las 48 horas de fermentación	46
Figura 25. Comparación estadística del cambio de viscosidad lograda en reactores AMPTS	47
Figura 26. Comparación estadística de la densidad óptica lograda después de 48 horas de inóculo para fermentación en incubadora microbiológica.	47
Figura 27. Comparación estadística del consumo de azúcares a las 20 horas de fermentación en incubadora.	47
Figura 28. Comparación estadística del consumo de azúcares a las 44 horas de fermentación en incubadora.	48
Figura 29. Comparación estadística de la densidad óptica a las 20 horas de fermentación lograda en incubadora.	48
Figura 30. Comparación estadística de la densidad óptica a las 44 horas de fermentación lograda en incubadora.	48
Figura 31. Comparación estadística de la viscosidad a las 20 horas de fermentación lograda en incubadora.	49
Figura 32. Comparación estadística de la viscosidad a las 44 horas de fermentación lograda en incubadora.	49
Figura 33. Comparación estadística de la densidad óptica lograda después de 48 horas de inóculo para fermentación en incubadora de las 3 mejores cepas.....	49
Figura 34. Comparación estadística del consumo de azúcares a 0 horas de fermentación utilizando las 3 mejores cepas en incubadora	50
Figura 35. Comparación estadística del consumo de azúcares a 10 horas de fermentación utilizando las 3 mejores cepas en incubadora	50

Figura 36. Comparación estadística del consumo de azúcares a 20 horas de fermentación utilizando las 3 mejores cepas en incubadora	50
Figura 37. Comparación estadística del consumo de azúcares a 36 horas de fermentación utilizando las 3 mejores cepas en incubadora	51
Figura 38. Comparación estadística del consumo de azúcares a 44 horas de fermentación utilizando las 3 mejores cepas en incubadora	51
Figura 39. Comparación estadística de la densidad óptica a las 10 horas de fermentación de las 3 mejores cepas lograda en incubadora	51
Figura 40. Comparación estadística de la densidad óptica a las 20 horas de fermentación de las 3 mejores cepas lograda en incubadora	52
Figura 41. Comparación estadística de la densidad óptica a las 36 horas de fermentación de las 3 mejores cepas lograda en incubadora	52
Figura 42. Comparación estadística de la densidad óptica a las 44 horas de fermentación de las 3 mejores cepas lograda en incubadora	52
Figura 43. Comparación estadística de la proporción de viscosidad medida a las 10 horas de fermentación con relación al medio original.....	53
Figura 44. Comparación estadística de la proporción de viscosidad medida a las 20 horas de fermentación con relación al medio original.....	53
Figura 45. Comparación estadística de la proporción de viscosidad medida a las 36 horas de fermentación con relación al medio original.....	53
Figura 46. Comparación estadística de la proporción de viscosidad medida a las 44 horas de fermentación con relación al medio original.....	54

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el ácido poli γ - glutámico (PGA) es utilizado mayormente como un aditivo en cosmética gracias a su capacidad de incrementar la cantidad de sustancias hidratantes en la piel como por ejemplo ácido urocánico, ácido láctico y otros compuestos carboxílicos (Luo et al., 2016). No obstante, existen investigaciones que proponen al PGA como una solución innovadora para problemas en diversas áreas. Algunos ejemplos son el transporte de fármacos, debido a su capacidad como encapsulante (Khalil et al., 2017), o para el mejoramiento de los electrodos de silicio en baterías debido a su apropiada capacidad de retención (Jia, Ming, Guo et al., 2022). Adicionalmente, en el campo de la ingeniería de tejidos, el PGA ha sido utilizado para formar un complejo con quitosano a través de interacción electrostática formando así microesferas. Estas fueron cargadas con condrocitos, y, después de 8 semanas produjeron matriz cartilaginosa in vivo, en comparación a microesferas de otro tipo (Fang et al., 2014).

Adicionalmente, el PGA se puede hallar de forma natural en un plato japonés llamado Natto (Ashiuchi et al., 2015). Este contiene PGA debido a que se prepara como una fermentación de soya con bacterias *Bacillus subtilis natto* (Lampe & English, 2016). Este plato japonés se ha relacionado con un mejoramiento en la absorción de calcio en el organismo y se piensa que esto es gracias a su alto contenido de PGA (Tanimoto et al., 2001).

Actualmente, el PGA a nivel industrial es producido utilizando microorganismos incluyendo especies como *bacillus subtilis*, *bacillus licheniformis* o *bacillus amyloliquefaciens*. El proceso generalmente está compuesto por un cultivo para el inóculo, una fermentación para obtener PGA, una centrifugación para retirar la biomasa, una precipitación para recuperar el PGA bruto, tantas filtraciones como sea necesario y finalmente, un secado

por liofilización (Zhang et al., 2022). Normalmente, este proceso utilizando *bacillus licheniformis* suele producir unos 390 mg/L (Campos et al., 2020).

En consecuencia, se puede decir que el PGA es un compuesto prometedor con varias aplicaciones en diversos campos. Del mismo modo, se puede afirmar que el tamaño de mercado de PGA crecerá significativamente en el futuro inmediato. De hecho, el mercado de PGA estuvo valorado en USD 9.54 billiones en el 2020 y se estima que crecerá un 7.6% en términos de beneficios entre el 2021 y 2028. (Glutamic Acid Market Size & Share Analysis Report 2028, n.d.).

En Ecuador se han aislado siete cepas de *Bacillus subtilis* mismas que ya se han estudiado en el marco de la producción de ácido láctico (Castells et al., 2022). A pesar de haber demostrado tener capacidad de producir ácido láctico, este es un metabolito de poco valor agregado comercialmente. Es por esto que vale la pena explorar el uso de estas cepas en la producción de metabolitos de mayor valor agregado e interés comercial, como el PGA. En consecuencia, el presente trabajo se planteó evaluar la capacidad de producción de PGA de siete cepas de *Bacillus subtilis* aisladas de cacao cultivado en Guayas, Ecuador. Este estudio observó el comportamiento de las cepas en función de la concentración de glutamato monosódico y comparó los efectos de fermentar en reactores batch, planchas con agitación y una incubadora para finalmente escoger la cepa con mayor potencial.

2. METODOLOGÍA Y MATERIALES

Para el desarrollo de este proyecto se realizaron fermentaciones aerobias con *Bacillus subtilis* en tres etapas: la primera etapa fue una activación de las cepas que se encontraban almacenadas a -80°C, la segunda es un cultivo de inoculación con el objetivo de conseguir una

mayor población de estos microorganismos y la tercera es un cultivo de fermentación con el objetivo de producir PGA.

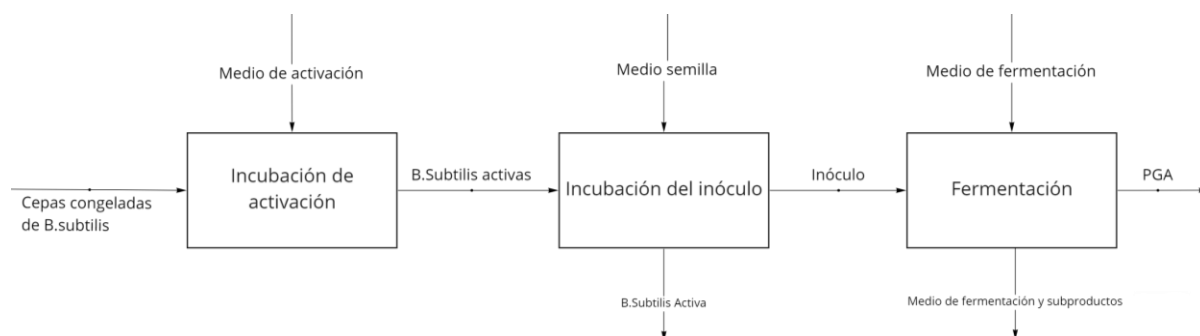


Figura 1. Diagrama de bloque de la metodología general de trabajo.

2.1 Activación

Las cepas de *B. Subilis* utilizadas fueron aisladas de diferentes cultivos de *Theobroma cacao* L, en la provincia de Guayas, Ecuador, y provienen del banco de microorganismos del Centro de Investigaciones Biológicas del Ecuador, CIBE, de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL. Para activarlas, se tomaron las cepas en almacenamiento criogénico (-80°C) y se sembraron en medio nutritivo (3 g/L extracto de carne, 5 g/L peptona y 15 g/L agar-agar, pH 7) (Castells, 2018). Posteriormente, se incubaron durante 48 horas a 37°C en una incubadora microbiológica agitada del proveedor HYSC. Las cepas utilizadas específicamente están codificadas como BS03 (KY671140.1), BS07 (MK160141.1), BS18 (MK160141.1), BS23 (MK156398.1), BS31 (MF988704.1), BS34 (MK156148.1) Y BS50 (MK160141.1) (Castells et al., 2022).

2.2 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó raspando las cepas correspondientes con isopos estériles y sembrando cada una en un medio semilla adaptado de Wang et al. (2022), cuya composición fue: 10g/L triptona, 5g/L extracto de levadura, 10g/L NaCl y 10g/L glucosa. Posteriormente,

se incubaron durante 48 horas a 37°C y 100rpm en una incubadora microbiológica agitada (HYSC).

2.3 Fermentación

Las fermentaciones se prepararon tomando los inóculos y regulando su densidad óptica a 0.29, medida a 600nm (Castells, 2018). A continuación, se sembró 10% de inóculo regulado respecto al medio de fermentación utilizado. Este medio de fermentación fue tomado y adaptado de Wang et al. (2022). Su composición fue: 24g/L glutamato monosódico, 10g/L NaCl, 1.02g/L $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0.4g/L $CaCl_2 \times 2H_2O$, 4.5g/L KH_2PO_4 , 2.8g/L K_2HPO_4 y 40g/L glucosa. Posteriormente se incubó durante 48h a 37°C, y a 180rpm.

2.4 Establecimiento de un protocolo de fermentación para la producción de PGA

Se realizó una evaluación preliminar de la capacidad de producción de PGA de las siete cepas llevando a cabo fermentaciones en los reactores batch del Sistema automático de prueba de potencial de metano (AMPT, BPC Instruments). El sistema utilizado, AMPTs II Light, tiene 6 reactores batch de 2L de capacidad. Las fermentaciones se llevaron a cabo durante 48 horas, a 37°C y 50rpm. Estos reactores cuentan con dos boquillas: la primera para la extracción de muestra y la segunda para la admisión de aire. La primera boquilla consta de dos mangueras y una jeringuilla y la segunda de una manguera y un filtro de aire. Debido estas características de los reactores, el pH no podía ser controlado durante las fermentaciones y en consecuencia se escogió regularlo a 7 al principio del proceso.

