

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Evaluación del potencial de producción de ácido láctico
mediante cepas de *Bacillus subtilis*.
Proyecto de investigación**

Antonia Castells Román

Ingeniería en procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en procesos Biotecnológicos

Quito, día 6 de diciembre de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Evaluación del potencial de producción de ácido láctico mediante cepas de
Bacillus subtilis

Antonia Castells Román

Calificación:

José Álvarez, Ph.D.
Co-Director de Proyecto de Titulación

Antonio León-Reyes, P.h.D.
Co-Director de Proyecto de Titulación

Quito, 6 de diciembre de 2018

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 el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Antonia Castells Román

Código: 107763

Cédula de Identidad: 1717858615

Lugar y fecha: Quito, diciembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por su paciencia durante mi carrera.

A mis directores: José Álvarez por su apoyo, no solo como director sino como amigo por su paciencia y motivación durante este trabajo y a Antonio León por toda su ayuda.

Gracias Noelia Barriga y Darío Ramírez por todo su apoyo y amistad.

A Inés Cadena por todo el trabajo de laboratorio y su ayuda en este proyecto.

A Paula Erazo sin quien el trabajo en el laboratorio habría sido mucho menos feliz.

A Sebastián Torres por su apoyo incondicional y a mi Madre por los reactivos controlados.

.

RESUMEN

El ácido láctico es un compuesto orgánico con dos isómeros ópticos, D y L, con amplias aplicaciones en la industria química, farmacéutica y de alimentos. Por su aplicabilidad en la generación de biopolímeros se ha tomado un nuevo interés en la producción de ácido láctico, buscando el abaratamiento de costos operativos y condiciones de cultivo. Al no existir producción de este compuesto en Ecuador y al ser la demanda mundial como nacional cada vez mayor, la investigación que permita producción a nivel local es indispensable. Dentro de los organismos que destacan por los beneficios que proponen en la producción está *Bacillus subtilis*. En el presente proyecto se identificaron 6 cepas de *Bacillus subtilis* mediante galerías API50, los cuales fueron analizados frente a producción de ácido láctico a partir de glucosa. Se identificaron las 3 mejores cepas: BS18, BS31 y BS50 para la producción de ácido láctico y se evaluaron sus rendimientos bajo condiciones aeróbicas, anaeróbicas y microaeróbicas. La mayor producción de ácido láctico se evidenció en condiciones aeróbicas con eficiencias de aproximadamente 0.25 gramos de ácido láctico por gramo de glucosa en las cepas BS18, BS31 y BS50 equivalente a 5g/L ácido láctico. Adicionalmente se analizó la producción de ácido láctico a partir de una de las cepas con mayor producción utilizando melaza como sustrato. La cepa BS50 mostro un rendimiento de 0.065g de ácido láctico por g de azúcares totales equivalente a 1.3 g/L ácido láctico, utilizando melaza tipo C como fuente de carbono. Mediante la presente investigación se logró establecer metodologías y alcanzan producciones razonables de ácido láctico con las cepas de *Bacillus subtilis*, además se lograron identificar 3 cepas que se muestran prometedoras para la producción de ácido láctico en el país.

Palabras clave: Ácido láctico, *Bacillus subtilis*, fermentación, Api50CH/B, lactato de hierro III, melaza.

ABSTRACT

Lactic acid is an organic compound with two optical isomers: L and D, with diverse applications in the pharmaceutical, food, and chemical industries. Due to its applications as a monomer in the production of bioplastics, operation cost reduction has regained priority in the lactic acid industry. Given the lack of availability of this compound in Ecuador, alternatives for local production have become imperative. Amongst the microorganism that show promise, due to cost reduction and wider operation conditions, is *Bacillus subtilis*. In this project 6 *Bacillus subtilis* strains identified via API50 galleries were evaluated in lactic acid production from glucose. The three best performing strains BS18, BS50 and BD31 were grown under aerobic, microaerobic and anaerobic conditions. The highest production rates were found under aerobic conditions. Efficiencies found under aerobic conditions with the best 3 strains selected, were approximately 0.25 lactic acid grams per gram of glucose consumed, equal to 5g/L . Additionally, lactic acid production was measured using one of the best performing strains in a molasses type C medium. The production obtained by strain BS50 in aerobic conditions with molasses as a carbon source were around 0,065 grams of lactic acid per gram of total sugars equivalent to 1.3g/L of lactic acid. With this study methodologies were established for the production of lactic acid production as well as identifying 3 *Bacillus subtilis* strains that show promise in lactic acid production in the country.

Key words: Lactic acid, *Bacillus subtilis*, fermentation, API50CH/B, iron lactate III, Molasses.

TABLA DE CONTENIDO

1.	Introducción.....	10
1.1	Ácido láctico: usos, producción e importancia.....	10
1.2	<i>Bacillus subtilis</i> en la producción de ácido láctico.....	11
1.3	Materias primas en la producción de ácido láctico.....	14
2.	Justificación.....	17
3.	Area de estudio.....	19
4.	Objetivos.....	20
5.	Materiales.....	21
6.	Metodología.....	25
6.1	Identificación de cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	25
6.1.1	Preparación del inóculo para galerías API50CH/B.....	25
6.2	Evaluación de las cepas en la producción de ácido láctico a partir de glucosa.....	26
6.2.1	Screening Medio MT.....	26
6.3	Análisis del efecto del oxígeno sobre la producción de ácido láctico.....	27
6.4	Producción de ácido láctico partir de melaza tipo “blackstrap o C”.....	28
6.5	Cuantificación de variables y estandarización de métodos:.....	29
6.5.1	Determinación espectrofotométrica de ácido láctico mediante cloruro de hierro III.....	29
6.5.2	Determinación espectrofotométrica de glucosa mediante el método de Dubois ácido sulfúrico-fenol.....	29
6.5.3	Cuantificación de Biomasa.....	30
6.6	Análisis estadístico.....	30
7.	Resultados.....	32
7.1	Identificación de cepas de <i>Bacillus subtilis</i> mediante el análisis de la secuencia 16 S.....	32
7.2	Estandarización de métodos y curvas de calibración.....	35
7.3	Fermentaciones preliminares en medio MT.....	36
7.4	Análisis del efecto del oxígeno sobre las 7 cepas de <i>Bacillus subtilis</i> en la producción de ácido láctico.....	38
7.5	Cinéticas de producción de ácido láctico, biomasa y consumo de glucosa de las 3 mejores cepas.....	39
7.6	Producción de ácido láctico a partir de melaza utilizando la cepa BS50.....	45
8.	Discusión.....	47
9.	Conclusiones.....	53
10.	Recomendaciones.....	54
11.	Literatura citada.....	55
12.	Anexos.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de productos de la fermentación en <i>Bacillus subtilis</i>	12
Figura 2 Mecanismo de acción de la enzima lactato deshidrogenasa.....	13
Figura 3 Heat map del perfil metabólico obtenido con las galerías API50CH/B de 6 de las cepas analizadas y porcentajes de similitud según perfil metabólico. Se presentan en azul los resultados negativos y en naranja los carbohidratos fermentados.....	34
Figura 4 A: Curva de calibración Glucosa en mg/L vs Absorbancia a 490nm. Método Ácido sulfúrico-fenol B: Curva de calibración Ácido láctico g/L vs Absorbancia a 390nm, utilizando el método espectrofotométrico de cloruro de hierro III.....	36
Figura 5 Producción de ácido láctico de las 7 cepas de <i>Bacillus subtilis</i> , utilizando glucosa como sustrato, bajo condiciones de aerobiosis. Se presenta el grupo al que pertenece cada media según análisis de medias con Tuckey 5%.	37
Figura 6 Producción de ácido láctico a partir de las cepas BS18, BS31 y BS50 en condiciones anaeróbicas, micro aeróbicas y aeróbicas, utilizando glucosa como sustrato.	39
Figura 7 Consumo de glucosa de las cepas BS18, BS31 y BS50 en condiciones aeróbicas, utilizando glucosa como sustrato.	40
Figura 8 Cinética de producción de ácido láctico cepas BS18, BS31 y BS50 en condiciones aeróbicas, utilizando glucosa como sustrato.	41
Figura 9 Cinética de producción de biomasa de las cepas BS18, BS31 y BS50 en condiciones aeróbicas.	41
Figura 10 pH según tiempo de fermentación en cepas BS18, BS31 y BS50 en condiciones aeróbicas, utilizando glucosa como sustrato.	42
Figura 11 Cinética de consumo de glucosa, producción de biomasa y producción de ácido láctico en g/L de la cepa BS18.	43
Figura 12 Cinética de consumo de glucosa, producción de biomasa y producción de ácido láctico en g/L de la cepa BS31.	44
Figura 13 Cinética de consumo de glucosa, producción de biomasa y producción de ácido láctico en g/L de la cepa BS50.	45
Figura 14 Cinética de consumo de glucosa, producción de ácido láctico y biomasa de la cepa BS50 en melaza.	46
Figura 15 Balance de masa, según eficiencias obtenidas con las cepas de <i>Bacillus</i> analizadas a partir de glucosa y melaza como sustrato.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Producción de ácido láctico en g/L de distintas cepas de <i>Bacillus subtilis</i> y sustrato utilizado para la fermentación según el estudio.	14
Tabla 2 Identidad de las 7 cepas analizadas como parte del grupo <i>Bacillus subtilis</i> , según homología de la secuencia de la región 16S con la base de datos Gen Bank analizado mediante BLAST.	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ácido láctico: usos, producción e importancia.

El ácido láctico es un compuesto orgánico con dos formas ópticas activas, D-(-) y L-(+), ampliamente utilizado en las industrias cosmética, textil, química, farmacéutica y alimenticia (Gao et al, 2012). Aparte de su gran aplicabilidad en la industria, mediante rutas tanto químicas como bioquímicas puede utilizarse como materia prima para la obtención de otros compuestos de interés industrial, a la par de biopolímeros. Esta última aplicación ha generado un nuevo enfoque en el ácido láctico con el subsecuente interés por parte de la industria en la disminución de los costos de producción, diversificación de materias primas y aumento de rendimiento (Abdel-Rahman *et al.* 2013). Por estas razones, en conjunto con ser un elemento que puede ser producido a partir de fuentes renovables, el ácido láctico fue nombrado en el 2010 como la materia prima del futuro por el Departamento de energía de los Estados Unidos (Jong *et al.* 2012).

El ácido láctico puede producirse de dos maneras, la primera mediante la síntesis química, usualmente por medio de la hidrólisis de lacto nitrilo con ácidos fuertes (Rojan et al, 2017) y, la segunda, por producción mediada por microorganismos. Si bien existen otras alternativas para la producción mediante síntesis químicas, estas no son económicamente viables y el proceso da como resultado una mezcla racémica (Datta *et al.* 1995; Gao *et al.* 2011). La producción mediada por microorganismos es preferida ya que puede direccionarse hacia la formación de un solo isómero óptico, dando más potencial de aplicabilidad al ácido láctico (Nguyen et al, 2012); además comparativamente, el costo de materias primas es menor, y las condiciones de operación aminoran los costos energéticos (Mussatto et al., 2009, John et al 2009). Por estas razones, más del 90% de la producción de ácido láctico recae sobre procesos fermentativos, equivalente a alrededor de 72000 toneladas al año mundialmente (Romero-García et al, 2009).

A pesar de los beneficios que propone la producción mediante fermentación, existen limitantes y espacios para la mejora en la obtención de ácido láctico. Especies comúnmente utilizadas industrialmente, como *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis* presentan tasas de crecimiento bajas a la par de altos requisitos nutricionales (Ohara, 1996; Kadam et al 2006). Dentro de las nuevas especies investigadas por su potencial para la producción de ácido láctico, destaca *Bacillus subtilis* por sus altas tasa de crecimiento, versatilidad frente al uso de diversos sustratos para los procesos fermentativos, además de su habilidad de crecer en medios sencillos que simplifican el posterior proceso de purificación (Ohara & Yahata, 1996).

1.2 *Bacillus subtilis* en la producción de ácido láctico.

B. subtilis es una bacteria formadora de esporas, catalasa positiva del tipo GRAS (generally recognized as Safe) por la FDA, que se considera la bacteria gram positiva más estudiada además de un organismo modelo.

A pesar de haberse considerado un aerobio estricto, *Bacillus subtilis* puede crecer tanto en condiciones aeróbicas con celobiosa por la presencia del operón cel RABCD que codifica la EII permeasa y proteínas fosfo-beta-glucosídicas, como de manera anaeróbica mediante amonificación del nitrato y varios procesos fermentativos (Romero et al 2009., Ramos et al 2000). En condiciones anaeróbicas *B. subtilis* utiliza glucosa como su fuente de carbono para producir L lactato y 2,3 butanediol como subproductos principales; sin embargo, existen otros posibles subproductos del proceso fermentativo como se muestra en la figura 1 (Ramos et al 2000., Gao et al 2012).

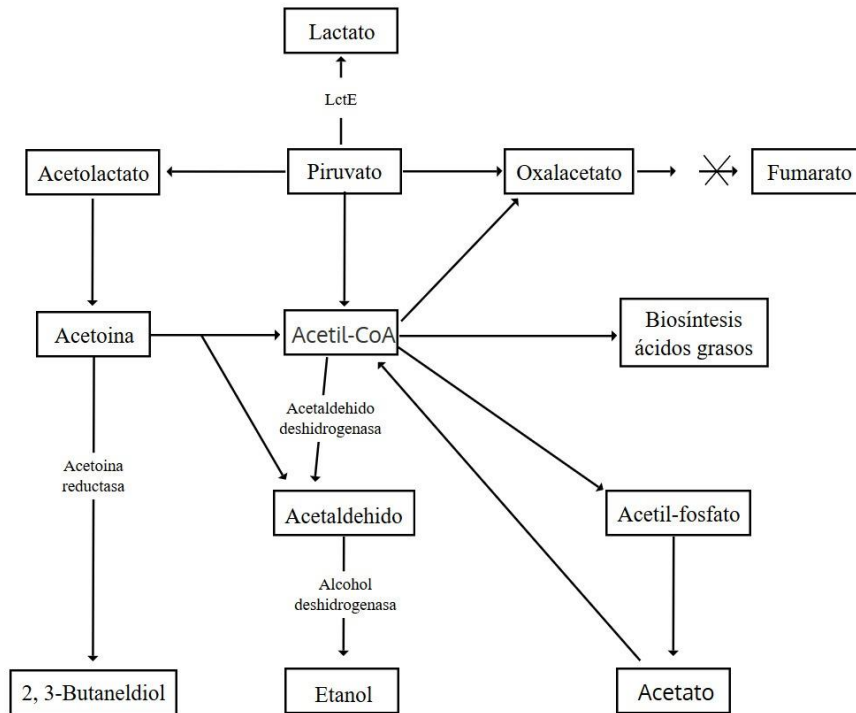


Figura 1 Diagrama de productos de la fermentación en *Bacillus subtilis* adaptado de (Ramos et al 2000).