En vista de los resultados desfavorables, se llevaron a cabo fermentaciones con el fin de explorar el efecto del pH en otros equipos donde se pueda controlar esta propiedad. Primero se probó montando fermentaciones en matraces Erlenmeyer sobre planchas de calentamiento y

agitación con dos cepas seleccionadas. Las condiciones de estas fermentaciones se pueden encontrar en el anexo A.

Con base en los resultados obtenidos en las fermentaciones de exploración, se decidió montar fermentaciones de 120mL en una incubadora agitada, a 37°C durante 48h a 180 rpm y se evaluó la capacidad de producción de PGA, acompañada del consumo de azúcares en función del tiempo y crecimiento celular de las siete cepas con una concentración de glutamato monosódico de 24g/L.

2.5 Evaluación del efecto del glutamato monosódico

Se escogieron las 3 mejores cepas en función de su capacidad de aumentar la viscosidad del medio, su crecimiento celular, su consumo de azúcares y su tendencia a mantener estable el pH del medio. Posteriormente, se evaluó su capacidad de producir PGA, su consumo de azúcares en función del tiempo y crecimiento celular utilizando dos concentraciones de glutamato monosódico: 12g/L y 48g/L. Para estas fermentaciones se utilizó el protocolo en incubadora agitada, tomando alícuotas a las 10, 20, 36 y 44 horas.

2.6 Mediciones

El presente trabajo consideró cuatro variables a estudiar: cantidad de PGA producida, crecimiento celular (en el inóculo y durante la fermentación) y cantidad de azúcares reductores en el medio de fermentación. Para medir la cantidad de PGA producida se consideró que su síntesis aumenta la viscosidad del medio de fermentación (Thapa et al., 2021), entonces se utilizó esta propiedad como una medición indirecta. Para ello se utilizó el reómetro MCR 72/91

del fabricante Anton Paar, a 25°C y tomando la viscosidad conseguida a una velocidad de cizalla de 200s^{-1} .

Para medir azúcares reductores, se utilizó el ensayo colorimétrico de Ácido 3,5-Dinitrosalicílico, DNS (Teixeira & Santos, 2022). Brevemente, se elaboró una solución compuesta por 5mL de agua destilada, 1 mL de DNS y 1 mL de muestra diluida a conveniencia (en este caso, se utilizó un factor de dilución de 40). Posteriormente, se llevó a ebullición en baño maría por 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, comparando la absorbancia de la solución con una curva de calibración se encontró la concentración de azúcares reductoras en la muestra original.

Para medir el crecimiento celular se realizaron mediciones de densidad óptica utilizando un espectrómetro UV-vis Hanon i5 a 600nm (Castells et al., 2022).

2.7 Análisis estadístico

Para validar estadísticamente este trabajo se midieron 3 veces todos los experimentos realizados. Luego, utilizando estos datos se utilizaron para realizar un análisis de varianzas ANOVA en el software Minitab. Los resultados de este análisis estadístico se utilizaron para construir grupos de semejanza estadística utilizando un nivel de significancia del 95%. Los resultados de estas comparaciones estadísticas se encuentran en el anexo B

3. RESULTADOS

Las fermentaciones del presente trabajo se realizaron en cuatro fases: en reactores batch AMPTS, en planchas de calentamiento con el propósito de explorar mejores condiciones de trabajo y en una incubadora agitada. Esta última, al resultar ser el método más apropiado, come

se verá más adelante, se utilizó para determinar la cepa con mayor potencial y para evaluar el efecto de la concentración de glutamato monosódico.

Primero, para realizar las fermentaciones en los reactores batch AMPTS, se incubaron las 7 cepas en medio semilla en las condiciones antes descritas y se midió la densidad óptica, como una medida comparativa de crecimiento celular, como se muestra en la Figura 2.

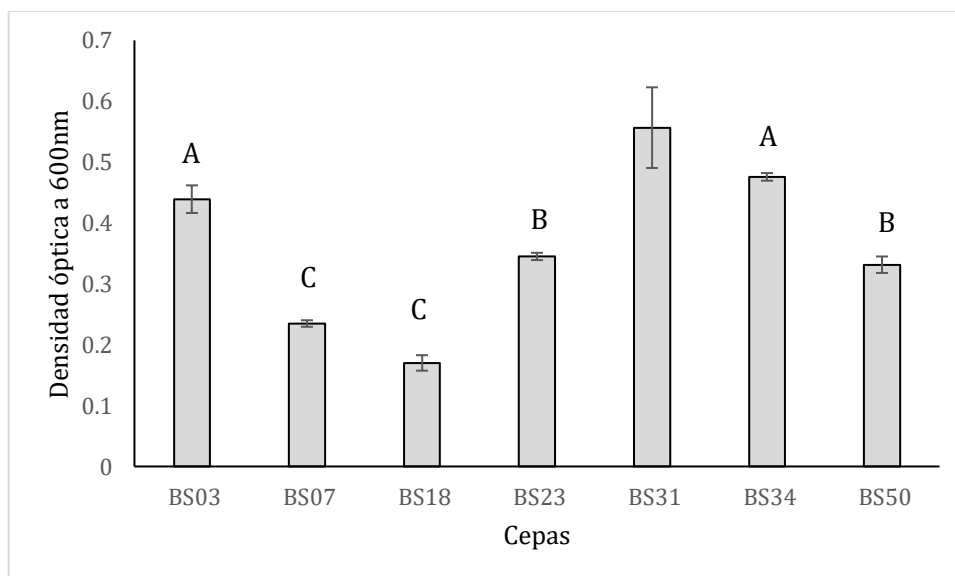


Figura 2. Densidad óptica del inóculo luego de 48 horas de incubación para fermentación en reactores batch AMPTS.

En la figura 2, se pueden distinguir que al terminar la incubación del inóculo existieron 3 grupos comparando estadísticamente el crecimiento celular de las 7 cepas. Estos son: BS03 con BS34, BS 23 con BS50, y BS07 con BS18. BS31 fue la cepa que logró un mayor crecimiento celular, mientras que BS18 resultó en el menor.

Posteriormente, se reguló la densidad óptica de todos los inóculos a 0.29 y se sembró la alícuota correspondiente en un medio de fermentación para cada cepa. Estos caldos de cultivo

se incubaron durante 48 horas según las condiciones antes descritas obteniendo los resultados presentados en la figura 3.

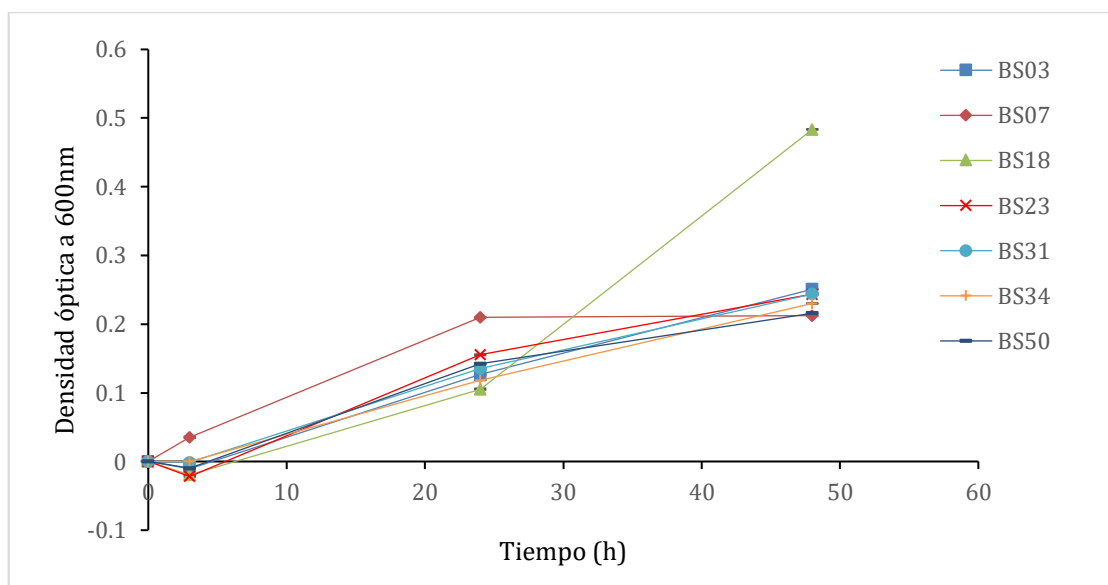


Figura 3. Cinética de crecimiento de las cepas de *B. subtilis* en reactores AMPTS, expresada como densidad óptica del cultivo en función del tiempo.

En la figura 3, se puede ver el crecimiento celular de cada cepa durante las fermentaciones en reactores AMPTS. Se identifica que todas las cepas salvo BS07 presentan una fase de crecimiento mínimo durante las primeras 3 horas. Luego, se puede ver un crecimiento semejante y continuo hasta las 24 horas. En este tiempo, se observa que BS07 estabiliza su densidad óptica en aproximadamente 0.2 y que el crecimiento celular de BS18 se dispara. Todas las demás cepas continúan creciendo al mismo ritmo. Se debe mencionar que en términos estadísticos a las 3 horas todas las cepas tuvieron la misma densidad óptica en términos estadísticos salvo la cepa BS07. Luego, a las 48 horas se puede ver que BS23 y BS31 son estadísticamente semejantes.

En la Figura 4 se muestra la concentración porcentual de azúcares reductoras en función del tiempo transcurrido. Se puede notar que a las 48 horas de fermentación ninguna de las cepas ha logrado consumir más del 50% de los azúcares reductores disponibles. Se destacan BS07 y

BS31 que presentan un consumo menor al 5% y BS50 que presentó un consumo mayor del 48%.

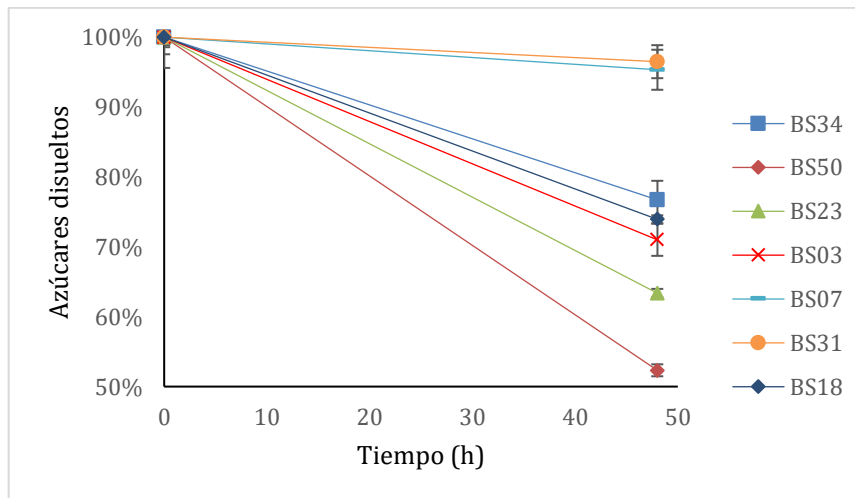


Figura 4. Porcentaje remanente de azúcares reductores en el medio de fermentación utilizando reactores AMPTS en función del tiempo.

Además, se midió la viscosidad del medio para todas las fermentaciones en función del tiempo. En la figura 5 se presenta la viscosidad de los medios de fermentación en función del tiempo. Se puede ver que BS03 tuvo una tendencia a la mayor viscosidad en cualquier tiempo,

pero el análisis estadístico muestra que no existe diferencias significativas entre ninguna cepa a ningún momento del estudio.

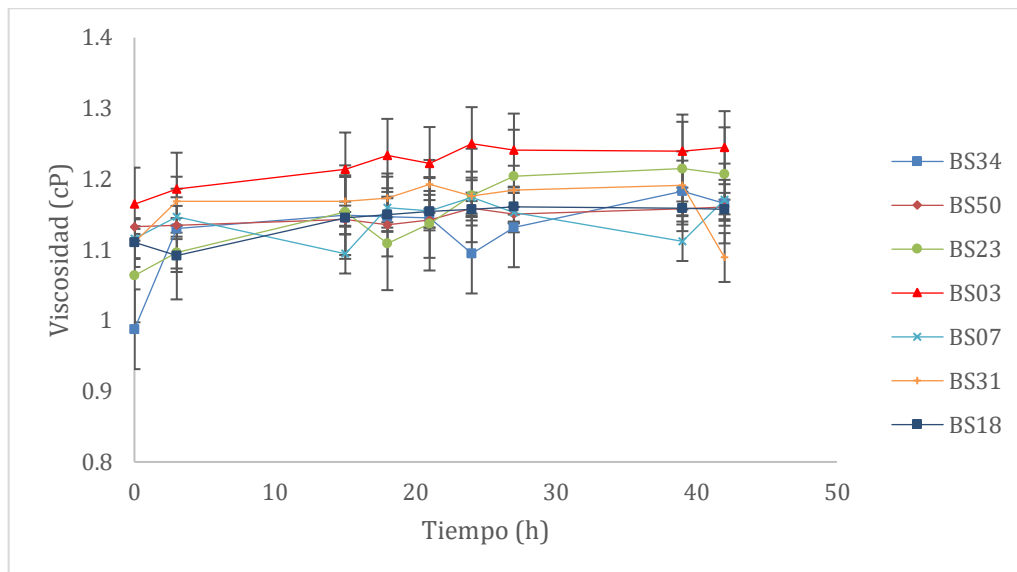


Figura 5. Viscosidad del medio de fermentación utilizando reactores AMPTS en función del tiempo, como medida indirecta de la cantidad de PGA producida.

En las pruebas realizadas con el objetivo de explorar condiciones más apropiadas, se probaron 4 combinaciones diferentes, mismas que se detallan en el anexo A. En síntesis, con esta exploración se determinó utilizar una incubadora agitada a 37°C, 180 rpm durante 48 horas

y regulando el pH cada 6 horas. Los resultados de esta exploración se presentan en las figuras 6, 7 y 8.

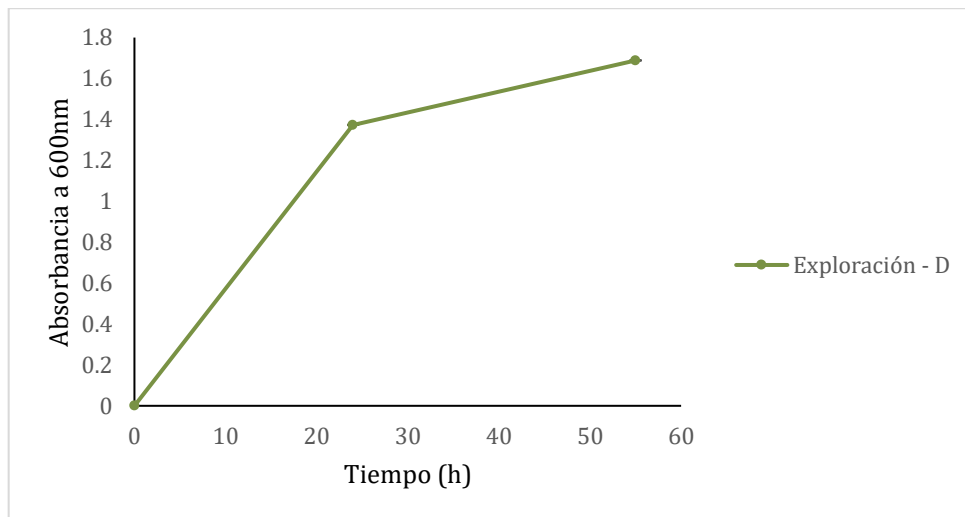


Figura 6. *Cinética de crecimiento celular en incubadora agitada expresada como densidad óptica medida a 600nm del en función del tiempo*

Al observar la Figura 6 se puede ver la cinética de crecimiento lograda al llevar a cabo la fermentación en una incubadora agitada. Se puede ver que hasta las 24 horas existe un

crecimiento celular sostenido y, desde este tiempo hasta el final de la fermentación, la tasa de crecimiento disminuye significativamente.

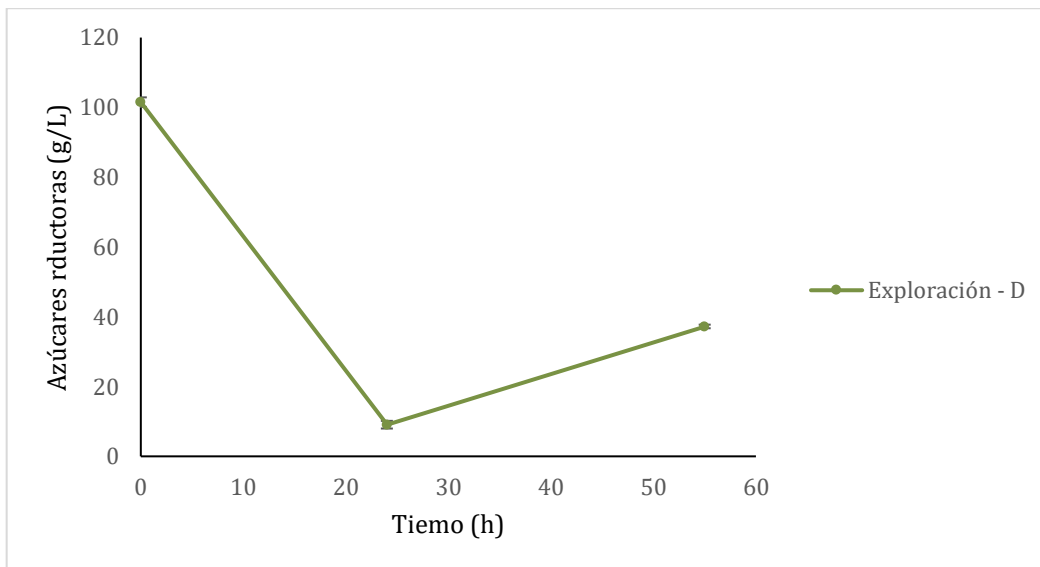


Figura 7. Consumo de azúcares logrado en incubadora agitada expresado como concentración de azúcares disueltos en el medio de fermentación en función del tiempo

Al observar la Figura 7 se puede ver el consumo de azúcares lograda en una incubadora agitada. Esta figura muestra que a las 24 horas las bacterias han consumido la gran mayoría de

sus azúcares disponibles. Luego, de las 24 a las 48 horas se ve un crecimiento ligero hasta alcanzar aproximadamente los 40 g/L.

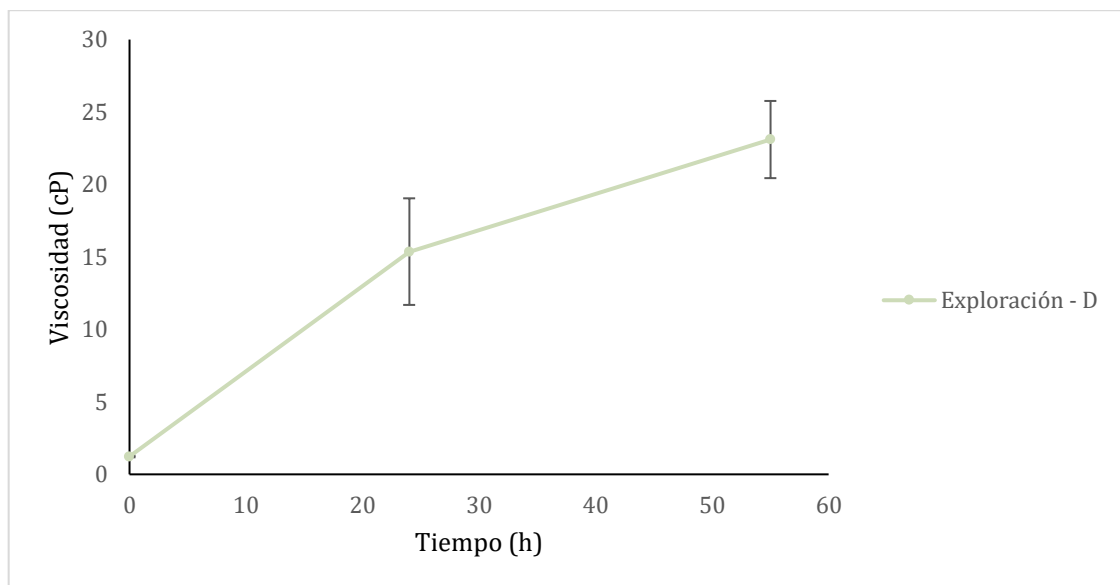


Figura 8. Cantidad de PGA contenida en el medio de fermentación preparado en incubadora agitada expresado como viscosidad en función del tiempo.

En la Figura 8 se puede ver la cantidad de PGA lograda en una incubadora expresada como viscosidad del medio de fermentación en función del tiempo. Se puede ver que durante

las primeras 24 horas la viscosidad del medio crece significativamente. Después, desde las 24 hasta las 48 horas la viscosidad sigue creciendo, pero a menor ritmo.

En vista de la notoria mejoría lograda en una incubadora agitada, se evaluaron las 7 cepas utilizando dichas condiciones. Los resultados de estas fermentaciones se presentan en las Figuras 9, 10, 11 y 12.