En el proceso de respiración anaeróbica en *B. subtilis*, se genera ATP mediante la amonificación del nitrato, en el cual, el nitrato es reducido por una enzima nitrato reductasa (NarGHI) a nitrito. El nitrito sigue el proceso de reducción a amonio por medio de una enzima nitrito reductasa celular general (NasDE) (Marino et al, 2001). La producción de ácido láctico en *Bacillus subtilis* es dependiente del locus *lctEP* que codifica una enzima lactato deshidrogenasa codificada por el gen *lctE* y lactato permeasa putativa codificada por el gen *lctP*. La enzima lactato permeasa putativa es una proteína de transporte perteneciente a la familia de proteínas de transporte de iones, superfamilia IT. Por otra parte, la enzima lactato deshidrogenasa cataliza la formación de lactato a partir de piruvato, NADH en NAD⁺ y viceversa, mediante la transferencia de un anión hidronio como puede evidenciarse en la figura 2 (Ramos et al 2000).

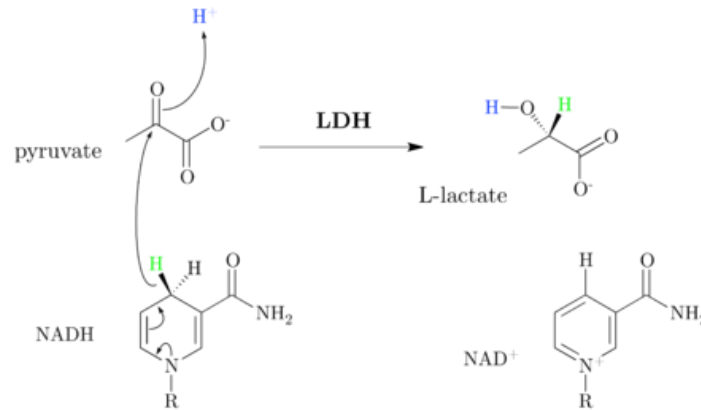


Figura 2 Mecanismo de acción de la enzima lactato deshidrogenasa (Jazzlw, 2015).

Mutaciones en el gen *lctE* resultan en una reducción drástica del crecimiento anaeróbico independiente de la presencia de otros aceptores finales de electrones, indicando la importancia de la Re-oxidación del NADH por la enzima lactato deshidrogenasa en el metabolismo anaeróbico de *Bacillus subtilis* (Ramos et al, 2000).

Frente a la producción de forma industrial, existen numerosos estudios que reportan la producción de ácido láctico mediante *Bacillus subtilis* como una alternativa relevante frente a otros microorganismos tanto por altos rendimientos, como facilidad en el manejo del cultivo (Gao et al 2012). Si bien la producción mediante este microorganismo es prometedora existen fuertes diferencias en la productividad dependiendo de la cepa utilizada. Según sea el microorganismo, materias primas y condiciones de operación de los reactores las concentraciones alcanzadas pueden oscilar entre los 1.5 y 150 gramos por litro como se muestra en la tabla 1 (Gao et al 2012, Romero-Garcia et al 2009), encontrándose las cepas “wild type” en aproximadamente 2-4 g/L.

Tabla 1 Producción de ácido láctico en g/L de distintas cepas de *Bacillus subtilis* y sustrato utilizado para la fermentación según el estudio.

Cepa	Sustrato	Ácido Láctico (g/L)	Fuente
<i>Bacillus subtilis</i> MUR1	Glucosa	143.2	(Gao et al 2012)
<i>Bacillus subtilis</i>	Glucosa	3.7	(Ohara & Yahata, 1996)
<i>Bacillus subtilis</i> CH1	Celobiosa	11.6	(Romero-García et al 2009)
<i>Bacillus subtilis</i> CH1	Glucosa	13	(Romero-García et al 2009)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Glucosa/Piruvato	2.1	(Ramos et al 2000)

1.3 Materias primas en la producción de ácido láctico.

El actual interés en la producción de ácido láctico es la disminución de costo asociados a la producción, con el afán de volver rentable la fabricación de biopolímeros y otros derivados. Dentro de los costos uno de los rubros de mayor importancia corresponde al de las materias primas utilizadas en el proceso, por lo cual la investigación en fuentes renovables y económicas es extensa (Abdel-Rahman *et al.* 2013). El costo asociado a las materias primas se encuentra entre el 40 y 70% de los costos totales de producción (Tejayadi and Cheryan, 1995). Las bacterias del género lactobacillus por lo general tienen requisitos nutricionales complejos y requieren de medios ricos en nutrientes por la habilidad limitada que poseen para la producción de vitamina B y aminoácidos (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal 2000).

Normalmente las fuentes principales de nitrógeno utilizadas en los medios de cultivo para la producción de ácido láctico corresponden al extracto de levadura y sulfato de amonio, de estas la primera resulta la mejor opción para la producción de ácido láctico a partir de Lactobacillus; sin embargo, a escala industrial resulta altamente costosa y por ende poco atractiva (Jin *et al.* 2003). La adicción de otros nutrientes, generalmente, tiene un efecto

positivo sobre el cultivo de este tipo de microorganismo (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal 2000). Ya que el costo asociado al extracto de levadura, azúcares purificadas como fuentes de carbono además de otros nutrientes adicionados a los medios de cultivo son elevados, existe una preferencia sobre alternativas como materias primas para la producción. En este aspecto, la consideración sobre tanto residuos de la industria agrícola, así como desechos alimenticios como materia prima son preferidos no solo por costos sino por su eco amigabilidad (Abdel-Rahman *et al.* 2013).

Uno de los sustratos considerados para la producción de ácido láctico es la biomasa lignocelulósica que es la fuente más abundante de biomasa a nivel global. La lignocelulosa previa a ser fermentada necesita de pretratamientos que liberen los azúcares presentes, volviendo el proceso poco costo eficiente. Adicionalmente los remanentes de los compuestos utilizados para el tratamiento de esta biomasa resultan tóxicos para una gran mayoría de los microorganismos utilizados para fermentación. A pesar de esto, nuevas alternativas a los procesos de pretratamiento están siendo investigadas con resultados interesantes como el pretratamiento hidrotermal (Komesu *et al.* 2017). Uno de los desechos asociados a la producción de alimentos atractivos por su rentabilidad y disponibilidad es la melaza. El uso de melaza como materia prima en la producción de ácido láctico, al ser un producto de desecho, disminuirá considerablemente los costos productivos (Dumbrepatil *et al.* 2008).

La melaza es un producto que puede ser fabricado a partir de remolacha, caña de azúcar o xilosa, mediante la clarificación, concentración y extracción de la sucrosa en el proceso de refinamiento del azúcar. (Pérez, 1995). Existen diferentes tipos de melazas dependiendo del paso del proceso del que provengan; según esto, están las melazas de tipo A, B y C o “blackstrap”. (Castañeda-Ayarza 2012). Las melazas de tipo A corresponden al producto intermediario obtenido de la producción de azúcar tipo A en el que se extrae aproximadamente el 77% del azúcar total disponible. Las melazas de tipo B conocidas como segundas melazas

proviene de la segunda extracción por centrifugación del 12% de azúcar contenido en la mezcla melazas A-Azúcar, finalizada la extracción alrededor del 89% del azúcar total recuperable ha sido extraído. Las melazas tipo C corresponden a la extracción de la azúcar contenida en la melaza tipo B mezclada con cristales de azúcar virgen. La melaza tipo C a pesar de poseer una alta concentración de azúcares totales, no es procesada ya que la extracción del azúcar que contiene no resulta económicamente viable. (Perez, 1995; Castañeda-Ayarzaa et al, 2017). Considerando que la melaza tipo C es un producto de desecho con limitadas aplicaciones industriales, la diversificación de su uso como materia prima posee un atractivo comercial. A pesar de que la melaza, como está expresado en la tabla 1 de la sección anexos, tiene una composición que resulta interesante para su uso como medio de cultivo, existe ciertas deficiencias metabólicas a la par de generar inhibición del crecimiento en ciertos microorganismos por la presencia de metales pesados.

2. JUSTIFICACIÓN

El mercado de ácido láctico ha tenido un aumento progresivo en los últimos años, tanto por su importancia en la industria cosmética, textil, química, farmacéutica, alimenticia, como en la aplicación de nuevas tecnologías como la producción de biopolímeros. Si bien, la demanda de ácido láctico crece en el Ecuador a la par del resto de Sudamérica, actualmente en el país no existe producción de este compuesto.

Según los datos publicados por la aduana ecuatoriana en el 2017 se importaron alrededor 100 Toneladas de ácido láctico, con valor aproximado de \$10,000,000 dólares americanos. El precio comercial del Kilogramo de ácido láctico depende fuertemente de su grado de pureza, oscilando entre 3 y 500 dólares americanos. A pesar del consumo anual en el Ecuador sea superior a los \$10,000,000 anuales no existe, a conocimiento de los autores, producción de este compuesto a nivel nacional.

Respecto a la producción de melaza en el Ecuador, durante el año 2015, fue de aproximadamente 7 millones de toneladas (MAGAP), equivalente a 72,000 hectáreas de las cuales 8,000 hectáreas se destinan únicamente a la producción de melaza (Vega, 2016). A parte de la melaza producida como fin, esta también es el subproducto del proceso de refinamiento del azúcar y debido a la competitividad del mercado la diversificación de los usos de los productos de desechos puede resultar en una alternativa económicamente interesante para la producción ecuatoriana.

El enfoque del estudio de la obtención de ácido láctico actualmente recae sobre la optimización del proceso de producción, con especial énfasis en el abaratamiento de los costos de materias primas y procesos de separación (Abdel-Rahman et al. 2013; Nolasco-Hipolito et al. 2002). Dada la importancia de este producto como monómero para la producción de bioplásticos y otros compuestos de interés. Es por esto por lo que en el presente estudio se

pretende evaluar la viabilidad de la producción de ácido láctico, mediante especies de *Bacillus subtilis*, obtenidas del banco de microorganismos CIBEL-ESPOL, como una alternativa para el abaratamiento de costos en la obtención de ácido láctico, a la par de otorgarle valor agregado a los subproductos de la producción de azucara partir de caña.

3. AREA DE ESTUDIO

Para el presente estudio se trabajó con 7 cepas de *Bacillus subtilis*, que fueron obtenidas mediante el convenio CIBEL-ESPOL, a través del proyecto REDU. Estas cepas fueron aisladas tanto de plantas sanas como enfermas en cacao nacional en diferentes localidades de la provincia de Guayas. Los análisis tanto de producción de ácido láctico, consumo de glucosa, producción de biomasa, pH fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos, y en los Laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el potencial de 7 cepas de *B. subtilis* en la producción de ácido láctico a partir de glucosa y melaza tipo C.

Objetivos específicos

1. Confirmar la identidad de al menos 6 cepas de *B. subtilis* mediante pruebas bioquímicas al menos 6 cepas de *B. subtilis*.
2. Determinar las condiciones de cultivo óptimas para *B. subtilis* en función de la producción de biomasa obtenida mediante peso seco.
3. Evaluar el potencial de diversas cepas de *B. subtilis* para la producción de ácido láctico a partir de glucosa.
4. Determinar el potencial de cepas seleccionadas de *B. subtilis*. para la producción de ácido láctico a partir de melaza “blackstrap” o tipo C.

5. MATERIALES

Identificación de Cepas *Bacillus subtilis*.

- BLAST (Nucleotic BLAST): disponible en NCBI
- Galerías API50

Preparación de las cepas para cultivo:

- Hisopos Autoclavados
- Ultra congelador -80°C
- Cámara de flujo con luz UV
- Cajas Petri
- Frascos Boheco
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Cepas *B.subtilis* convenio CIBEL-ESPOL
- Extracto de carne (Sigma-Aldrich)
- Extracto de levadura (Sigma-Aldrich)
- Peptona (Sigma-Aldrich)
- Agar-Agar (Difco-Bacto)
- Autoclave
- Pesa muestras
- Balanza analítica

Cuantificación de glucosa:

- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Fenol 80%
- Ácido sulfúrico concentrado 95%
- Celda espectrofotométrica cuarzo
- Espectrofotómetro Jenway 7305
- Balanza analítica
- Vortex Scientific Industries Inc.
- Baño María
- Sorbona
- Parafilm M®
- Micropipetas Eppendorf 1-5ml y 10-100 μ L
- Microscopio

Cuantificación ácido láctico:

- Cloruro de Hierro III Hexa hidratado.
- Celdas espectrofotométricas de cuarzo
- Espectrofotómetro con rango UV
- Tubos de Ensayo
- Gradillas
- Balanza analítica
- Vortex
- Pipetas eppendorf

Cuantificación de Biomasa

- Balanza analítica
- Centrifuga
- Tubos eppendorf 15ml
- Balanza analítica
- Solución Salina 0.8%
- Micropipetas

Medición pH

- Potenciómetro pG Mi 151, MILWAUKEE
- Agua destilada
- Plancha de agitación magnética.

Fermentación en medio MT con cepas de *B. subtilis*

- Asa Bacteriológica
- Algodón gasa y masking tape
- Manguera para venoclisis (toma de muestras)
- Erlenmeyer 100ml
- Incubador con agitación
- Tapones gasa y algodón
- Mechero Bunsen
- Autoclave
- Peptona
- Extracto de levadura
- Probeta 1000ml
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- KH_2PO_4 , 1.5g/L K_2HPO_4 ,
- MgCl_2
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- MgO ,
- CaCO_3 ,
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
- $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,
- $\text{CoSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
- H_3BO_3 ,
- ácido clorhídrico concentrado.
- Nitrógeno Gas
- Jarras Tipo Gaspac

6. METODOLOGÍA

6.1 Identificación de cepas de *Bacillus subtilis*.

A partir del trabajo previo de secuenciamiento del 16S ribosomal, utilizando los primers universales 27F y 1492R, llevado a cabo por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador de La Escuela Superior Politécnica del Litoral (CIBE-ESPOL), se procedió al análisis de las 7 cepas mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en NCBI. BLAST es un sistema que mediante algoritmos identifica segmentos con alta similitud, entre la muestra analizada y una base de datos. Con la información obtenida del 16S se identificaron las cepas como pertenecientes al grupo de *B. subtilis*. Reconocidos los microorganismos como parte del grupo de *B. subtilis* se procedió al análisis metabólico de las cepas a través de galerías API 50 CH/B, que además de proveer información sobre la especie otorga un perfil metabólico relevante para el estudio propuesto.