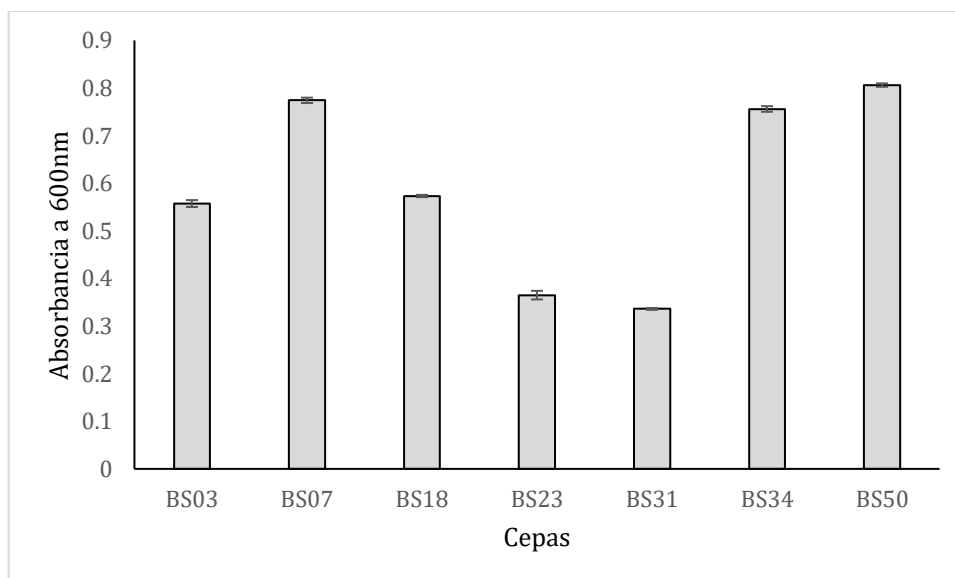


Figura 9. Densidad óptica del inóculo luego de 48 horas de incubación expresada como absorbancia a 600nm.

En la Figura 9 se puede ver que al incubar las cepas durante 48 horas en medio semilla BS07, BS34 y BS50 logran el mayor crecimiento celular y que BS23 y BS31 el menor crecimiento celular.

Posteriormente, se realizaron las fermentaciones siguiendo el protocolo establecido y los resultados se muestran en la figura 10. Durante las primeras 20 horas, todas las cepas mostraron un crecimiento diferente siendo BS34 la que consiguió el máximo y BS 18 el mínimo. Luego, desde las 20 hasta las 44 horas, BS34, BS50 y BS23 redujeron su tasa de crecimiento, mientras que BS03, BS07, BS31 y BS18 lo mantuvieron. Al final de la fermentación todas las cepas

lograron un crecimiento semejante a excepción de BS18. En términos estadísticos se puede ver que a las 44 horas las cepas BS07, BS31 y BS50 no presentan diferencias significativas.

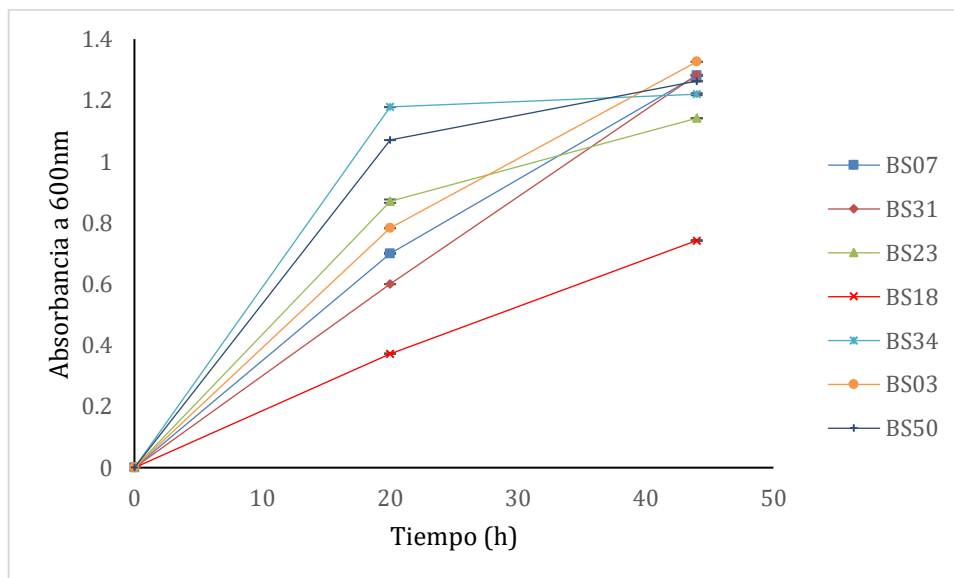


Figura 10. Crecimiento celular logrado en una incubadora agitada expresado como densidad óptica medida a 600nm en función del tiempo.

En la Figura 11 se puede ver el consumo de azúcares logrado por cada cepa en una incubadora. Se puede notar que durante las primeras 20 horas, cada cepa tuvo un consumo diferente, siendo BS03 la cepa que menos redujo la concentración de azúcares en el medio mientras que BS34 fue la que más lo hizo. A partir de las 24 horas, BS18 aumentó ligeramente la concentración de azúcares en el medio, y BS03 y BS23 redujeron su tasa de consumo, mientras que todas las demás lo mantuvieron igual. En términos estadísticos se puede notar

que a las 48 horas BS03 y BS18 no muestran diferencias significativas, además, no existe diferencias entre BS07, BS23 Y BS34.

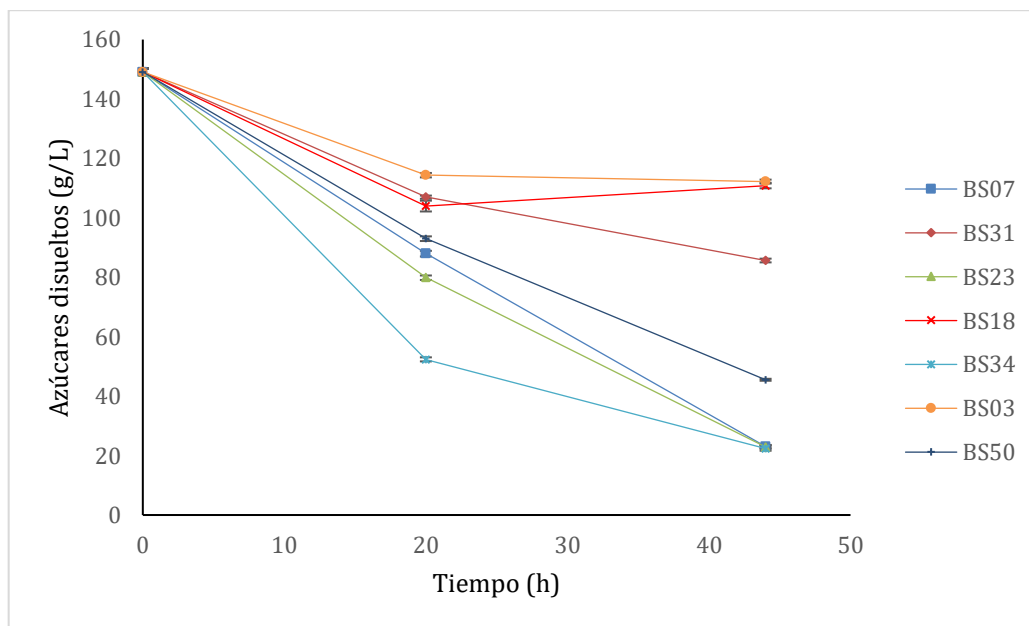


Figura 11. Consumo de azúcares utilizando incubadora expresado como azúcares disueltas en el medio de fermentación en función del tiempo.

En la Figura 12 se puede observar que, durante las primeras 20 horas, todas las cepas, a excepción de BS03, presentan un aumento poco notable de la viscosidad. A partir de las 20 y hasta las 44 horas todas las cepas excepto BS07 reducen su tasa de crecimiento. Cabe mencionar que BS03 consigue casi el doble de la viscosidad alcanzada por cualquier otra cepa y que BS18, BS31 y BS50 prácticamente no mostraron cambios en esta propiedad. Hablando en términos estadísticos se puede reconocer la formación de 3 grupos de semejanza: el primero

es BS07, BS23 con BS34; el segundo es BS07, BS18, BS31 y BS50; y el último es BS03 por sí sola.

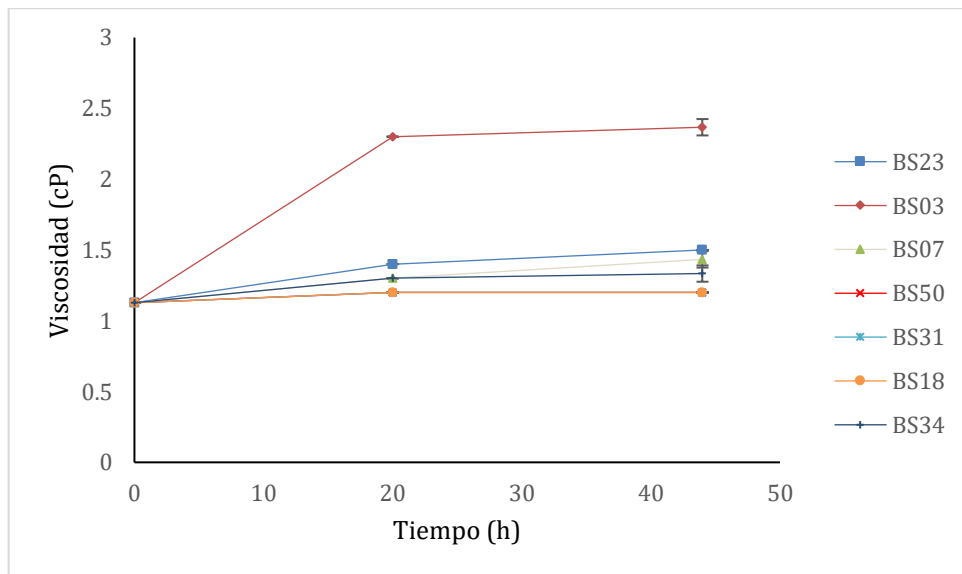


Figura 12. Cantidad de PGA contenida en el medio expresada como de viscosidad en función del tiempo.

Utilizando esta información y las observaciones realizadas durante los controles de pH se realizó una matriz de decisión (Tabla 1) con el objetivo de escoger las tres mejores cepas, para experimentación subsiguiente.

Tabla 1. Matriz de decisión para escoger las 3 mejores cepas.

	Cepas						
Criterio	B S03	B S07	B S18	B S23	B S31	B S34	B S50
Viscosidad	A lto	M edio	B aja	M edio	B aja	M edio	B aja
Consumo de azúcares	B ajo	A lto	B ajo	A lto	M edio	M lto	M edio
Estabilidad de pH	A lto	B aja	A lto	M edio	M edio	B aja	A lto
Crecimiento celular	A lto	M edio	B ajo	M edio	M edio	M edio	M edio
PUNTUACIÓN TOTAL	2	0	- 2	1	- 1	0	0

Nota. Para puntuar el desempeño se determinó que todas las cepas tengan 0 puntos inicialmente. Luego, a cada criterio se le asigna una calificación como alto, medio o bajo y se suma 1 punto, 0 puntos o resta 1 punto respectivamente.

En la Tabla 1 se evalúa el desempeño de cada cepa en función de 4 criterios: su capacidad para aumentar la viscosidad en el medio, el consumo de azúcares durante la fermentación, su

capacidad para mantener el pH del medio y su crecimiento celular. Con esta dinámica, se identificaron como mejores cepas a BS03, BS23 y BS50.

Utilizando las 3 mejores cepas, se llevaron a cabo fermentaciones variando la concentración de glutamato monosódico a 12 y 48 g/L (llamados medio 12 y medio 48 respectivamente) y los resultados se presentan en las figuras 13, 14, 15 y 16:

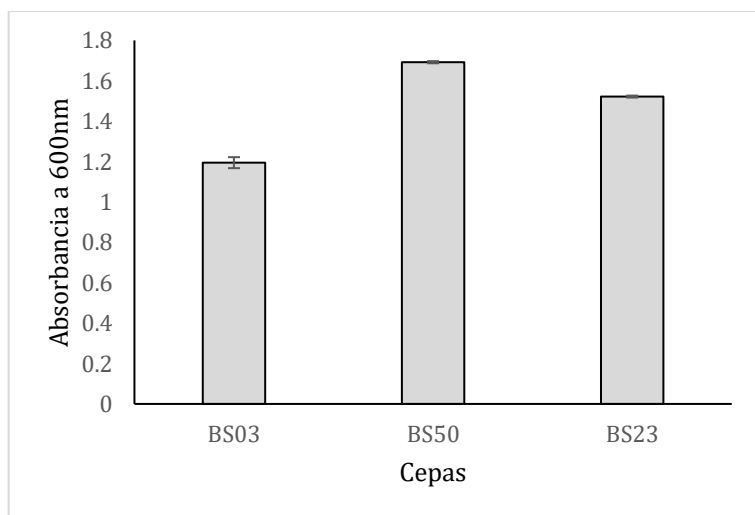


Figura 13. Densidad óptica del inóculo luego de 48 horas de incubación expresada como absorbancia a 600nm.

En la Figura 13 se puede ver que luego de 48 horas de incubación del inóculo, BS03 y BS50 son las cepas con menor y mayor crecimiento celular, respectivamente. A continuación,

se reguló la densidad óptica de estos inóculos y se sembraron las alícuotas correspondientes en los medios de fermentación consiguiendo los resultados de las figuras 14, 15 y 16:

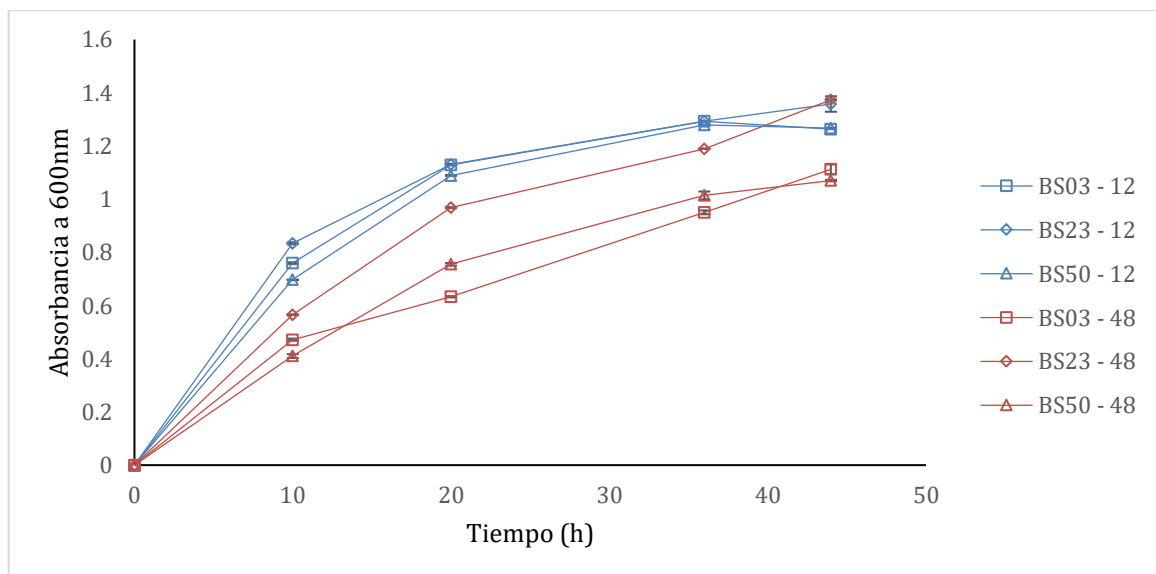


Figura 14. Crecimiento celular conseguido en una incubadora agitada expresada como absorbancia del medio de fermentación a 600nm en función del tiempo. Los resultados logrados en 12 g/L de glutamato se grafican en azul y en 48 g/L, en naranja.

Todas las cepas logran su mayor tasa de crecimiento durante las 10 primeras horas, Y después de esto, la tasa se va reduciendo paulatinamente. Además, se puede ver que, en todos los casos, hasta las 36 horas de fermentación el medio 12 promovió un mayor crecimiento celular. Al final de la fermentación se puede ver que BS23, en las dos concentraciones de glutamato, logró la mayor densidad óptica, BS03 y BS50 en medio 12 lograron el segundo y tercer mejor crecimiento respectivamente BS03 y BS50 en medio 48 el menor. En términos estadísticos se puede notar que a las 20 horas BS03 y BS23 cultivadas en el medio 12 son estadísticamente equivalentes, a las 36 horas todas las cepas en medio 12 muestran un comportamiento semejante. Finalmente, a las 44 horas BS23 es estadísticamente semejante en

ambos medios, mientras que BS 50 y BS03 muestran un comportamiento equivalente en medio 12.

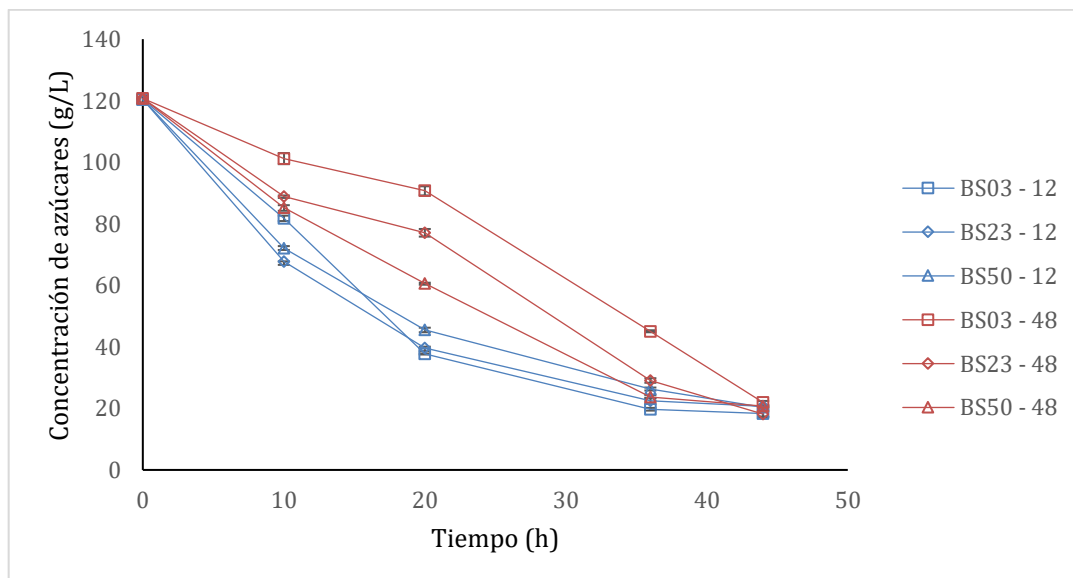


Figura 15. Consumo de azúcares logrado en una incubadora expresado como azúcares disueltas en el medio en función del tiempo. Los resultados logrados en medio 12 se grafican en azul y en medio 48, en naranja.

En la Figura 15 se puede ver que el consumo de azúcares de todas las cepas durante las primeras 10 horas tiene una tasa determinada de decrecimiento, desde este tiempo y hasta las 20 horas BS03 en medio 12 lo mantiene constante, todas las demás cepas reducen su tasa de consumo. Luego, estudiando el tramo entre las 20 y las 36 horas se puede ver que todas las cepas cultivadas en medio 12 tienden a reducir su tasa de consumo de azúcares mientras que las cepas cultivadas en medio 48 lo mantienen constante. Finalmente, mirando al rango entre las 36 hasta las 44 horas se puede ver que todas las concentraciones de azúcares en todos los cultivos convergen. Cabe resaltar que, en términos generales, se puede ver que el medio 12 promueve un mayor consumo de azúcares. En términos estadísticos se puede notar que a las 20 horas BS23 y BS03 en medio 12 presentan un comportamiento semejante. Posteriormente,

a las 36 horas existe comportamiento semejante entre BS23 en medio 12 y BS50 en medio 48. Finalmente, a las 44 horas se forman dos grupos: el primero son BS03 y BS23 en medios con 12 y 48 respectivamente y todas las demás cepas en el segundo grupo.

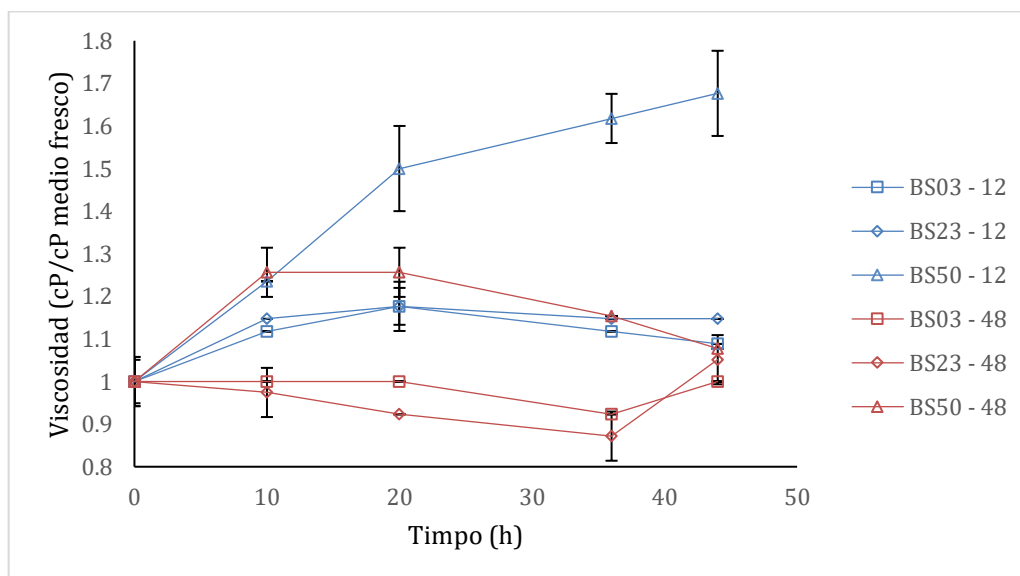


Figura 16. Viscosidad del medio de fermentación, como medida indirecta de producción de PGA, en la incubadora agitada. Los resultados logrados en medio 12 se grafican en azul y en medio 48, en naranja.