6.1.1 Preparación del inóculo para galerías API50CH/B

Cepas conservadas a -80°C de *Bacillus subtilis* fueron sembradas y cultivadas a 37°C durante 15 horas en agar nutritivo constituido por: 3g/L de extracto de carne, 5g/l de peptona y 15g/l de agar-agar ajustado a un pH final 7. Para el análisis preliminar de las cepas, se realizó una tinción gram y pruebas de catalasa para proceder a la propagación de las cepas y cultivo en galerías API. Se preparó una solución concentrada de microorganismos en solución salina al 0.85%, de esta solución se colocó un número X de gotas en un segundo tubo de solución salina con 5ml, tal que se llegase a una turbidez equivalente a 2 Mcfarland; es decir, una absorbancia de 0.242 a 600 nm. Para la preparación de la suspensión a inocular en la galería Api50CHB/E se colocaron 2 veces las X gotas, determinadas en el paso anterior, en 10 ml del medio CHB/E. El medio CHB/E, desarrollado para la identificación de *Bacillus* y géneros relacionados y está compuesto de 2/L g de sulfato de amonio 0.5 g/L de extracto de levadura,

1 g/L de tripona de origen animal, 3.22 g/l de fosfato disódico, 0.12g/L fosfato mono potásico 10ml/L de elementos traza y 0.17g/L de rojo de fenol. Se llenaron los tubos sin las cúpulas y se incubó a temperatura ambiente, humedeciendo el panel posterior de la cámara. Los resultados se recogieron a las 48 ± 2 horas de la inoculación.

6.2 Evaluación de las cepas en la producción de ácido láctico a partir de glucosa

6.2.1 Screening Medio MT.

Se realizó un análisis preliminar de las 7 cepas en el medio de cultivo MT, propuesto por Gao et al en el 2016, que está compuesto de: 20g/l glucosa, 30 g/L maritona, 20g/l extracto de levadura, 6g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g/L KH_2PO_4 , 1.5g/L K_2HPO_4 , 0.03 g/L MgCl_2 , 0.08 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2.3 ml/L de una solución de micronutrientes. La solución de micronutrientes contiene: 10.75g/L MgO, 2g/L CaCO_3 , 4.5g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.44g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.12 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.28 g/L $\text{CoSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L H_3BO_3 y, 51.3 ml ácido clorhídrico concentrado. El medio de cultivo fue autoclavado durante 20 minutos a 121°C . Las fermentaciones se realizaron por triplicado en biorreactores de 100 ml, cerrados con tapones de gasa y algodón. Para la inoculación en medio MT se tomó una colonia de las cepas previamente cultivadas en agar nutritivo y sembradas a manera de estriado a 37°C durante 15 horas. Posterior a la inoculación se colocaron en una incubadora con agitación a 37°C con 200 rpm durante 72 horas.

Posterior al cultivo en medio MT se escogieron las cepas que presentaron mayores tasas de producción de ácido láctico. De las 7 cepas analizadas preliminarmente, se tomaron las tres cuya media mostró ser mayor que el resto según una comparación múltiple de medias de Tuckey y ANOVA. Las cepas elegidas fueron aquellas con código BS18, BS31 y BS50. En afán de determinar los tiempos a los cuales se evidenciaban mayores tasas de crecimiento,

producción de ácido láctico y consumo de glucosa, se realizaron cinéticas de consumo y producción durante las primeras 33 horas de cultivo. Para esto, se sembraron las cepas en triplicados y se analizaron los cultivos a las 0,3,6, 9, 24,27,30, 33 horas de la inoculación. Se cultivaron las réplicas a 37°C a 180rpm en fermentadores de 100ml en los cuales se colocaron mangueras de venoclisis para la toma de muestra. Al momento del muestreo se realizó una purga previa de la manguera de 1 ml, siguiendo la toma de la muestra correspondiente a 1.5ml mediante una jeringuilla estéril. Las muestras fueron separadas en dos alícuotas: una de 200µl y la segunda de 1.3ml. La primera utilizada en cuantificación de biomasa y la segunda inmediatamente centrifugada a 13,000rpm trasvasado el sobrenadante y almacenadas a 4°C hasta el momento de la cuantificación de ácido láctico, pH y glucosa producidos.

Debido a que *Bacillus subtilis* es un anaerobio facultativo y que algunos de los genes asociados a la respiración anaeróbica se ven exacerbados al presentarse condiciones anoxicas, se realizó un análisis de la implicación de distintas concentraciones de oxígeno en la producción de ácido láctico, con el afán de determinar las mejores condiciones de cultivo para la producción.

6.3 Análisis del efecto del oxígeno sobre la producción de ácido láctico.

De las cepas que presentaron mejores tasas de producción de ácido láctico se evaluó la productividad bajo condiciones anaeróbicas, aeróbicas y en micro anaerobiosis. A manera de control positivo, y para aseverar que el método permite la cuantificación de ácido láctico en medios complejos, se utilizó un *Lactobacillus spp.* Ya que en condiciones anaeróbicas *Bacillus subtilis* presenta tasas menores de crecimiento, a la par de que el lactobacillus utilizado como control positivo requiere para llegar a equilibrio 72 horas de cultivo, se extendió el tiempo de fermentación a 72 horas de cultivo. Las cepas se incubaron a 37°C durante 72 horas a 100rpm para cultivo anaeróbico y microaerófilo y a 180rpm en condiciones aeróbicas. Para manejar

condiciones de anaerobiosis se realizó una purga con Nitrógeno durante 30 segundos con un caudal de 2 L/min. En el caso de micro aerobiosis se crearon jarras tipo Gaspak, constituidas de cilindros metálicos que no permitían intercambio gaseoso en los cuales fueron colocadas velas hasta que se extinguiesen removiendo buena parte del oxígeno presente en el medio. Muestras se tomaron al tiempo cero y después de 72 horas de cultivo.

6.4 Producción de ácido láctico partir de melaza tipo “blackstrap o C”

La composición de las melazas de caña varía significativamente, dependiente del lote; sin embargo, una composición típica se refleja en lo establecido en la Tabla 1 en la sección de anexos. La melaza tipo C utilizada en los análisis de fermentación fue previamente caracterizada por el ingenio. “..”, obteniéndose una concentración de Sacarosa 41.79%, Glucosa 5.10% y fructosa 5.83%. Debido a las limitaciones del método con el que se trabajó en este estudio, no se logró corroborar los valores obtenidos en los azúcares de manera individual; sin embargo, la concentración de azúcares totales fue de aproximadamente 54g por cada 100g de glucosa. Considerando que el medio MT tiene un contenido total de azúcares de 20g/l se emuló estas concentraciones en azúcares totales en el medio compuesto por melaza y agua destilada correspondiente a 38 g/l de melaza. Ya que la melaza tiene de por si una fuente de nitrógeno y que *Bacillus subtilis* suele ser un microorganismo comúnmente encontrado en las melazas de todo el proceso productivo, no se agregó a el medio compuesto de agua destilada y melaza ningún nutriente adicional. Para las fermentaciones utilizando como medio de cultivo melaza, se escogió de manera arbitraria una de las 3 cepas que mejores tasas de producción de ácido láctico presentaron ya que no existieron diferencias estadísticamente significativas en las medias de producción. Se inoculó las muestras como se detalla para el medio MT y se cultivó por triplicado a 37°C a 180rpm en condiciones aeróbicas. Se tomó un total de 8 muestras por replica pasadas 0,3,6,9, 24,27,30, 33 horas de la inoculación.

6.5 Cuantificación de variables y estandarización de métodos:

6.5.1 Determinación espectrofotométrica de ácido láctico mediante cloruro de hierro III.

Se analizaron 4 variables para monitorear el cultivo de *Bacillus subtilis* que corresponden a: producción de ácido láctico, biomasa, pH y glucosa. Para el análisis del ácido láctico presente en las muestras se utilizó el método descrito por Borshchevskaya et al, en el 2016 para la cuantificación de ácido láctico en alimentos y medios de cultivo mediante espectrofotometría. El método de cuantificación fue modificado utilizando el medio de cultivo sin dilución para generar la curva de calibración a la par de ácido láctico grado analítico. Se realizaron 3 replicas y 7 puntos cuyas desviaciones del valor teórico fueron analizadas mediante un gage R&R cuyos resultados y ANOVA se presentan en la sección de anexos. Por limitaciones del sistema de medición se utilizaron 3ml de cloruro de hierro III y 75µL de la muestra, manteniendo las proporciones propuestos por el método. Las muestras se analizaron a 390nm inmediatamente después de colocada la muestra en el cloruro de hierro III.

6.5.2 Determinación espectrofotométrica de glucosa mediante el método de Dubois ácido sulfúrico-fenol.

Para la cuantificación de glucosa se utilizó el método espectrofotométrico propuesto por Dubois et al en 1956 con ligeras modificaciones. Para la preparación de la curva de calibración se utilizó el medio de cultivo y se analizó la linealidad y sesgo que presentaban los datos frente al valor teórico mediante un gage R&R y su respectivo ANOVA que se presentan en la sección de anexos. El método es replicable preciso y exacto en un rango de 10 a 40 mg/L considerando el medio de cultivo MT. Para realizar los estándares de la curva de calibración se utilizó un ácido láctico-L con pureza > 98% Sigma-Aldrich. Para el análisis de las muestras

se colocaron 2ml de la solución entre 10-40mg/L, se colocó 50µL de fenol al 80% y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado >96%. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente se homogenizaron y colocaron en baño maría durante 30 minutos a 27°C. Finalizado el proceso las muestras fueron leídas a 490nm correspondiente a la longitud de onda de mayor absorbancia para hexosas según lo establecido en el método.

6.5.3 Cuantificación de Biomasa

Para la cuantificación de biomasa se realizó una curva de calibración entre densidad óptica a 600nm y peso seco de la biomasa como fue descrito por Gao et al, en el año 2012. Para el análisis de peso seco se tomó 1.5 ml de la muestra y se centrifugo a 13,000rpm. El pellet formado fue lavado 3 veces para remover las impurezas del medio de cultivo con una solución salina al 0.8%. El pellet resultante fue secado hasta peso constante, dejado enfriar a temperatura ambiente y pesado. La curva de calibración de biomasa se presenta en la sección de Anexos.

Identificado las mejores condiciones de cultivo se procedió al análisis de la fermentación por medio de *Bacillus subtilis*, utilizando un medio compuesto de melaza tipo C.

6.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las fermentaciones se utilizó ANOVA seguido de pruebas de Tuckey con una confianza del 95%. Se comprobaron los supuestos necesarios previos al análisis de ANOVA frente a normalidad de las medias y se analizaron los residuales, descartando posibles errores en la selección del método. Todos los cálculos se llevaron a cabo mediante el programa estadístico MINITAB 2010.

Para las cinéticas en aerobiosis se presentan los datos con su correspondiente desviación estándar calculadas de manera automática por el programa SPSS en el cual se realizaron la mayor parte de las figuras presentadas.

Para el análisis estadístico de los métodos de cuantificación ácido láctico y glucosa, se realizó un análisis Gage R&R a través de MINITAB 2010. Los datos de linealidad y sesgo se presentan en la sección de Anexos. Previo al análisis de la fermentación se evidenció, mediante el análisis estadístico anteriormente mencionado, que ambos métodos fueron replicables y no sesgados en los rangos de cuantificación propuestos según cada método. Límites de detección y cuantificación no fueron determinados.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de cepas de *Bacillus subtilis* mediante el análisis de la secuencia 16 S

Para un acercamiento a la identificación de las cepas de *Bacillus* analizadas, se comenzó con la identificación de estas a partir de un análisis de la región 16 S mediante homología a través del programa BLAST (Altschul, 1990). Los resultados obtenidos de este análisis se presentan en la tabla 2. Se tomó la cepa con mayor cercanía a la secuencia analizada. Todos los valores de identidad fueron mayores al 99%, al igual que la cobertura del análisis. Todas las cepas analizadas fueron caracterizadas como una de las 8 especies del grupo *Bacillus subtilis*, ya que la técnica de secuenciamiento del 16S no permite la diferenciación de manera confiable, entre las especies que comprenden este grupo, análisis adicionales fueron necesarios para la identificación de especie.

Las galerías API50CH/B, permiten la identificación de bacterias pertenecientes al grupo *Bacillus subtilis* de manera más específica. El análisis metabólico realizado mediante estas galerías se recoge en la figura 3, correspondiente a un heat map. Todos los valores negativos, es decir, ausencia de metabolismo del carbohidrato, se muestran en azul; mientras que los valores positivos se encuentran en naranja.

Se puede observar que las cepas que presentan mayor diversidad en su metabolismo corresponden a BS03 y BS31, con 18 y 19 carbohidratos fermentados, respectivamente. Las cepas C50 y C18 son aquellas que presentaron menor diversidad metabólica. La cepa BS34 fue cultivada por duplicado en las galerías API pero mostró inhibición al momento del cultivo por lo cual los resultados obtenidos se omiten del heat map. Los porcentajes de similitud según perfil metabólico, con los esperados en una cepa de *Bacillus subtilis* se presentan en la figura 3. Los valores presentados en la tabla fueron obtenidos mediante el software, dispuesto por el

proveedor de las galerías API50CH/B bioMérieux, apiweb™ este software presenta el porcentaje de similitud entre la cepa analizada y el perfil metabólico esperado de una especie determinada de *Bacillus*. Todas las cepas muestran al menos un 95% de similitud.

Tabla 2 Identidad de las 7 cepas analizadas como parte del grupo *Bacillus subtilis*, según homología de la secuencia de la región 16S con la base de datos Gen Bank analizado mediante BLAST.

Cepa	Descripción	Mayor Puntaje	Puntaje Total	Cobertura Análisis	Valor E	Identidad	Acceso
BS03	<i>Bacillus subtilis</i> strain Bu15_05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1576	1576	100%	0.0	99%	KY671140.1
BS07	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SW19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1201	1201	100%	0.0	99%	MK160141.1
BS18	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SW19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1458	1458	100%	0.0	100%	MK160141.1
BS23	<i>Bacillus velezensis</i> strain WHPU-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1328	1328	100%	0.0	100%	MK156398.1
BS31	<i>Bacillus velezensis</i> strain L-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1679	1679	100%	0.0	100%	MF988704.1
BS34	<i>Bacillus velezensis</i> strain WHPU-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1177	1177	100%	0.0	100%	MK156148.1
BS50	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SW19 16S ribosomal.	1578	1576	100%	0.0	100%	MK160141.1



Cepa	DS3	DS7	DS18	DS23	DS31	DS50
% similitud <i>Bacillus subtilis</i>	99.9	99.9	95.1	97.9	99.9	99.2

Figura 3 Heat map del perfil metabólico obtenido con las galerías API50CH/B de 6 de las cepas analizadas y porcentajes de similitud según perfil metabólico. Se presentan en azul los resultados negativos y en naranja los carbohidratos fermentados.

7.2 Estandarización de métodos y curvas de calibración.

Los medios de cultivo producto de fermentaciones poseen una composición compleja cuyos componentes muchas veces generan interferencias al momento de analizar metabolitos determinados. En este caso específico el medio de cultivo tanto por su coloración como por sus componentes no pudo ser analizado mediante medios potenciométricos en conjunto con otros métodos espectrofotométricos ni titulación. Metodologías como cromatografía de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC), si bien son métodos sensibles, manejan precios altos por muestra, a la par de necesitar equipos costosos y específicos para el análisis y ser altamente demandantes en cuanto a tiempo. Por esto la necesidad de establecer metodologías replicables, sencillas y precisas para caracterizar los medios de cultivo se volvió imperativo en el estudio y los resultados de la estandarización de los métodos se presenta a continuación.