En la Figura 16 se grafica la proporción de viscosidad al tiempo determinado en relación con la viscosidad de su medio original. Se puede ver que BS03 y BS23 en medio 48 durante las 10 primeras horas no presentan cambios significativos. Luego, desde las 20 hasta las 36 horas su viscosidad decrece y en el siguiente tramo hasta las 44 horas vuelve a crecer hasta aproximadamente la viscosidad original de su medio. Nuevamente, las cepas BS03 y BS23 en medio 12 presentan un comportamiento parecido entre ellas con la diferencia de que se observa un crecimiento sostenido hasta las 20 horas cuando alcanzan una viscosidad 17% mayor a la de su medio original aproximadamente. Desde este momento no se ven cambios significativos. Finalmente, al comparar BS50 en medio 12 y medio 48 se puede ver que existe un crecimiento

semejante durante las primeras 10 horas. A partir de este momento BS50 en medio 48 reduce paulatinamente la viscosidad hasta llegar a un 17% mayor al medio original aproximadamente. Por otro lado, BS50 en medio 12 continúa aumentando su viscosidad de manera continua hasta las 20 horas. Desde este momento la viscosidad de esta fermentación sigue creciendo, pero va reduciendo su ritmo paulatinamente. Cabe resaltar que, en términos generales se puede ver que el medio 12 tiende a conseguir un mayor aumento en la viscosidad.

En términos estadísticos se debe mencionar que a las 10 horas BS03 y BS23 son semejantes. A las 20 horas, BS 50 en medio 48, BS23 en medio 12 y BS03 en medio 12 no muestran diferencias significativas. Después, a las 36 horas se puede ver que se forman dos grupos: el primero conformado por BS50, BS23 y BS03 en medios 48, 12 y 12 respectivamente y el segundo grupo conformado por BS03 y BS23 en medios 48. Finalmente, a las 44 horas todas las cepas terminan en una viscosidad estadísticamente semejante con excepción de BS 50 en medio 12.

Finalmente, tomando esta información se construyó una matriz de decisión con las mismas reglas que la tabla 1. En esta ocasión el objetivo fue determinar la cepa con mayor potencial.

Tabla 2. Matriz de decisión para escoger la cepa con mayor potencial

	Cepas					
	Medio 12			Medio 48		
Criterio	BS03	BS23	BS50	BS03	BS23	BS50
Viscosidad	Medio	Medio	Alto	Medio	Medio	Medio
Consumo de azúcares	Alto	Alto	Alto	Medio	Medio	Medio
Estabilidad de pH	Bajo	Bajo	Medio	Medio	Medio	Medio
Crecimiento celular	Medio	Alto	Medio	Bajo	Alto	Bajo
PUNTUACIÓN TOTAL	0	1	2	-1	1	-1

En la Tabla 2 se puede ver como BS50 es la cepa con mejor potencial alcanzando una puntuación de 2 cuando es cultivada en medio preparado con 12g/L de glutamato monosódico.

4. DISCUSIONES

Los resultados de esta investigación muestran que los reactores AMPTS impidieron el crecimiento celular y la formación de PGA. Esto puede deberse a que dichos reactores cuentan solamente con una pequeña entrada para el oxígeno y una pequeña entrada para una manguera que se utiliza para extraer muestras; esto, a su vez, implica que no existen mecanismos físicos eficientes para el acceso a oxígeno fresco y el control del pH. Esta sospecha se basa en el hecho de que un acceso limitado al oxígeno puede afectar al ciclo e Krebs y con ello la ruta metabólica del PGA (Luo et al., 2016), además, se puede argumentar que un pH menor a 6 inhibe la

formación del polímero en el medio mientras que un pH menor a 4 pone en riesgo la integridad de la pared celular del microorganismo (Wang et al., 2022).

Durante las fermentaciones de exploración se notó que las cepas de *Bacillus subtilis* tienden a reducir el pH del medio asiduamente de modo que para mitigar el efecto que esto tiene sobre el microorganismo y el producto deseado se decidió regular el pH a 7 (Wang et al., 2022) a intervalos de tiempo definidos. El efecto de esta decisión se pudo observar claramente en el aumento de crecimiento celular, consumo de azúcares y viscosidad de los cultivos. Por ejemplo, en la figura 16 se puede ver que la viscosidad del medio al final de la fermentación cuando se reguló el pH duplicó lo conseguido con cualquier otra alternativa probada antes.

Utilizando la información aprendida de las fermentaciones de exploración se evaluó las 7 cepas en cuestión. Estos los resultados se pueden comparar a los reportados en otras fuentes. El crecimiento celular aquí logrado es ligeramente mayor al reportado por Thapa et al (2021) pero bastante menor al reportado por Wang et al (2022). Esto puede deberse a que Wang no diluyó su inóculo antes de sembrarlo en el medio de fermentación lo que presumiblemente llevó a un mayor crecimiento celular.

También, al comparar el consumo de azúcares aquí presentado con el consumo de azúcares presentado en el trabajo de Wang et al (2022) se puede ver que son parecidos. En términos generales en ambos casos se consume azúcares disueltas del medio a un ritmo aproximado de 4 g/L cada hora. No obstante, hay que mencionar que el comportamiento si muestra diferencias. Mientras que en el presente trabajo se puede ver una tendencia de consumo menor mientras más avanza el tiempo, en el trabajo de Wang la tasa de consumo tiende a aumentar mientras más tiempo ha pasado hasta que se termina el azúcar disponible.

Luego, en términos de viscosidad se puede comparar nuevamente con el trabajo de Wang et al (2022) y el trabajo de Thapa et al (2021). En ambos casos la viscosidad lograda en este trabajo es mucho menor a la reportada en la literatura. Esto se debe presumiblemente a una

falta de formación de PGA en el medio debido a un efecto acumulado de la variación del pH durante controles y una falta de cantidad de microorganismos en el medio de fermentación. En cualquier caso, este resultado podría corroborarse utilizando una medición directa de la cantidad de PGA producida como, por ejemplo, precipitación por formación de complejos, precipitación por reducción de solubilidad en agua o filtración (Luo et al., 2016).

Utilizando la información aprendida de las fermentaciones de exploración y en la evaluación de las 7 cepas en cuestión se construyó una matriz de decisión (Tabla 1) que arrojó como mejores puntuadas a BS03 con 2 puntos, BS23 con 1 punto y BS07, BS34 y BS50 con 0 puntos. El criterio determinante para escoger a BS50 por encima de BS07, BS34 fue que tanto BS07 como BS34 presentan una baja tendencia a mantener estable el pH de su medio de cultivo, mientras que BS50 tiende a mantenerlo dentro del rango aceptable. Por lo tanto, las 3 mejores cepas fueron BS03, BS 23 Y BS50.

Tomando estas 3 cepas se evaluó la capacidad de producción de PGA, pero en esta ocasión, se varió la cantidad de glutamato monosódico presente en cada medio a 12g/L (medio 12) y 48g/L (medio 48). Los resultados muestran que una mayor cantidad de glutamato tiende a inhibir al microorganismo ya que se puede ver que cuando se utiliza medio 48 tanto el consumo de azúcares como el crecimiento celular decrecen. Esto ayuda a explicar por qué al escoger a BS50 como la cepa con mayor potencial se prefiere el medio 12.

5. CONCLUSIONES

Todas las cepas de *Bacillus subtilis* son altamente sensibles a los cambios de pH y demás condiciones de fermentación. Las mejores condiciones logradas son 37°C, 180rpm, regulando el pH cada 6 horas y en una incubadora microbiológica. Además, se presume que la concentración de glutamato monosódico podría tener una actividad inhibidora sobre estos

microorganismos, sin embargo, es recomendable enriquecer este trabajo con un rango más amplio para demostrar este efecto.

En esta investigación la medición de la concentración de PGA fue una limitante importante, no obstante, se logró determinar que BS03, BS23 y BS50 son las 3 cepas con mayor potencial para la producción de este compuesto. Se destacó especialmente a BS50 gracias a su buen desempeño en términos de consumo de azúcares, estabilidad de pH en el medio, crecimiento celular y capacidad para aumentar la viscosidad del medio.

6. RECOMENDACIONES

Para perfeccionar los resultados de este estudio se recomienda ejecutar las fermentaciones utilizando una mayor densidad óptica en el inóculo sembrado en el medio de fermentación. Además, vale la pena evaluar el efecto de un control de pH continuo en durante los cultivos. Finalmente, también es recomendable estudiar más a fondo el efecto del glutamato monosódico en los cultivos.