Las curvas de calibración para glucosa y ácido láctico y se resumen en la figura 4 A, B respectivamente. En el caso del método para cuantificación de ácido láctico en el cual se utiliza cloruro de hierro III en afán de producir lactato de hierro para su cuantificación a 390nm se evidencia una variabilidad explicada por el modelo del 98%. Si bien este valor es bajo, el método, como puede evidenciarse en el Gage R&R presentado en la sección de anexos, no presenta sesgos en el rango analizado y es replicable. También puede observarse que la mayoría de la variabilidad proviene de la concentración de ácido láctico en lugar de ruido o interferencia.

En la figura 4 se presenta la curva de calibración entre la glucosa y la densidad óptica a 490nm, medida mediante el método de ácido sulfúrico fenol propuesto por Dubois en el 1956. La curva de calibración se realizó a partir de medios de cultivo y concentraciones conocidas de glucosa. A pesar de que el método teóricamente tiene un rango hasta los 100mg/L, en el estudio propuesto se evidenció linealidad hasta los 50 mg/L. Si bien se observa que la variabilidad explicada por el modelo es de 99.9% la desviación estándar observada en los 50 mg/L es estadísticamente significativa volviendo el método confiable hasta los 40mg/L.

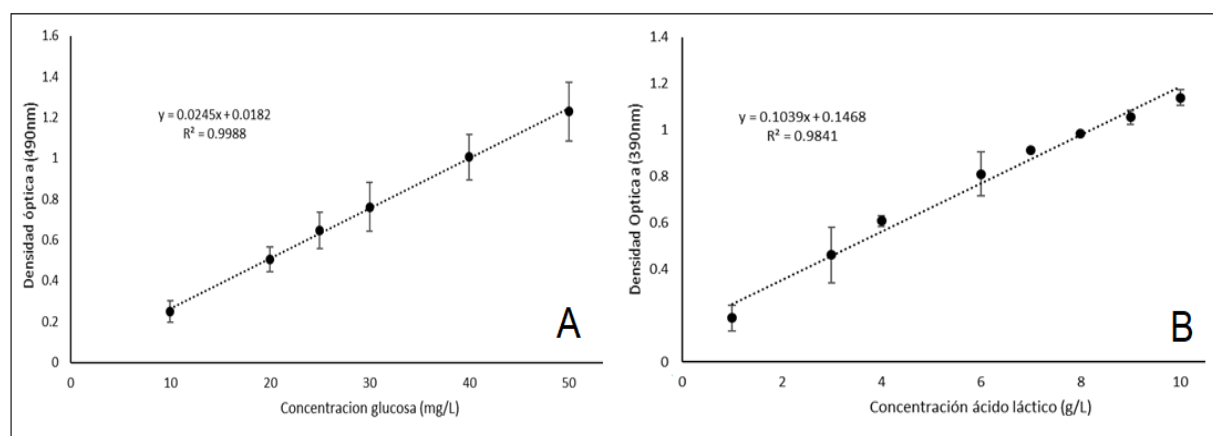


Figura 4 A: Curva de calibración Glucosa en mg/L vs Absorbancia a 490nm. Método Ácido sulfúrico-fenol B: Curva de calibración Ácido láctico g/L vs Absorbancia a 390nm, utilizando el método espectrofotométrico de cloruro de hierro III

7.3 Fermentaciones preliminares en medio MT.

Tras la caracterización de las cepas de *Bacillus subtilis* y la estandarización de los métodos de cuantificación, se procedió al análisis de las cepas frente a su capacidad de producción de ácido láctico a partir de glucosa. Las 7 cepas fueron analizadas en condiciones aeróbicas después de 72 horas de cultivo. Para el análisis estadístico, después de constatado que los datos siguen una distribución de probabilidad normal mediante el estadístico Anderson-Darling presentado en la sección de anexos, se realizó una prueba de ANOVA seguido de una

comparación de medias múltiples de Tuckey con una confianza del 95%. El análisis de residuales competente a la prueba de ANOVA se presenta en la sección de anexos, al igual que los valores p e intervalos de confianza.

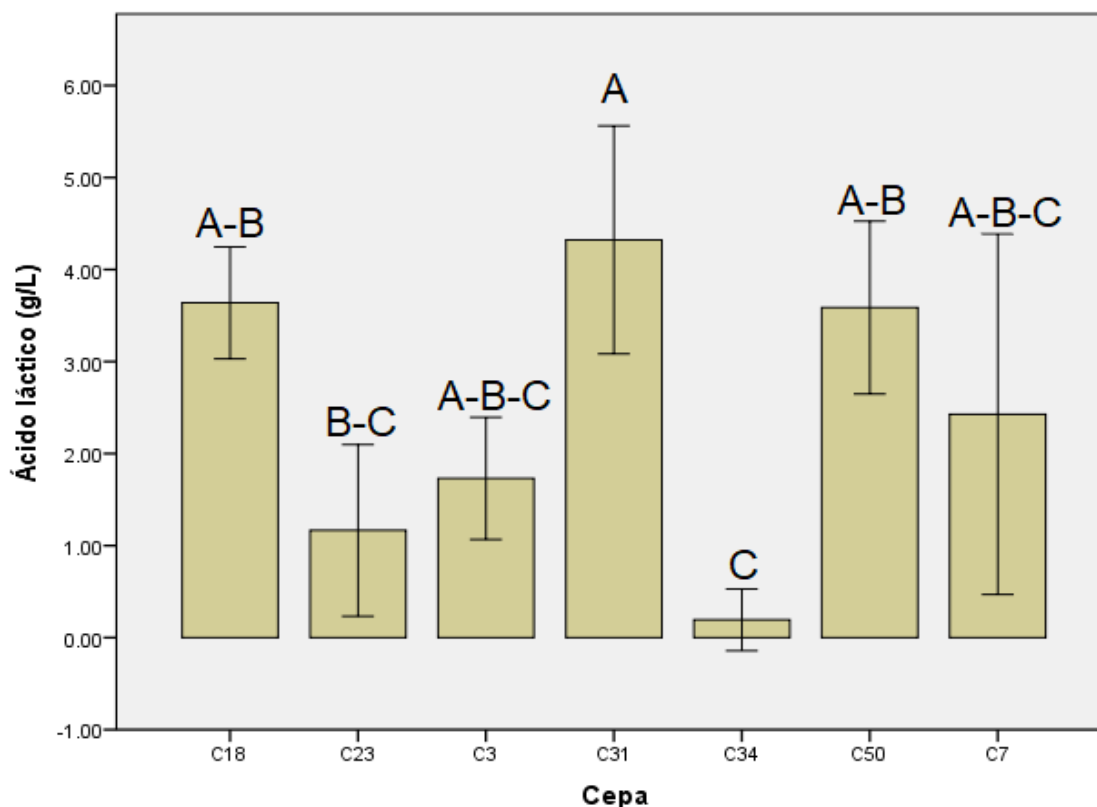


Figura 5 Producción de ácido láctico de las 7 cepas de *Bacillus subtilis*, utilizando glucosa como sustrato, bajo condiciones de aerobiosis. Se presenta el grupo al que pertenece cada media según análisis de medias con Tuckey 5%.

Los valores de medias y desviaciones estándar del análisis preliminar en medio MT de la producción de ácido láctico se presentan en la figura 6. Las cepas que mayores tasas de producción presentaron, fueron la; BS18, BS50 y BS31. Según el análisis de medias presentado en la tabla 4, la media de la producción de ácido láctico de la cepa BS31 es estadísticamente diferente a aquellas presentadas por las cepas BS50 y BS18, las cuales entre

ellas no presentan diferencias estadísticamente significativas. Las cepas BS03, BS34, BS07, BS23 presentaron producciones medias de ácido láctico menores comparativamente.

7.4 Análisis del efecto del oxígeno sobre las 7 cepas de *Bacillus subtilis* en la producción de ácido láctico.

Identificadas las cepas con mayor productividad se procedió al análisis del efecto de la concentración de oxígeno sobre la producción de ácido láctico. Los resultados obtenidos del cultivo en condiciones tanto aeróbicas, anaeróbicas y en micro aerobiosis se muestran en la figura 7. A manera de control positivo se utilizó un *Lactobacillus spp.* Los datos se tomaron posterior a 72 horas de cultivo. El análisis de ANOVA y residuales se presentan en la sección de anexos, en conjunto con las pruebas de Tuckey para cada una de las cepas analizadas. El análisis estadístico al conocerse la diferencia entre las medias por cepa fue realizado sobre el efecto de las condiciones de cultivo. El cultivo en aerobiosis presentó una producción media de ácido láctico estadísticamente mayor que los cultivos en anaerobiosis y micro aerobiosis. La cepa 18 presentó producción de ácido láctico en todas las condiciones de cultivo a diferencia de las cepas 31 y 50, que presentaron producción en condiciones aeróbicas.

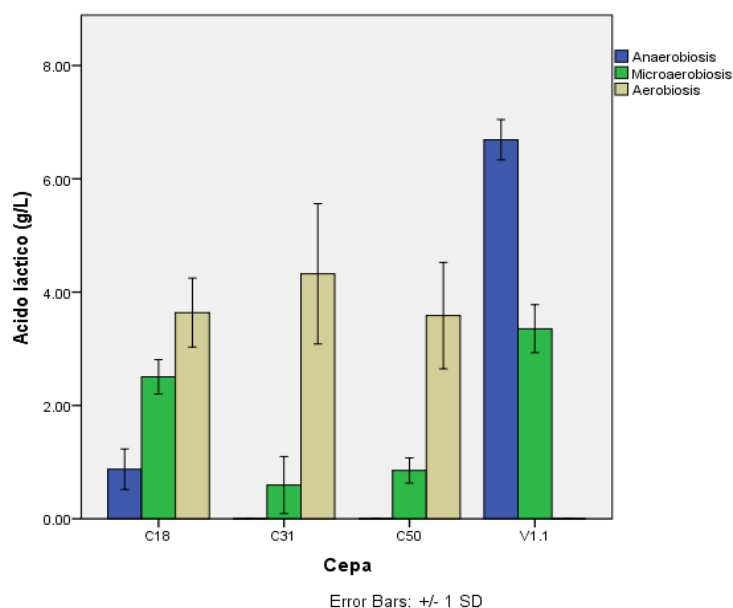


Figura 6 Producción de ácido láctico a partir de las cepas BS18, BS31 y BS50 en condiciones anaeróbicas, micro aeróbicas y aeróbicas, utilizando glucosa como sustrato.

7.5 Cinéticas de producción de ácido láctico, biomasa y consumo de glucosa de las 3 mejores cepas.

Al conocerse las mejores condiciones respecto a disponibilidad de oxígeno se procedió al análisis frente al tiempo de las variables biomasa, consumo de azúcar, y producción de ácido láctico en el medio MT. Como puede evidenciarse en la figura 8, correspondiente a consumo de glucosa se observa en todas las cepas un comportamiento similar, con un consumo pronunciado empezando alrededor de las 9 horas de cultivo, sin diferencias estadísticamente significativas entre las cepas en cuanto al consumo de glucosa.

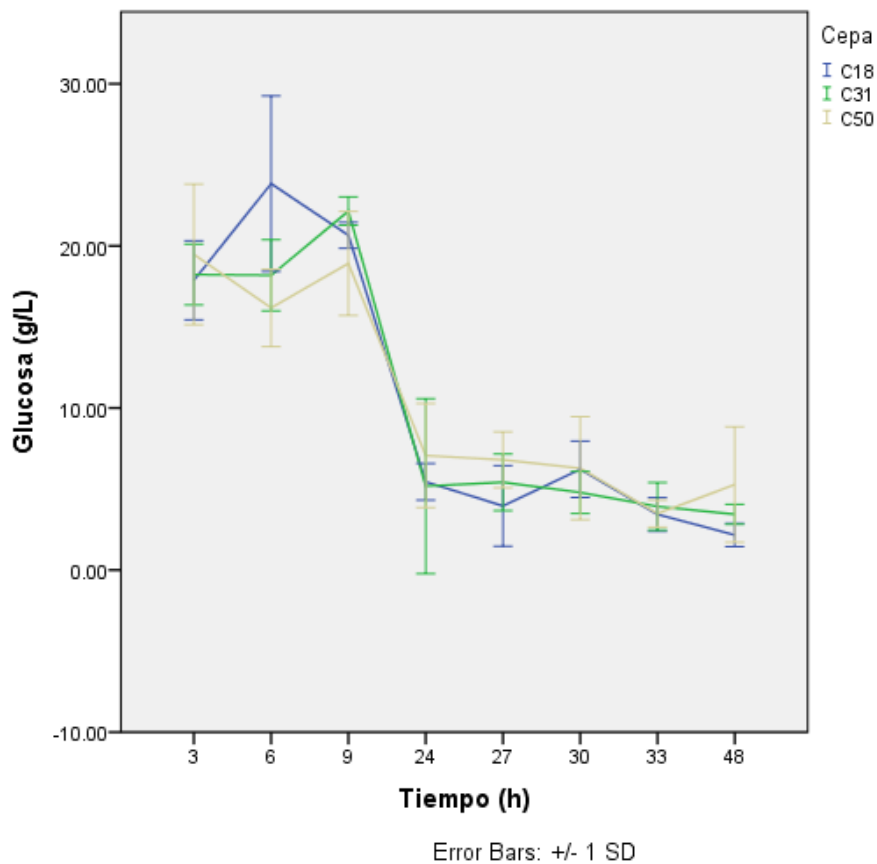


Figura 7 Consumo de glucosa de las cepas BS18, BS31 y BS50 en condiciones aeróbicas, utilizando glucosa como sustrato.

En la figura 9 se recoge la información correspondiente a la producción de ácido láctico por medio de las tres cepas analizadas. En los tres casos se observa una producción de ácido láctico concordante con el consumo de glucosa, empezando en las 9 horas de fermentación y estabilizándose a las 24 horas. La producción de ácido láctico por parte de las 3 cepas es homogénea, y no presenta ninguna diferencia según el análisis estadístico mediante ANOVA y comparación de medias por el método de Tuckey. Por otro lado, la producción de biomasa se presenta resumida en la figura 8 en la cual se puede observar un crecimiento exponencial entre las 9 y 27 horas de cultivo. Posterior al crecimiento exponencial durante las 27 y 30 horas, las cepas presentan un plató después de lo cual continúa una segunda fase de crecimiento celular. Las diferencias entre el crecimiento de las cepas no son estadísticamente significativas, con excepción de la cepa 18, en la cual se evidencia una etapa de muerte celular previo a la segunda etapa de crecimiento.