Desde el punto de vista industrial se ha determinado que la alta viscosidad del medio luego de las fermentaciones dificulta significativamente la obtención a nivel industrial (Zhang et al., 2022). Se recomienda utilizar el protocolo establecido en este trabajo como solución a este problema

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashiuchi, M., Oike, S., Hakuba, H., Shibatani, S., Oka, N., & Wakamatsu, T. (2015). Rapid purification and plasticization of d-glutamate-containing poly- γ -glutamate from Japanese fermented soybean food natto. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 116, 90-93. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.031>
- Campos, V., Pimentel Filho, N. J., & Medeiros, T. A. M. (2020). Study of *Bacillus* spp. strains used in the production of γ -polyglutamic acid in submerged culture. *International Food Research Journal*, 27(3), 427-434.
- Castells, A. (2018). *Evaluación del potencial de producción de ácido láctico mediante cepas de Bacillus subtilis* [Universidad San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/8618>
- Castells, A., Leon, A., Sosa, D., Cadena, I., Ramirez, D., Serrano, L., Larrea, F., Almeida-Streitwieser, D., & Alvarez-Barreto, J. F. (2022). Evaluation of Lactic Acid Production by different *Bacillus Subtilis* Strains Isolated from Theobroma Cacao Crops in Ecuador. *Chemical Engineering Transactions*, 93(February), 55-60. <https://doi.org/10.3303/CET2293010>
- Fang, J., Zhang, Y., Yan, S., Liu, Z., He, S., Cui, L., & Yin, J. (2014). Poly(L-glutamic acid)/chitosan polyelectrolyte complex porous microspheres as cell microcarriers for cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia*, 10(1), 276-288. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.002>
- Glutamic Acid Market Size & Share Analysis Report 2028*. (s. f.). Recuperado 3 de noviembre de 2022, a partir de <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/glutamic-acid-market>

- Jia, Ming, Guo, X., Cheng Cheng, X., Yi Yang, H., Li, D., Si Yu, P., Chao, L., Shou Xiao, C., Hao Tian, D., Cheng Dong, S., Jun Tao, L., Zhou, Y., & Shi Gang, S. (2022). A dual force cross-linked γ -PGA-PAA binder enhancing the cycle stability of silicon-based anodes for lithium-ion batteries. *Electrochimica Acta*, 425, 140704.
<https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2022.140704>
- Khalil, I. R., Burns, A. T. H., Radecka, I., Kowalczyk, M., Khalaf, T., Adamus, G., Johnston, B., & Khechara, M. P. (2017). Bacterial-derived polymer poly- γ -glutamic acid (γ -PGA)-based micro/nanoparticles as a delivery system for antimicrobials and other biomedical applications. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18020313>
- Lampe, B. J., & English, J. C. (2016). Toxicological assessment of nattokinase derived from *Bacillus subtilis* var. natto. *Food and Chemical Toxicology*, 88, 87-99.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.025>
- Luo, Z., Guo, Y., Liu, J., Qiu, H., Zhao, M., Zou, W., & Li, S. (2016). Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: Current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0537-7>
- Tanimoto, H., Mori, M., Motoki, M., Torii, K., Kadowaki, M., & Noguchi, T. (2001). Natto mucilage containing poly-gamma-glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(3), 516-521.
<https://doi.org/10.1271/BBB.65.516>
- Teixeira, G. G., & Santos, P. M. (2022). Simple and cost-effective approaches for quantification of reducing sugar exploiting digital image analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104719>
- Thapa, P., Thapa, A., Khadka, S., Sapkota, S., Panta, O. P., Sharma, S., Karki, T. B., & Poudel, P. (2021). Screening and characterization of potent poly glutamic acid

producing *Bacillus* sp. isolated from Kinema, water and soil samples. *Heliyon*, 7(8).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07715>

Wang, J. Q., Zhao, J., & Xia, J. Y. (2022). γ -PGA Fermentation by *Bacillus subtilis* PG-001 with Glucose Feedback Control pH-stat Strategy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(5), 1871-1880. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03755-x>

Zhang, X., Li, H., Guo, Y., Ding, S., Chen, G., Liang, Z., & Zeng, W. (2022). An integrated strategy for recovery and purification of poly- γ -glutamic acid from fermentation broth and its techno-economic analysis. *Separation and Purification Technology*, 278. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119575>

ANEXO A: FERMENTACIÓN EXPLORATORIAS

Tabla 3. Condiciones durante fermentaciones de exploración

Propiedad	Condiciones experimentales			
	Exploración A	Exploración B	Exploración C	Exploración D
Temperatura	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Agitación	500 rpm	500rpm	500 rpm	180 rpm
Fuente de calor	Plancha	Plancha	Plancha	Incubadora
Tiempo	48 horas	48 horas	48 horas	48 horas
Inóculo	10mL, ABS 0.19, fresco	10 mL, ABS 0.19, fresco	10 mL, ABS 0.19, 4 días de edad	12 mL, ABS 0.19, 2 días de edad
Volumen de fermentación	125 mL	125 mL	125 mL	125 mL
Abierto a la atmósfera	no	si	no	si
Olor	Ácido	Ácido	Ácido	Dulce
pH	Regulado a 7 al principio	Regulado a 7 al principio	Regulado a 7 al principio	Regulado a 7 cada 6 horas
Cepa utilizada	BS18	BS23	BS18	BS23

Las figuras 17, 18 y 19 muestran los resultados de estas exploraciones.

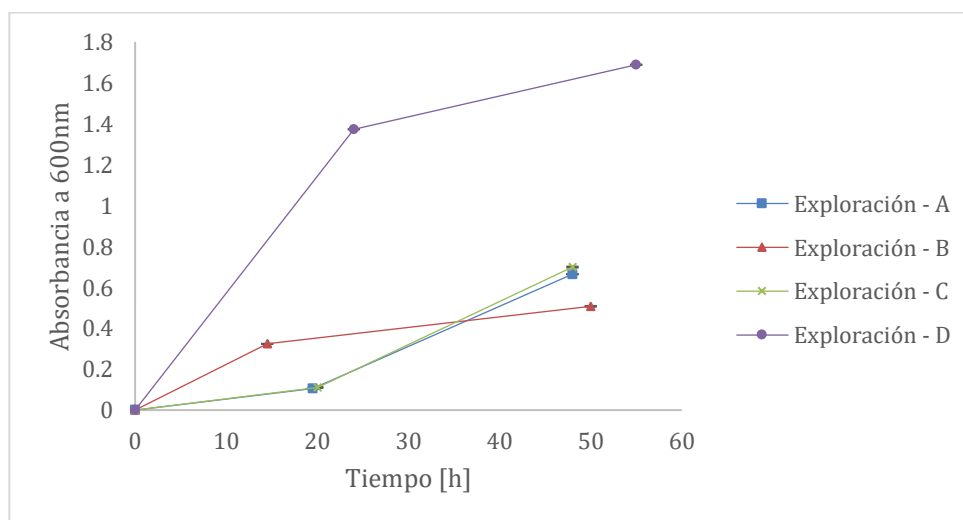


Figura 17. Densidad óptica expresada como absorbancia a 600nm del medio de fermentación en función del tiempo

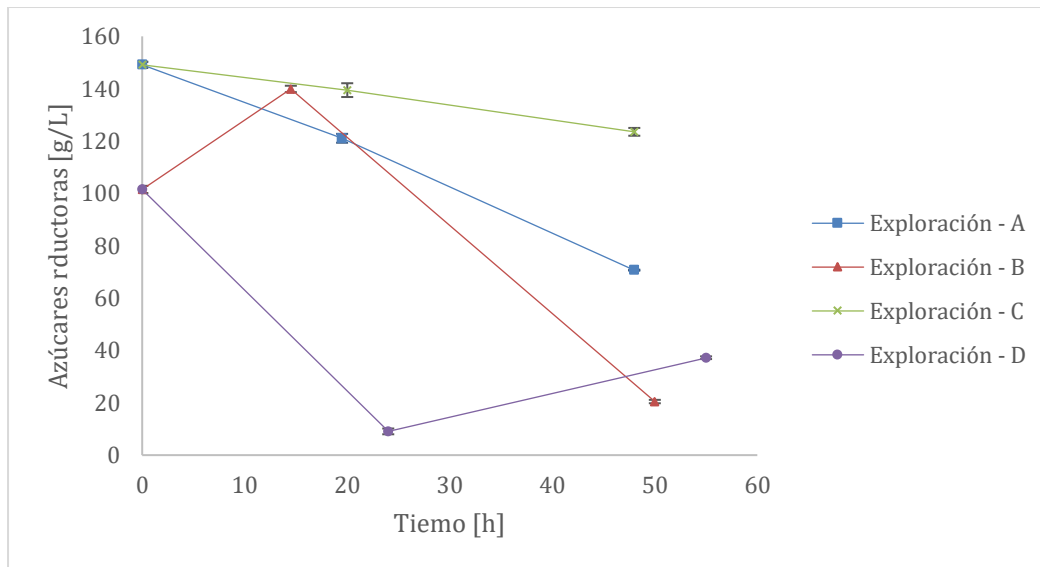


Figura 18. Consumo de azúcares expresado como azúcares disueltos en el medio de fermentación en función del tiempo

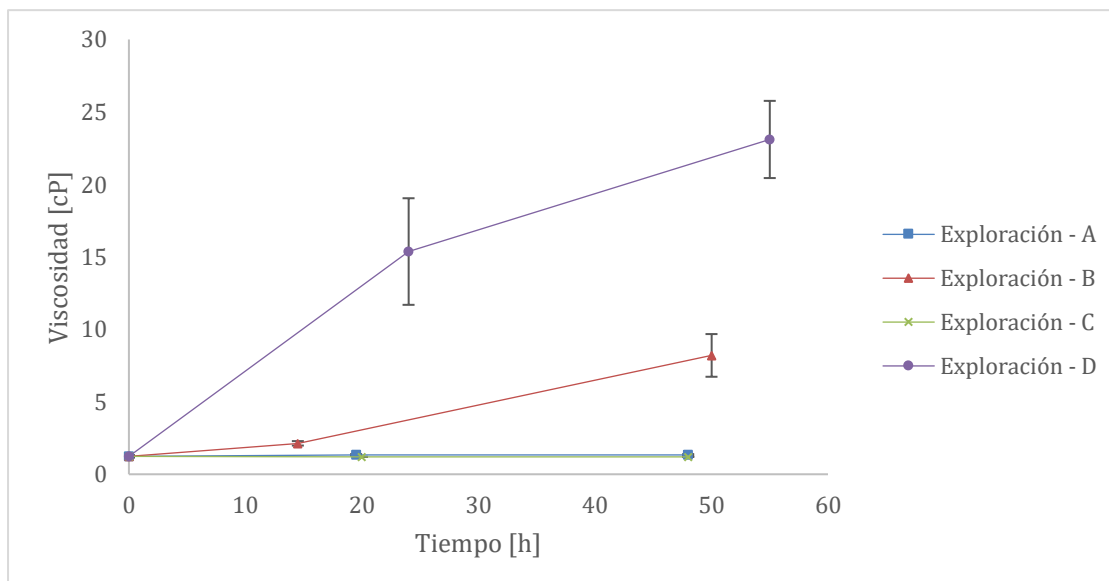


Figura 19. Cantidad de PGA contenida en el medio de fermentación en función del tiempo evidenciada como cambio de viscosidad.