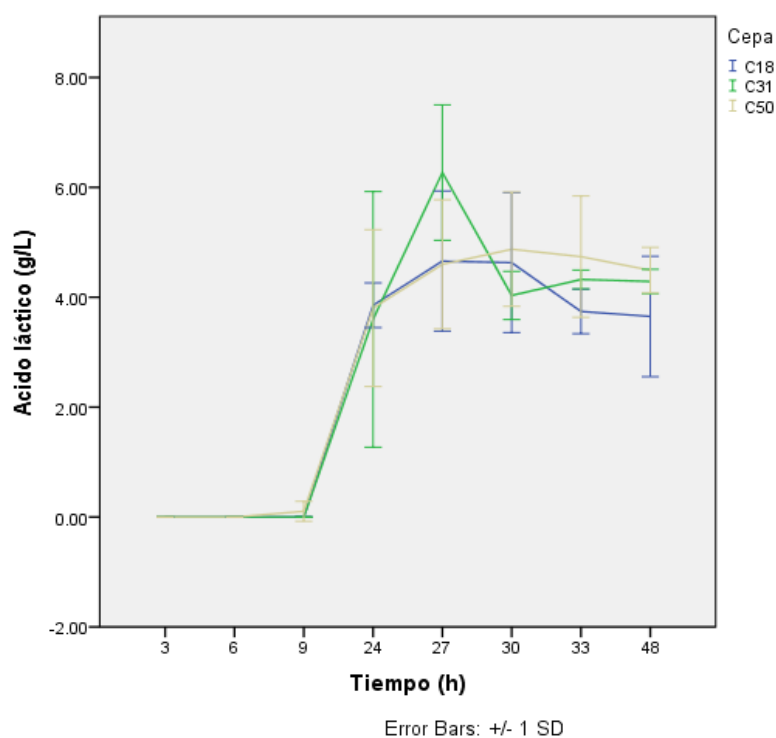


Figura 8 Cinética de producción de ácido láctico cepas BS18, BS31 y BS50 en condiciones aeróbicas, utilizando glucosa como sustrato.

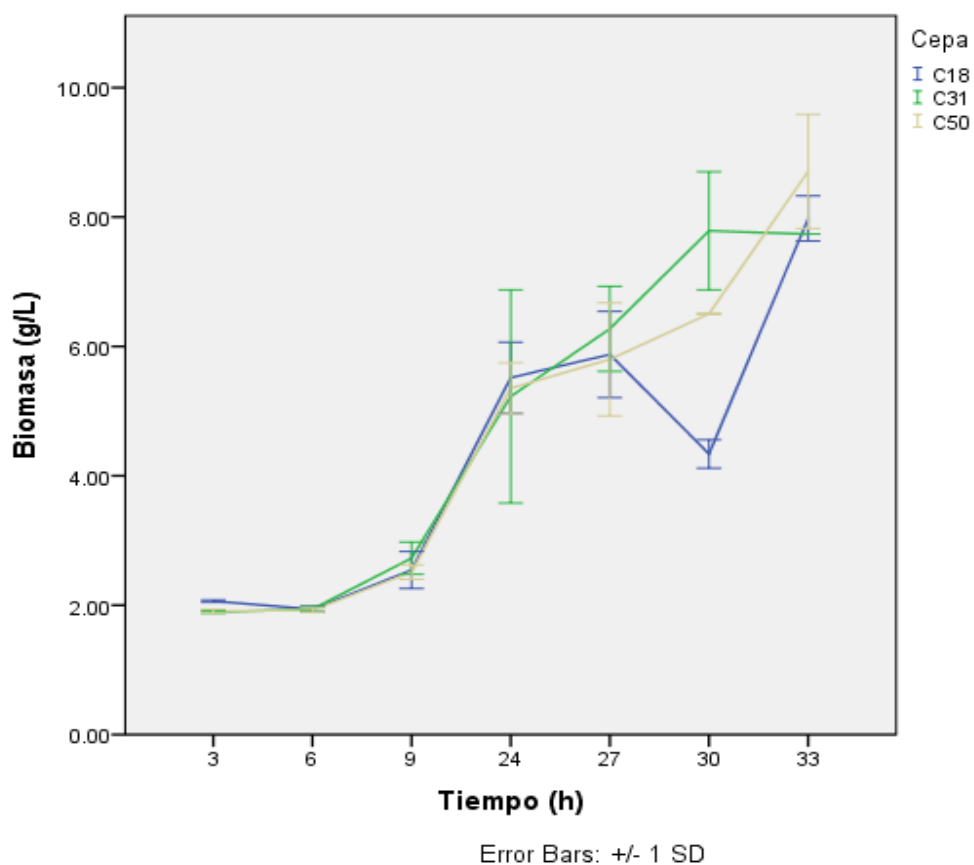


Figura 9 Cinética de producción de biomasa de las cepas BS18, BS31 y BS50 en condiciones aeróbicas.

El pH monitoreado a lo largo del tiempo en las fermentaciones realizadas con las 3 cepas se resume en la figura 11. En este se puede observar que existe una disminución más pronunciada del pH entre las 9 y 24 horas de cultivo. Estos hallazgos son consistentes con la producción de ácido láctico evidenciada en la fermentación. Los cambios en el pH observados fueron de alrededor de 0.8. Todas las cepas presentaron comportamientos similares

en cuanto a cambios en el pH ya que todas las medias considerándose sus desviaciones estándar no presentan entre ellas diferencias estadísticamente significativas.

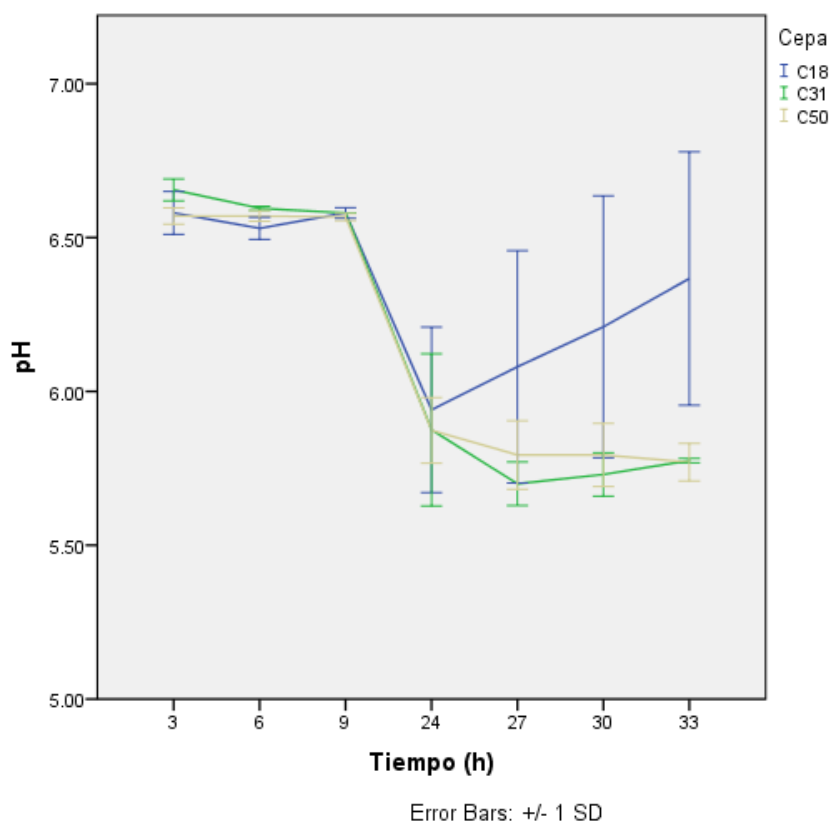


Figura 10 pH según tiempo de fermentación en cepas BS18, BS31 y BS50 en condiciones aeróbicas, utilizando glucosa como sustrato.

La cepa 18 presenta un consumo de glucosa, producción de ácido láctico y biomasa concordantes entre sí, como puede observarse en la figura 12. Los puntos de mayor consumo de glucosa, producción de ácido láctico y biomasa corresponden a las 24 horas comenzada la fermentación. Similar a lo encontrado con la cepa BS50. Se evidencia una segunda etapa de crecimiento posterior a las 30 horas, de fermentación, consistente con un consumo de glucosa a pesar de no presentar producción de ácido láctico posterior a las 24 horas.

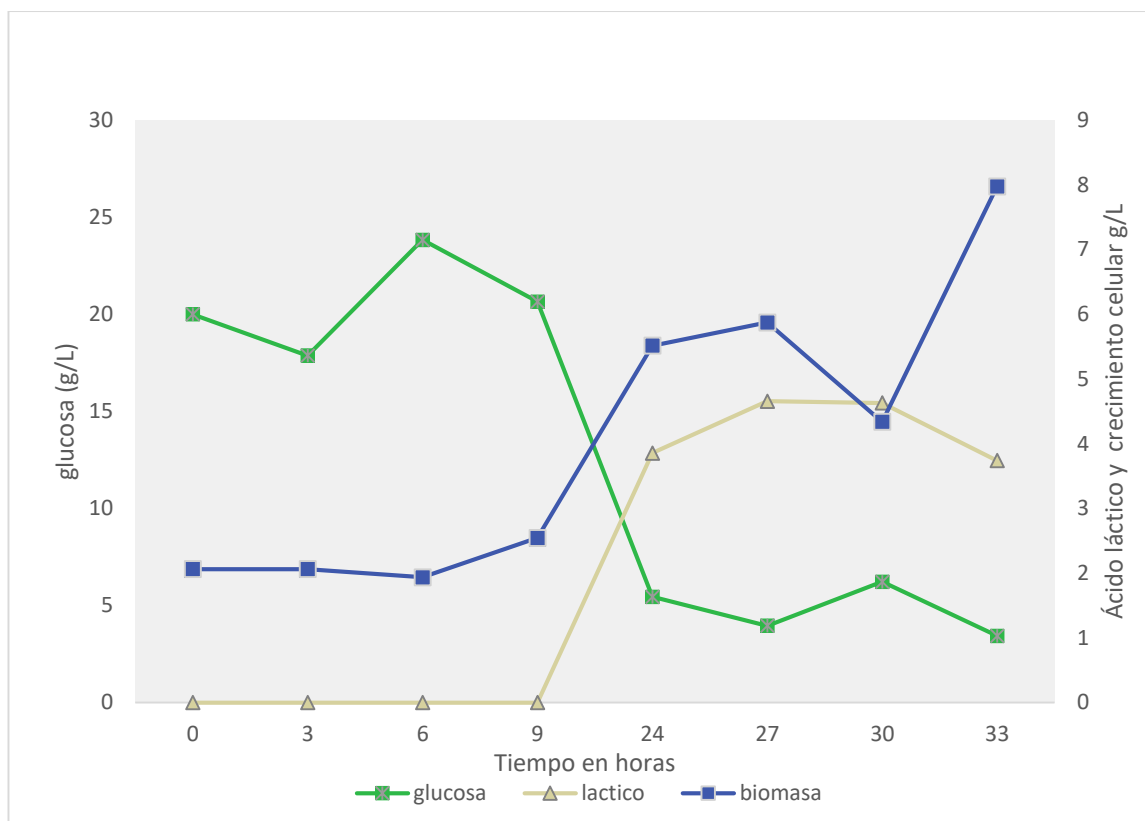


Figura 11 Cinética de consumo de glucosa, producción de biomasa y producción de ácido láctico en g/L de la cepa BS18.

La cepa BS31 muestra consistencia entre el consumo de glucosa, producción de ácido láctico y biomasa. Se observa producción de ácido láctico entre 9 y 24 horas de cultivo, concordante con lo observado en las cepas BS18 y BS50. Posterior a las 24 horas, a pesar de los cambios presentados en biomasa y ácido láctico, no existen cambios en cuanto a la concentración de glucosa presente en el medio.

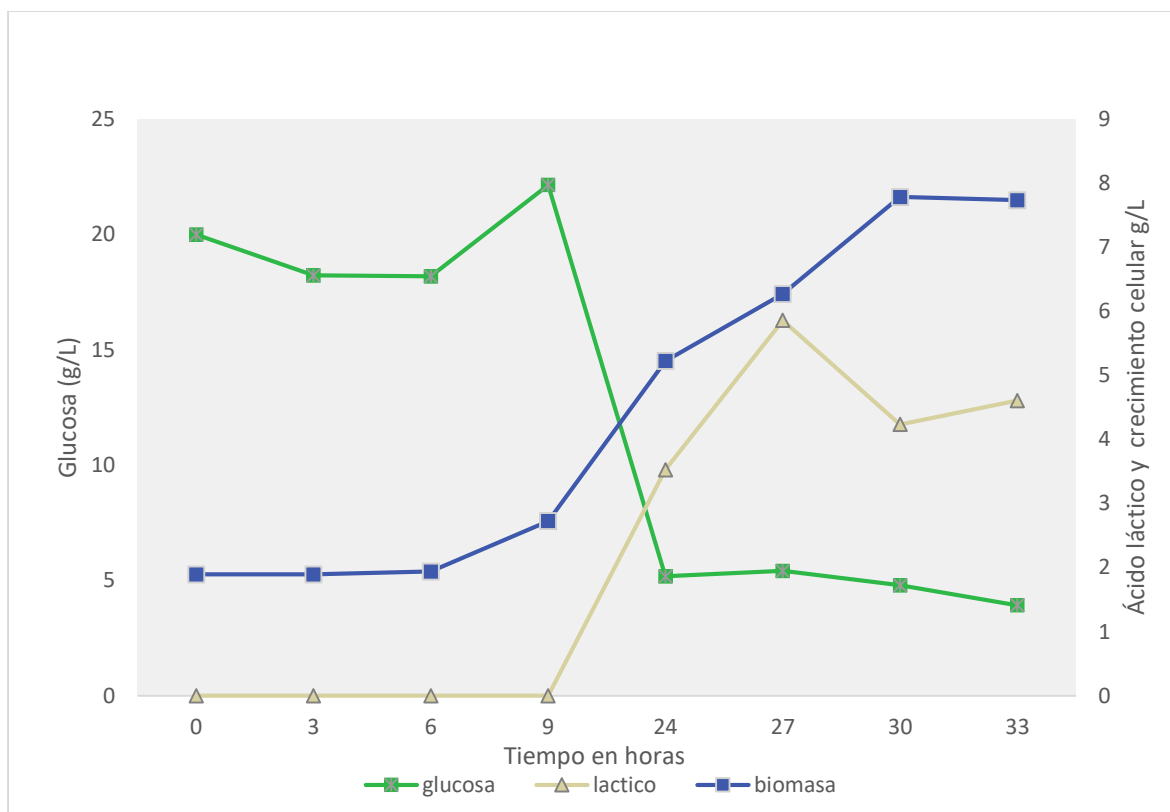


Figura 12 Cinética de consumo de glucosa, producción de biomasa y producción de ácido láctico en g/L de la cepa BS31.

La cepa 50, como puede observarse en la figura 12, presenta un consumo de glucosa, producción de biomasa y ácido láctico concordantes entre sí. La producción máxima de ácido láctico ocurre a las 24 horas de cultivo en conjunto con la mayor producción de biomasa y consumo de glucosa. Posterior a la estabilización de la cepa existe una segunda etapa de crecimiento, consistente con el consumo de glucosa que comienza a las 30 horas sin un aumento de la producción de ácido láctico.

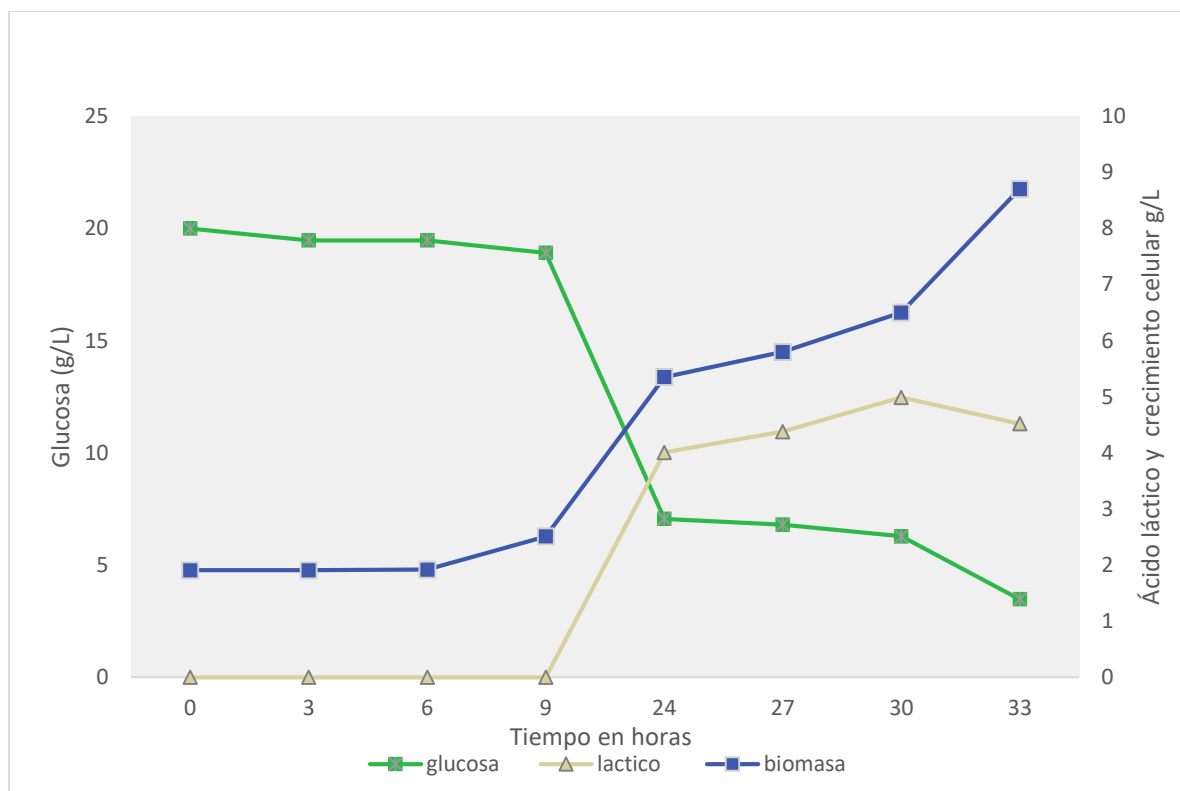


Figura 13 Cinética de consumo de glucosa, producción de biomasa y producción de ácido láctico en g/L de la cepa BS50.

7.5 Producción de ácido láctico a partir de melaza utilizando la cepa BS50.

Después de evaluar las 3 cepas con mayores tasas de producción de ácido láctico y constatando que no existían diferencias estadísticamente significativas en la producción media de glucosa, además de que las cepas mantenían un consumo de glucosa y producción de biomasa similares en cuanto a comportamiento en el tiempo, se tomó arbitrariamente una de las cepas para la evaluación de la producción a partir de melaza. Los resultados de la producción de ácido láctico a partir de melaza tipo C se resumen en la figura 15. La cepa BS50, como puede evidenciarse en la figura 15, presentó un crecimiento exponencial desde las 9 horas hasta aproximadamente las 30 horas de cultivo. Se evidencia una producción poco significativa entre las 3 a 9 horas, lo que antecede a un pico en la producción alrededor de las 24 horas de

cultivo. Consistente con la producción de ácido láctico puede evidenciarse una disminución en los azúcares totales presentes en el medio alrededor de las 6 a 24 horas de cultivo. A pesar del crecimiento y consumo de azúcares presentado posterior a las 24 horas de cultivo, en lugar de observarse un aumento del ácido láctico presente en el medio este aparenta disminuir.

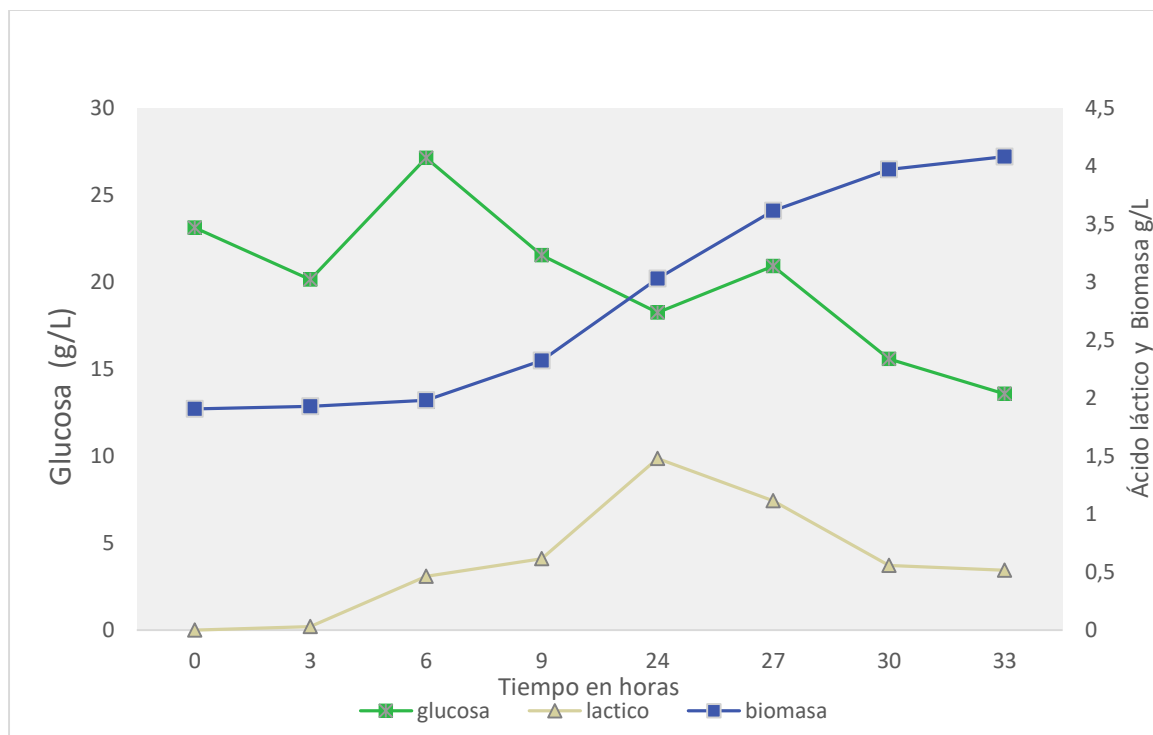


Figura 14 Cinética de consumo de glucosa, producción de ácido láctico y biomasa de la cepa BS50 en melaza.

8. DISCUSIÓN

El secuenciamiento de la sección de ARN ribosomal 16S es ampliamente utilizado como un método rápido y efectivo para estudiar filogenia a la par de taxonomía de diferentes especies bacterianas. A pesar de su efectividad para el análisis de varios grupos bacterianos en el caso de *Bacillus subtilis*, existen 8 especies cercanamente emparentadas que son indistinguibles mediante este tipo de análisis. Las 8 especies que conforman el grupo *Bacillus subtilis* Subtilis, que corresponden a *Bacillus subtilis* subsp. subtilis (Smith et al., 1964 ; Nakamura et al., 1999), *Bacillus licheniformis* (Skerman et al., 1980), *Bacillus amyloliquefaciens* (Priest et al., 1987), *Bacillus atrophaeus* (Nakamura, 1989), *Bacillus mojavenensis* (Roberts et al., 1994), *Bacillus vallismortis* (Roberts et al., 1996), *Bacillus subtilis* subsp. spizizenii (Nakamura et al., 1999) and *Bacillus sonorensis* (Palmisano et al., 2001).

A pesar de que el secuenciamiento 16S no permite distinguir entre miembros de esta especie, sí nos permite dirigir estrategias para la identificación de estos microorganismos. En este estudio se utilizó la técnica API50CH para miembros del género *Bacillus* en identificación de especies, que aparte de otorgar información sobre especies permitió obtener un perfil metabólico de las diferentes cepas analizadas. Las pruebas de metabolismo realizadas sobre las cepas analizadas permiten conocer las posibles fuentes de carbono utilizables en el proceso fermentativo. Las 3 cepas analizadas como mejores productoras de ácido láctico BS18, BS31 y BS50 presentaron fermentación de glucosa, así como fructosa, que son dos de los monosacáridos presentes en la melaza y por ende se esperaría producción de ácido láctico a partir de este medio de cultivo. Además, las cepas BS31 y BS18 presentan fermentación de la sacarosa, que es el azúcar presente en mayor porcentaje en la melaza.

En la fermentación preliminar en medio MT, que sirvió para determinar aquellas cepas con mayores tasas de productividad de ácido láctico, se observó que la producción media, después de 72 correspondió a: BS18 3.64 g/L, BS7 2.43 g/L, BS50 3.59g/L, BS31 3.65g/L, BS34 0.19g/L, BS3 1.73g/L, BS23 1.16g/L. De las medias analizadas la mayor correspondió a la cepa BS31 que presenta el metabolismo más diverso, de todas las cepas con alta producción de ácido láctico analizadas. Puede observarse en la figura 8, en la sección de resultados que existe una discrepancia de la cepa BS31 con el resto de las cepas analizadas. En la cepa BS31 se evidencia que existe tanto crecimiento como producción de ácido láctico a pesar de que la concentración media de glucosa no presenta cambios significativos. Al ser el metabolismo de la cepa BS31 más diverso que el del resto, esta probablemente pudo utilizar como fuente de carbono algunos de los carbohidratos que se pueden encontrar tanto en el extracto de levadura como en la peptona y que pueden ocasionar errores en el análisis de procesos fermentativos (Vera et al, 1950). Esto es consistente con la mayor producción de ácido láctico evidenciada en el screening inicial en medio MT; al tener mayor tiempo de fermentación el consumo de los carbohidratos adicionales asimilables por la cepa BS31 generó una mayor cantidad de ácido láctico en el análisis de 72 horas de cultivo. No pudo evidenciarse diferencias significativas en el análisis de 33 horas de cultivo, probablemente por la adaptación que necesitan las cepas de *Bacillus subtilis* al cambiar de sustrato debido a la inhibición que existe en el metabolismo de otros carbohidratos en presencia de glucosa (Singh et al, 2008).

Respecto al efecto del oxígeno sobre la producción de ácido láctico. El proceso fermentativo comienza con la formación de piruvato a través de la ruta Embber- Meyerhof en la cual la glucosa es convertida en 2 moléculas de piruvato, después de este proceso la enzima lactato deshidrogena transforma el piruvato en ácido láctico generando energía en forma de NADH+. A pesar de que la ausencia de oxígeno debería estimular las rutas metabólicas

asociadas a la respiración anaeróbica a la par de procesos fermentativos, esto no se evidenció en las pruebas realizadas. *Bacillus subtilis* por lo general presenta una capacidad reducida para crecer de manera anaeróbica en medios que no contienen piruvato o aminoácidos añadidos. Resultados similares a los obtenidos en cuanto a una reducción de la producción de ácido láctico en anaerobiosis fueron evidenciados por Ohara & Yahata en el 1996 y Romero et al 2006. La cepa BS18 se mostró robusta frente a cambios en la disponibilidad de oxígeno y si bien la diferencia entre la media de producción entre aerobiosis y micro aerobiosis es estadísticamente significativa, la disminución en la producción media es pequeña volviéndose una opción interesante al disminuir los costos operativos asociados a procesos de aireación.

La producción de ácido láctico media obtenida en las cepas BS18, B531 y BS50 fue de 4.66g, 5.86g y 4.38g en condiciones aeróbicas, respectivamente, de manera consistente con lo evidenciado en otras cepas Wild type de *Bacillus subtilis*.(Ohara & Yahata, 1996; Romero-García et al 2009) La producción máxima de ácido láctico se da previo las 24 horas de cultivo en todas las cepas analizadas. Sin embargo, al ser los intervalos de tiempo analizados amplios, mayor análisis es requerido para establecer el tiempo de fermentación requerido para llegar a equilibrio. Al ser los valores teóricos de producción de ácido láctico correspondientes a 1g de glucosa/1g de ácido láctico, se obtuvieron eficiencias entre 21.9% al 29.33% en las cepas analizadas. El balance de masa correspondiente a estas eficiencias se muestra en la figura 16. Para el balance de masa se tomó un valor teórico de 1000kg de glucosa tanto como de Melaza, se utilizó las eficiencias promedio de producción de ácido láctico, alrededor de 25% a partir de glucosa y alrededor de 6.5% a partir de melaza. Al no ser el consumo el consumo de la fuente de carbono total, se mantiene las proporciones de remantes de glucosa y azúcares totales observadas correspondientes a 20% glucosa y 60% azúcares totales en melaza. Para otorgar una idea de la producción total de ácido láctico obtenido por el proceso propuesto a nivel

industrial mediante *Bacillus subtilis*, se tomó una eficiencia promedio del proceso de purificación necesario para la obtención de ácido láctico. El proceso escogido fue aquel que logra la separación del ácido láctico de otros componentes del medio de cultivo mediante membranas de intercambio iónico, ya que presenta eficiencias medias frente a otros métodos de separación, siendo el valor alrededor del 80%.