ANEXO B: COMPARACIÓN EN PAREJAS DE TUKEY A TRAVÉS DE UN ESTUDIO ANOVA PARA TODOS LOS RESULTADOS

Los resultados de las fermentaciones llevadas a cabo en los reactores batch del sistema AMPTS se presentan en las figuras 20, 21, 22, 23, 24 y 25.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS31	3	0,5566	A
BS34	3	0,47573	B
BS03	3	0,4391	B
BS23	3	0,34503	C
BS50	3	0,33147	C
BS07	3	0,23483	D
BS18	3	0,17007	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 20. Comparación estadística de la densidad óptica lograda después de 48 horas de inóculo para fermentación en reactores AMPTS.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS31	3	1,03636	A
BS07	3	0,953329	B
BS34	3	0,767246	C
BS18	3	0,739378	D
BS03	3	0,710056	E
BS23	3	0,633720	F
BS50	3	0,523319	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 21. Comparación estadística del consumo porcentual de azúcares logrado en reactores AMPTS

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS07 t = 3	3	0,035300	A
BS34 t = 3	3	0,000000	B
BS31 t = 3	3	-0,001233	B
BS50 t = 3	3	-0,009733	C
BS03 t = 3	3	-0,010600	C
BS18 t = 3	3	-0,019467	D
BS23 t = 3	3	-0,021833	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 22. Comparación estadística de la densidad óptica lograda en reactores AMPTS a las 3 horas de fermentación

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS07 t = 24	3	0,209567	A
BS23 t = 24	3	0,155400	B
BS50 t = 24	3	0,142633	C
BS31 t = 24	3	0,135467	D
BS03 t = 24	3	0,126600	E
BS34 t = 24	3	0,118667	F
BS18 t = 24	3	0,105367	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 23. Comparación estadística de la densidad óptica lograda en reactores AMPTS a las 24 horas de fermentación

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS18 t = 48	3	0,483533	A
BS50 t = 48	3	0,264533	B
BS03 t = 48	3	0,250867	C
BS31 t = 48	3	0,243733	D
BS23 t = 48	3	0,243700	D
BS34 t = 48	3	0,230133	E
BS07 t = 48	3	0,212467	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 24. Comparación estadística de la densidad óptica lograda en reactores AMPTS a las 48 horas de fermentación

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS03	10	1,2077	A
BS23	10	1,1645	A B
BS31	10	1,1613	A B
BS50	10	1,14598	B
BS07	10	1,14499	B
BS18	10	1,14282	B
BS34	10	1,1208	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 25. Comparación estadística del cambio de viscosidad logrado en reactores AMPTS

Los resultados de las fermentaciones llevadas a cabo en una incubadora microbiológica para evaluar las 7 cepas en cuestión se presentan en las figuras 26 a la 32.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS50	3	0,80600	A
BS01	3	0,77403	B
BS34	3	0,75587	C
BS18	3	0,57310	D
BS03	3	0,55727	E
BS23	3	0,36487	F
BS31	3	0,33593	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 26. Comparación estadística de la densidad óptica lograda después de 48 horas de inóculo para fermentación en incubadora microbiológica.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS03 t = 20	3	114,360	A
BS31 t = 20	3	106,960	B
BS18 t = 20	3	103,96	C
BS50 t = 20	3	92,987	D
BS07 t = 20	3	87,947	E
BS23 t = 20	3	79,853	F
BS34 t = 20	3	52,373	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 27. Comparación estadística del consumo de azúcares a las 20 horas de fermentación en incubadora.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS03 t = 44	3	112,200	A
BS18 t = 44	3	110,867	A
BS31 t = 44	3	85,640	B
BS50 t = 44	3	45,507	C
BS07 t = 44	3	23,040	D
BS23 t = 44	3	22,907	D
BS34 t = 44	3	22,373	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 28. Comparación estadística del consumo de azúcares a las 44 horas de fermentación en incubadora.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS34 t = 20	3	1,17803	A
BS50 t = 20	3	1,07030	B
BS23 t = 20	3	0,87073	C
BS03 t = 20	3	0,782433	D
BS07 t = 20	3	0,700133	E
BS31 t = 20	3	0,599567	F
BS18 t = 20	3	0,372467	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 29. Comparación estadística de la densidad óptica a las 20 horas de fermentación lograda en incubadora.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS03 t = 44	3	1,32593	A
BS31 t = 44	3	1,28310	B
BS07 t = 44	3	1,28063	B
BS50 t = 44	3	1,26297	C
BS34 t = 44	3	1,22010	D
BS23 t = 44	3	1,14157	E
BS18 t = 44	3	0,742100	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 30. Comparación estadística de la densidad óptica a las 44 horas de fermentación lograda en incubadora.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS31 t = 20	3	2,300	A
BS07 t = 20	3	1,400	B
BS50 t = 20	3	1,300	C
BS23 t = 20	3	1,300	D
BS03 t = 20	3	1,200	E
BS34 t = 20	3	1,200	F
BS18 t = 20	3	1,200	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 31. Comparación estadística de la viscosidad a las 20 horas de fermentación lograda en incubadora.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS31 t = 44	3	2,3667	A
BS07 t = 44	3	1,500	B
BS23 t = 44	3	1,4333	B C
BS50 t = 44	3	1,3333	C
BS03 t = 44	3	1,200	D
BS34 t = 44	3	1,200	D
BS18 t = 44	3	1,200	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 32. Comparación estadística de la viscosidad a las 44 horas de fermentación lograda en incubadora.

Los resultados de las fermentaciones llevadas a cabo en una incubadora microbiológica para evaluar el efecto del glutamato monosódico sobre las 3 mejores cepas se presentan en las figuras 33 a la 46

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS50	3	1,69190	A
BS23	3	1,52167	B
BS03	3	1,19447	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 33. Comparación estadística de la densidad óptica lograda después de 48 horas de inóculo para fermentación en incubadora de las 3 mejores cepas.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS50 - 48 t = 0	3	3018,33	A
BS23 - t = 0	3	3018,33	A
BS03 - 48 t = 0	3	3018,33	A
BS50 - 12 t = 0	3	3010,3	A
BS23 - 12 t = 0	3	3010,3	A
BS03 - 12 t = 0	3	3010,3	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 34. Comparación estadística del consumo de azúcares a 0 horas de fermentación utilizando las 3 mejores cepas en incubadora

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS03 - 48 t = 10	3	101,19	A
BS23 - t = 10	3	88,800	B
BS50 - 48 t = 10	3	85,133	C
BS03 - 12 t = 10	3	81,760	D
BS50 - 12 t = 10	3	72,120	E
BS23 - 12 t = 10	3	67,6400	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 35. Comparación estadística del consumo de azúcares a 10 horas de fermentación utilizando las 3 mejores cepas en incubadora

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS03 - 48 t = 20	3	90,693	A
BS23 - t = 20	3	77,067	B
BS50 - 48 t = 20	3	60,520	C
BS50 - 12 t = 20	3	45,480	D
BS23 - 12 t = 20	3	39,560	E
BS03 - 12 t = 20	3	37,6533	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 36. Comparación estadística del consumo de azúcares a 20 horas de fermentación utilizando las 3 mejores cepas en incubadora

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS03 - 48 t = 36	3	45,067	A
BS23 - t = 36	3	29,067	B
BS50 - 12 t = 36	3	26,293	C
BS50 - 48 t = 36	3	23,760	D
BS23 - 12 t = 36	3	22,493	D
BS03 - 12 t = 36	3	19,720	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 37. Comparación estadística del consumo de azúcares a 36 horas de fermentación utilizando las 3 mejores cepas en incubadora

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS03 - 48 t = 44	3	21,907	A
BS50 - 48 t = 44	3	20,747	A
BS23 - 12 t = 44	3	20,653	A
BS50 - 12 t = 44	3	20,360	A
BS03 - 12 t = 44	3	18,333	B
BS23 - t = 44	3	18,133	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 38. Comparación estadística del consumo de azúcares a 44 horas de fermentación utilizando las 3 mejores cepas en incubadora

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS23 - 12 t = 10	3	0,83417	A
BS03 - 12 t = 10	3	0,75960	B
BS50 - 12 t = 10	3	0,696700	C
BS23 - t = 10	3	0,565500	D
BS03 - 48 t = 10	3	0,47180	E
BS50 - 48 t = 10	3	0,41000	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 39. Comparación estadística de la densidad óptica a las 10 horas de fermentación de las 3 mejores cepas lograda en incubadora

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS23 - 12 t = 20	3	1,13040	A
BS03 - 12 t = 20	3	1,12857	A
BS50 - 12 t = 20	3	1,08920	B
BS23 - t = 20	3	0,96797	C
BS50 - 48 t = 20	3	0,75480	D
BS03 - 48 t = 20	3	0,63293	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 40. Comparación estadística de la densidad óptica a las 20 horas de fermentación de las 3 mejores cepas lograda en incubadora

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS23 - 12 t = 36	3	1,29283	A
BS03 - 12 t = 36	3	1,29253	A
BS50 - 12 t = 36	3	1,27900	A
BS23 - t = 36	3	1,18963	B
BS50 - 48 t = 36	3	1,01377	C
BS03 - 48 t = 36	3	0,95043	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 41. Comparación estadística de la densidad óptica a las 36 horas de fermentación de las 3 mejores cepas lograda en incubadora

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS23 - t = 44	3	1,37347	A
BS23 - 12 t = 44	3	1,3576	A
BS50 - 12 t = 44	3	1,26793	B
BS03 - 12 t = 44	3	1,26383	B
BS03 - 48 t = 44	3	1,1123	C
BS50 - 48 t = 44	3	1,06973	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 42. Comparación estadística de la densidad óptica a las 44 horas de fermentación de las 3 mejores cepas lograda en incubadora

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS50 - 48 t = 10	3	1,2564	A
BS50 - 12 t = 10	3	1,23529	A
BS23 - 12 t = 10	3	1,147	A B
BS03 - 12 t = 10	3	1,1176	B
BS03 - 48 t = 10	3	1,000	C
BS23 - t = 10	3	0,9744	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 43. Comparación estadística de la proporción de viscosidad medida a las 10 horas de fermentación con relación al medio original.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS50 - 12 t = 20	3	1,5000	A
BS50 - 48 t = 20	3	1,2564	B
BS23 - 12 t = 20	3	1,1765	B
BS03 - 12 t = 20	3	1,1765	B
BS03 - 48 t = 20	3	1,000	C
BS23 - t = 20	3	0,9231	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 44. Comparación estadística de la proporción de viscosidad medida a las 20 horas de fermentación con relación al medio original.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS50 - 12 t = 36	3	1,6369	A
BS50 - 48 t = 36	3	1,154	B
BS23 - 12 t = 36	3	1,147	B
BS03 - 12 t = 36	3	1,1369	B
BS03 - 48 t = 36	3	0,9231	C
BS23 - t = 36	3	0,8910	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 45. Comparación estadística de la proporción de viscosidad medida a las 36 horas de fermentación con relación al medio original.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BS50 - 12 t = 44	3	1,6765	A
BS23 - 12 t = 44	3	1,147	B
BS03 - 12 t = 44	3	1,0882	B C
BS50 - 48 t = 44	3	1,07692	B C
BS23 - t = 44	3	1,0513	B C
BS03 - 48 t = 44	3	1,000	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 46. Comparación estadística de la proporción de viscosidad medida a las 44 horas de fermentación con relación al medio original.