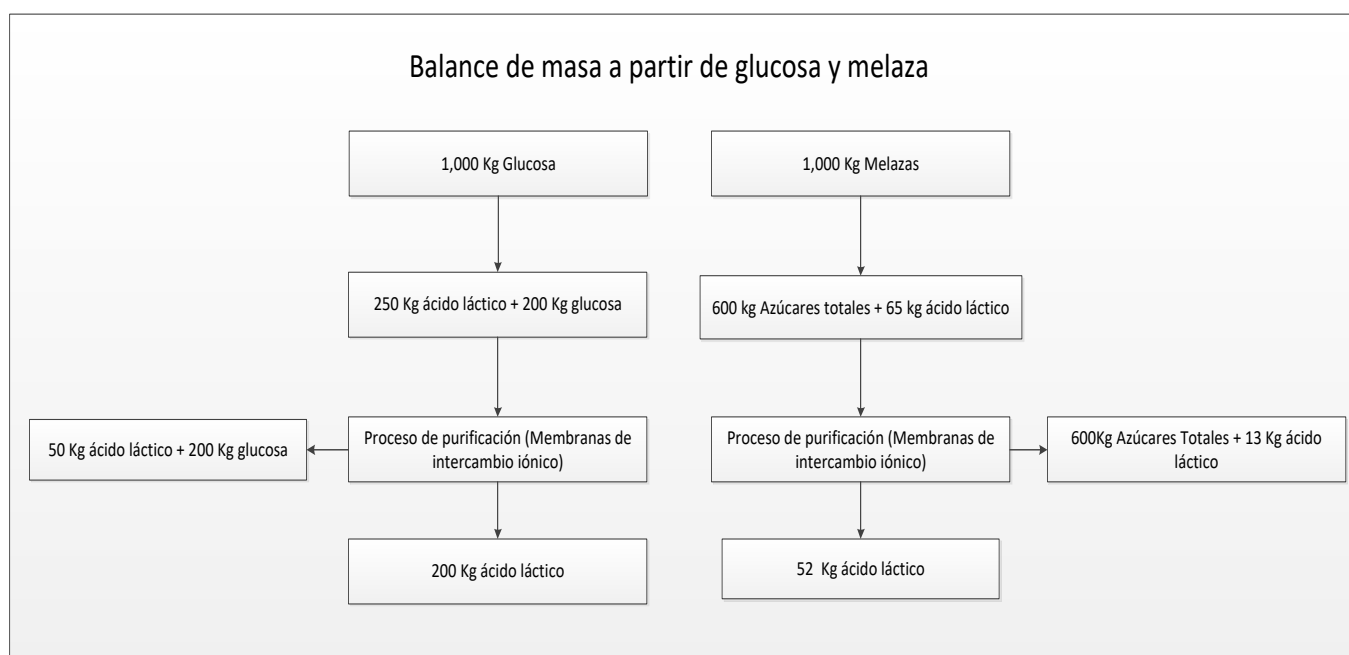


Figura 15 Balance de masa, según eficiencias obtenidas con las cepas de *Bacillus* analizadas a partir de glucosa y melaza como sustrato.

La producción de ácido láctico a partir de melaza mostró un pico alrededor de las 24 horas de fermentación, después de lo cual se evidenció una disminución constante. Considerando que la melaza está compuesta de 3 azúcares principalmente sacarosa, fructosa y glucosa y que *Bacillus subtilis* presenta una clara preferencia por la glucosa, es considerable que la producción de ácido láctico que se observa hasta las primeras 24 horas de cultivo corresponda al consumo de glucosa y su consiguiente transformación hacia ácido láctico. Posterior a las 24 horas de cultivo se mantiene el crecimiento de la cepa, probablemente por un

cambio de fuente de carbono a fructosa, mostrándose tanto disminución de los azúcares totales como estabilidad en la concentración de ácido láctico. A pesar de que la concentración de ácido láctico aparenta disminuir con el tiempo esto es poco consistente con lo observado en otras cepas de *Bacillus subtilis*. La aparente disminución de ácido láctico en el medio puede deberse a la presencia de otros subproductos del metabolismo de *Bacillus subtilis*, durante el metabolismo de la fructosa como fuente de carbono. Al cambiar los subproductos, probablemente el ácido láctico presente en la solución se oxida de manera que no puede detectarse mediante el método espectrofotométrico de cloruro de hierro III al no poder formarse el precipitado de lactato de hierro III (Borshchevskaya et al, 2016).

Tanto la fermentación a partir de glucosa, como a partir de melaza, mantienen concentraciones de ácido láctico, si bien esperables, bajas para considerarse dentro del marco de la aplicación industrial. Especies de *Lactobacillus*, a pesar de tener requisitos metabólicos complejos, mantienen producciones de 10 a 20 veces mayores a las presentadas por las cepas analizadas. Sin embargo, el análisis respecto a la optimización de la producción de ácido láctico añadiendo elementos conocidos por su habilidad de mejorar el proceso fermentativo a través de *Bacillus subtilis* como piruvato y concentraciones óptimas de extracto de levadura, serían importantes para llegar a conclusiones de costo beneficio en la producción de ácido láctico con estas especies. Considerando que en el presente estudio se estandarizaron métodos de cultivo y métodos para la cuantificación de las variables asociadas al proceso fermentativo de las cepas de *Bacillus subtilis*. Además, se identificó ciertas cualidades ventajosas en las cepas analizadas, procesos de mejoramiento genético de las cepas podrían llevarse a cabo para obtener rendimientos cercanos a los presentados por especies de *Lactobacillus* manteniendo los bajos costos en materias primas que supone el trabajo con *Bacillus subtilis*. Altas producciones de

ácido láctico se han obtenido a partir de cepas modificadas como *Bacillus subtilis* MUR1, con el cual se obtuvieron 159g/L de ácido láctico (Gao et al 2012),

9. CONCLUSIONES

Mediante el presente estudio se logró la identificación de 6 cepas *Bacillus subtilis* a través del análisis del perfil bioquímico que permiten las galerías API50CH/B. El análisis molecular mediante secuenciamiento de la región 16S no permitió una identificación efectiva de las cepas analizadas, siendo necesarios otros marcadores para la determinación de especies en *Bacillus subtilis*. De estas cepas la mayor tasa de producción de ácido láctico se consiguió en condiciones aeróbicas, con concentraciones de ácido láctico de aproximadamente 5g/L, iniciando con una concentración de glucosa de 20g/L. Se encontraron tasas de producción de ácido láctico a partir de melaza por la cepa BS50 de alrededor de 1.3g/L a partir de 20g/L de azúcares totales.

Las cepas BS50, BS31 y BS18 no presentan diferencias estadísticamente significativas en la producción y son por tanto igualmente buenos candidatos en estudios adicionales. La producción máxima de ácido láctico, tanto en melaza como medio MT se dio antes de las primeras 24 horas de cultivo a pesar de no determinarse un tiempo exacto. Las metodologías analizadas en el estudio permiten un análisis exacto, preciso y replicable para la cuantificación de ácido láctico y glucosa en procesos fermentativos.

10. RECOMENDACIONES

- Realizar análisis adicionales sobre el efecto de otras fuentes de carbono y compuestos en el rendimiento de la producción de ácido láctico.
- Corroborar la identidad de las cepas mediante el uso de otros marcadores moleculares.
- Validar las metodologías propuestas mediante técnicas más sensibles como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC).
- Analizar la producción de ácido láctico a partir de melaza con las cepas BS18 y BS31.
- Generar un diseño experimental para determinar la concentración de glucosa o melaza óptimos para las fermentaciones.
- Considerar mejoramiento en las cepas que mayor robustez y producción de ácido láctico presentaron.

11. LITERATURA CITADA

- Datta, R., Tsai, S., Bonsignore, P., Moon, S., and Frank, J. R. (1995). "Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives," *FEMS Microbiol. Rev.* 16(2-3), 221-231. DOI: 10.1016/0168-6445(94)00055-4
- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J., Gokhale, D. „Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation". *Applied and Environmental Microbiology* 74(1), 2008.
- Gao, T., Wong, Y., Ng, & Ho, K. (2012) L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. *Bioresource Technology*, 121(), pp. 105-110. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.06.108.
- Gao, C., Ma., C, & Xu., P. (2011). Biotechnological routes base don lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances* 29(), pp. 940-939. DOI:10.1016/j.biotechadv.2011.07.022.
- Borshchevskaya, L., Gordeeva, A., Kalinina, S., Sineokii. (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry. Zhurnal Analiticheskoi Khimii*, 71(8)pp. 755-758.
- Rojan, P., Madhavan, N & Ashok, P. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspective. *Applied Microbiological Biotechnology*, 74(), pp. 524-534. DOI: 10.1007/s00253-006-0779-6.
- Nguyen, C., Kim, J., Hwang, J., Park, M., Choi, G., Choi, Y., Jang, K & Kim, J. (2012) Production of l-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracaseri* LA104 isolated from the traditional Koren food, makgeolli. *Bioresource Technology*, 110 (), pp. 552-550. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.079
- Kadam, S., Patil, S., Bastawde, K., Khire, J & Gokhale, D. (2006) Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCMI 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*, 41(1), pp. 120-126. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.06.007
- Mussatto, S., Fernandes, M., Mancilha, I & Roberto, I. (2009)Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from Brewer's spent grain.*Biochemical Engineering Journal.* 40(), pp. 437-444. DOI:10.1016/j.bej.2008.01.013.
- Jong, E., Higson, A., Walsh, P., and Wellisch, M. (2012). *Bio-based Chemicals Value Added Products from Biorefineries*, IEA Bioenergy Task 42 Biorefinery, Amsterdam, Netherlands.
- Hofvendahl, K., Hahn- Ha"gerdal (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and microbial Technology*, 1(26) pp. 87-107.

- Ramos, H., Hoffman, T., Marino, M., Nedjari., Presecan-siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., & Jahn, D. (2000) Fermentative Metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and Regulation of Gene Expression. *Journal of Bacteriology* 182(11) pp. 3072-3080. DOI: 10.1128/JB.182.11.3072-3080.2000
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Romero-Garcia, S., Hernandez-Bustos, C., Merino, E., Gosset, G, Martinez. A., (2009). Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell factories* 8 (23), DOI: [10.1186/1475-2859-8-23](https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-23).
- Nolasco-Hipolito C, Matsunaka T, Kobayashi G, Sonomoto K, Ishizaki A (2002) Synchronised fresh cell bioreactor system for continuous L(+) lactic acid production using *Lactococcus lactis* IO-1 in hydrolysed sago starch. *J Biosci Bioeng* 93:281–287
- Perez, R (1995) Molasses. Appendix. Extract from the FAO Tropical Feeds and Feeding Systems Disponible en línea en: www.fao.org/livestock/agap/frg/ECONF95/PDF/MOLASSES.PDF
- Castañeada-Ayarza, J. A., & Barbosa, L, A. (2017). “Final and B molasses for fuel ethanol production and some market implications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Adv. (70), 1059-1065. DOI.org/10.1016/j.rser.2016.12.010
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., and Sonomoto, K. (2013). “Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes,” *Biotechnol. Adv.* 31(61), 877-902. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.002
- Ohara, H., & Yahata, M. (1996). L-Lactic acid production by *Bacillus* sp. in anaerobic and aerobic culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81(3), 272–274. doi:10.1016/0922-338x(96)82222-
- Komesu, A., Oliveira, J. A. R. d., Martins, L. H. d. S., Wolf Maciel, M. R., and Maciel Filho, R. (2017). "Lactic acid production to purification: A review," *BioRes.* 12(2). 4364-4383.
- Vega, H. (2016). Ecuador Sugar Production Set Record in 2016 but Consumption Decreased in Response to Policy Changes. USDQ Foreign Agricultural Service. Global Agricultural Information Network.
- Marino, M., Ramos, C., Hoffman, T., Glaser, P., Jahn, D. (2001). “Modulation of anaerobic Energy Metabolism of *Bacillus subtilis* by arfM (ywiD)”. *American society for microbiology. Journal of Bacteriology*, 183(23), pp.6815-6821. doi.org/10.1128%2FJB.183.23.6815-6821.2001.
- Teyadi, S., Cheryan, M, (1995) Lactic acid from cheese whey permeate. “Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(2), pp.242-248. doi.org/10.1007/BF00172819.
- Jin, B., Huang, L. P., and Lant, P. (2003). “*Rhizopus arrhizus* – A producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L(+)-lactic acid,” *Biotech. Lett.* 25(23), 1983-1987. DOI: 10.1023/B:BILE.0000004389.53388.d0

- MAGAP. (2015) Boletín situacional caña de azúcar. Ministerio de agricultura y ganadería.
- Singh, Kalpana., Schmalisch, M., Stulke, J., Gorke, B. (2008). Carbon Catabolite Repression in *Bacillus subtilis*: Quantitative Analysis of Repression Exerted by different Carbon Sources. American society for microbiology. Journal of bacteriology
DOI: 10.1128/JB.00848-08
- Smith, N. R., Gibson, T., Gordon, R. E. & Sneath, P. H. A. (1964). Type cultures and proposed neotype cultures of some species in the genus *Bacillus*. J Gen Microbiol 34, 269–272.
- Nakamura, L. K. (1989). Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 39, 295–300.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V. & Sneath, P. H. A. (editors) (1980). Approved lists of bacterial names. Int J Syst Bacteriol 30, 225–420.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A. & Berkeley, R. C. W. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. Int J Syst Bacteriol 37, 69–71.
- Nakamura, L. K., Roberts, M. S. & Cohan, F. M. (1999). Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol 49, 1211–121
- Roberts, M. S., Nakamura, L. K. & Cohan, F. M. (1994). *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. Int J Syst Bacteriol 44, 256–264.
- Roberts, M. S., Nakamura, L. K. & Cohan, F. M. (1996). *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. Int J Syst Bacteriol 46, 470–475
- Palmisano, M. M., Nakamura, L. K., Duncan, K. E., Istock, C. A. & Cohan, F. M. (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. Int J Syst Evol Microbiol 51, 1671–1679

8 ANEXOS

Tabla 1 Composición de la melaza tipo C

Parámetro	Porcentaje w/w	% acumulado w/w
Agua	20%	
Constituyentes orgánicos		62%
Sacarosa	32%	
Glucosa	14%	
Fructosa	16%	
Nitrogeno ácidos libres y anclados. Sustancias gomosas solubles.	10%	
Constituyentes inorgánicos		8%
SiO ₂	0.5%	
K ₂ O	3.5%	
CaO	1.5%	
MgO	0.1%	
P ₂ O ₅	0.2%	
Na ₂ O	0.2%	
Fe ₂ O ₃	1.6%	
Al ₂ O ₃	0.4%	
Residuos de carbonatos	-	
Residuos de sulfato	1.6%	
Cloruros	0.4%	

Tabla 2: Secuenciamiento 16S de las 7 cepas de *Bacillus subtilis* analizadas.

	Secuencia (16S)
BSC3	TAAAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTG ATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGG TTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGT CACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG AGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTT TTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGG AGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC TGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCG TACACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTTCGCCGTTGAACCCGGGGGCTTTCACATCAAACCTTAA
BS7	CCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGCTCGCGGTTTCGCTGCC CTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT CACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC AACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT TCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAAT GCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCC CACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACG
BS18	TACCTACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCG ATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTG CCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCA GTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG ACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG CTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTA ATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTC CCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTG GAATTCACCTCTCCTCTTCTGC
BS23	TAAAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTG ATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGG TTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGT CACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG AGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTT TTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGG AGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC TGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAG

Secuencia (16S)

BS31 TAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCT
 GATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCG
 GTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTT
 GTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
 ACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAG
 GTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTAACCTCCCA
 GCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATC
 TAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATT
 TCACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAG
 ACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGGACAACGCTT

BS34 TAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCT
 GATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCG
 GTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTT
 GTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
 ACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAG
 GTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTAACCTCCCA
 GCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCG

BS50 TTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGC
 GATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTTGC
 TGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTTGTCACCG
 GCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCT
 GACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCG
 CGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTAACCTCCCAAGGCGGAGT
 GCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT
 TCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTA
 CACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTA

ANOVA y prueba de Tuckey análisis preliminar medio MT.

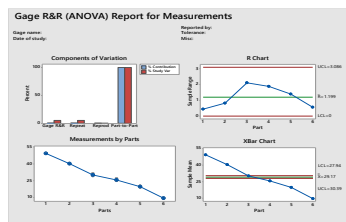


Figura 1 Gage R&R ácido láctico

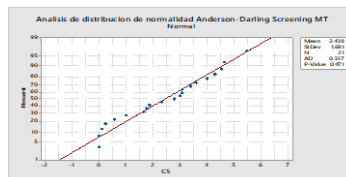


Figura 2 Análisis de normalidad datos de análisis preliminar en medio MT

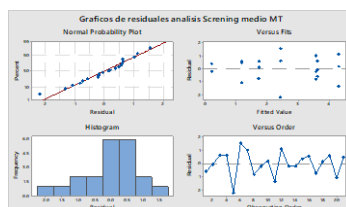


Figura 3 Residuales del análisis preliminar en medio MT.

Factor Information

Factor Levels Values

C4 7 C18, C23, C3, C31, C34, C5, C7

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C4	6	40.42	6.737	5.87	0.003
Error	14	16.07	1.148		
Total	20	56.49			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.07125	71.56%	59.37%	36.01%

Means

C4	N	Mean	StDev	95% CI
C18	3	3.640	0.607	(2.313, 4.967)
C23	3	1.167	0.934	(-0.160, 2.493)
C3	3	1.730	0.661	(0.403, 3.057)
C31	3	4.323	1.237	(2.997, 5.650)
C34	3	0.193	0.335	(-1.133, 1.520)
C5	3	3.587	0.937	(2.260, 4.913)
C7	3	2.43	1.96	(1.10, 3.75)

Pooled StDev = 1.07125

Tukey Pairwise Comparisons

C4	N	Mean	Grouping
C31	3	4.323	A
C18	3	3.640	A B

C5 3 3.587 A B
 C7 3 2.43 A B C
 C3 3 1.730 A B C
 C23 3 1.167 B C
 C34 3 0.193 C

Fermentaciones en aerobiosis, anaerobiosis y microaerobiosis en medio MT

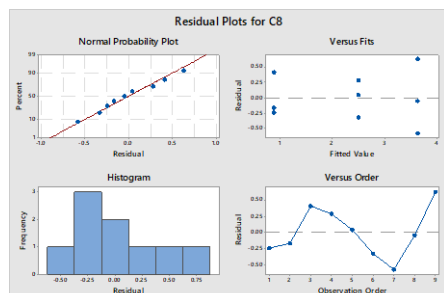


Figura 5 Residuales de Fermentaciones en aerobiosis, anaerobiosis y micro aerobiosis en medio MT

ANOVA y prueba de Tuckey fermentaciones en aerobiosis, anaerobiosis y microaerobiosis en medio MT

Factor Information

Factor Levels Values

C7 3 C18 Ae, C18 An, C18 Mi

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C7	2	11.577	5.7887	29.33	0.001
Error	6	1.184	0.1974		
Total	8	12.761			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.444247	90.72%	87.63%	79.12%

Means

C7	N	Mean	StDev	95% CI
C18 Ae	3	3.640	0.607	(3.012, 4.268)
C18 An	3	0.877	0.360	(0.249, 1.504)
C18 Mi	3	2.507	0.307	(1.879, 3.134)

C7	N	Mean	Grouping
C18 Ae	3	3.640	A
C18 Mi	3	2.507	B
C18 An	3	0.877	C

ANOVA y prueba de Tuckey Cinética de producción de biomasa ácido láctico y consumo de glucosa.

Factor Information

Factor Levels Values

C10 3 C50 Ae, C50 An, C50 Mi

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C10	2	21.063	10.5317	34.04	0.001
Error	6	1.856	0.3094		
Total	8	22.920			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.556227	91.90%	89.20%	81.78%

Means

C10	N	Mean	StDev	95% CI
C50 Ae	3	3.587	0.937	(2.801, 4.372)
C50 An	3	0.000000	0.000000	(-0.785796, 0.785796)
C50 Mi	3	0.853	0.223	(0.068, 1.639)

Pooled StDev = 0.556227

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C10	N	Mean	Grouping
C50 Ae	3	3.587	A
C50 Mi	3	0.853	B
C50 An	3	0.000000	B

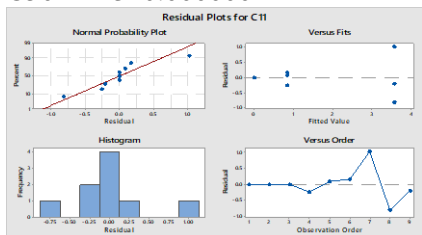
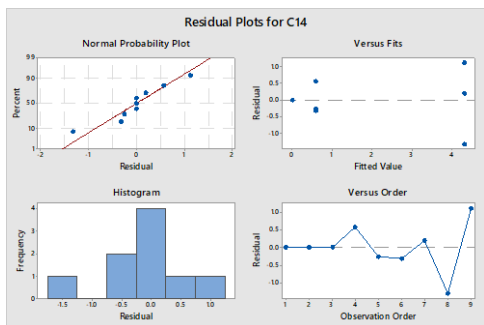


Figura 6 Residuales

Cinética de producción de biomasa ácido láctico y consumo de glucosa. C31



Factor Information

Factor Levels Values
 C13 3 C31 Ae, C31 An, C31 Mi

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C13	2	32.956	16.4781	27.77	0.001
Error	6	3.561	0.5934		
Total	8	36.517			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.770339	90.25%	87.00%	78.06%

Means

C13	N	Mean	StDev	95% CI
C31 Ae	3	4.323	1.237	(3.235, 5.412)
C31 An	3	0.000000	0.000000	(-1.088277, 1.088277)
C31 Mi	3	0.593	0.501	(-0.495, 1.682)

Pooled StDev = 0.770339

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C13	N	Mean	Grouping
C31 Ae	3	4.323	A
C31 Mi	3	0.593	B
C31 An	3	0.000000	B

**Cineticas en aerobiosis cepas 50,31,18.
Tiempo 3**

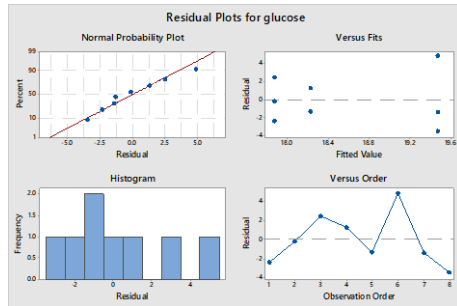
Glucosa

C16 N Mean Grouping

BS50 3 19.48 A

BS31 2 18.23 A

BS18 3 17.88 A



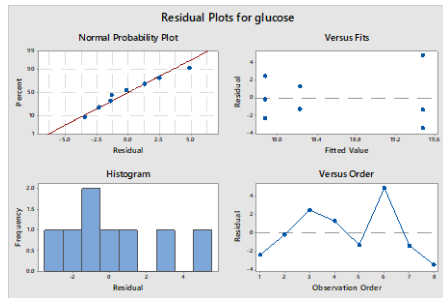
**Ácido láctico
Biomasa**

C16 N Mean Grouping

BS18 3 2.0629 A

BS50 3 1.9078 B

BS31 2 1.8932 B



**Tiempo 6
Glucosa**

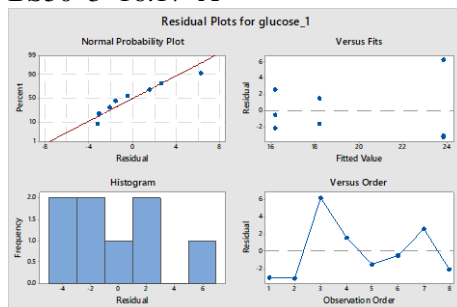
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C16 N Mean Grouping

BS18 3 23.84 A

BS31 2 18.19 A

BS50 3 16.17 A



**Ácido láctico
Biomasa**

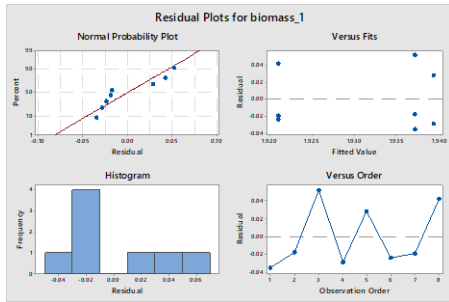
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C16 N Mean Grouping

BS31 2 1.9393 A

BS18 3 1.9371 A

BS50 3 1.9210 A



**Tiempo 9
Glucosa**

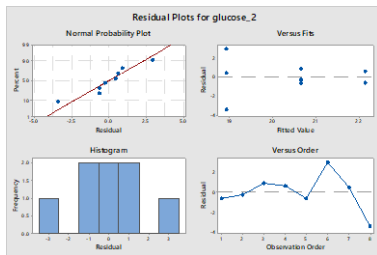
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C16 N Mean Grouping

BS31 2 22.151 A

BS18 3 20.655 A

BS50 3 18.92 A



Biomasa

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

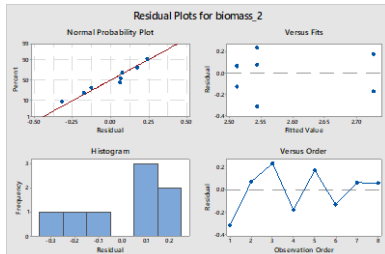
C16 N Mean Grouping

BS31 2 2.727 A

BS18 3 2.544 A

BS50 3 2.5119 A

Means that do not share a letter are significantly different.



**Tiempo 24
Glucosa**

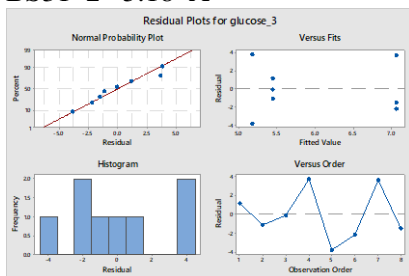
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C16 N Mean Grouping

BS50 3 7.06 A

BS18 3 5.444 A

BS31 2 5.18 A



Ácido láctico

Tukey Pairwise Comparisons

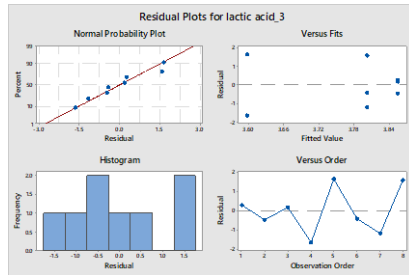
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C16 N Mean Grouping

BS18 3 3.855 A

BS50 3 3.802 A

BS31 2 3.60 A



Biomasa

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

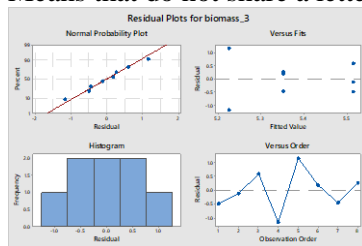
C16 N Mean Grouping

BS18 3 5.516 A

BS50 3 5.352 A

BS31 2 5.23 A

Means that do not share a letter are significantly different



Tiempo 27

Glucosa

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

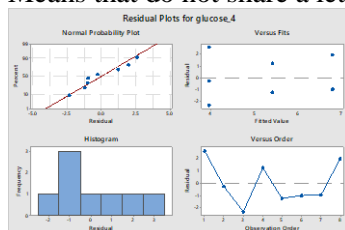
C16 N Mean Grouping

BS50 3 6.803 A

BS31 2 5.42 A

BS18 3 3.96 A

Means that do not share a letter are significantly different.



Ácido láctico

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C16 N Mean Grouping

BS31 2 6.270 A

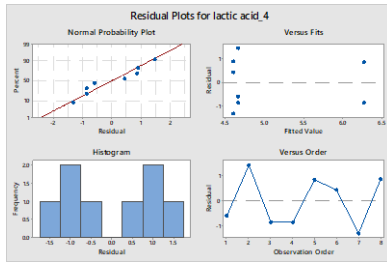
BS18 3 4.658 A

BS50 3 4.599 A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Residual Plots for lactic acid_4



Biomasa

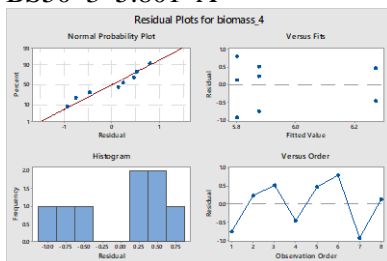
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C16 N Mean Grouping

BS31 2 6.272 A

BS18 3 5.876 A

BS50 3 5.801 A



Tiempo 30

Glucosa

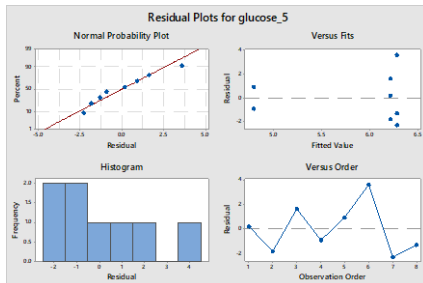
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C16 N Mean Grouping

BS50 3 6.28 A

BS18 3 6.22 A

BS31 2 4.789 A



Ácido láctico

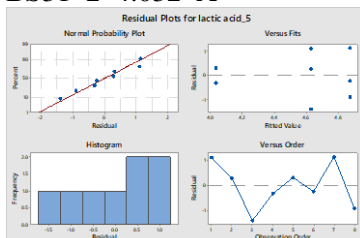
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C16 N Mean Grouping

BS50 3 4.874 A

BS18 3 4.630 A

BS31 2 4.032 A



Biomasa

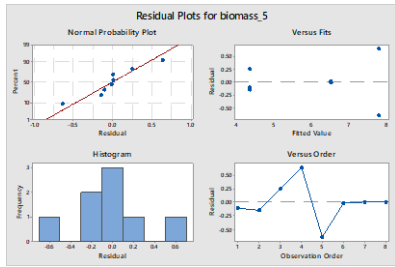
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C16 N Mean Grouping

BS31 2 7.787 A

BS50 3 6.50317 B

BS18 3 4.338 C



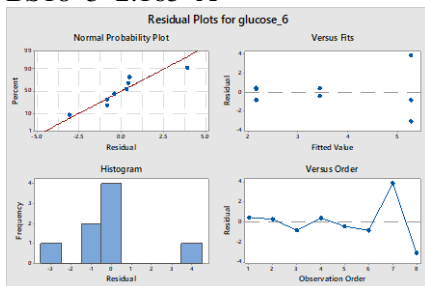
**Tiempo 33
Glucosa**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence
C16 N Mean Grouping

BS50 3 5.27 A

BS31 2 3.441 A

BS18 3 2.165 A



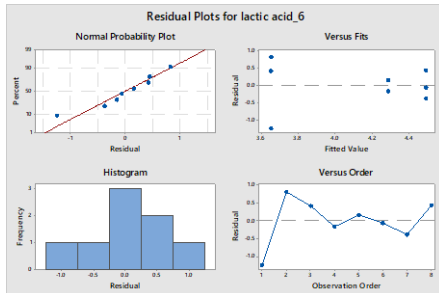
Ácido láctico

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence
C16 N Mean Grouping

BS50 3 4.491 A

BS31 2 4.287 A

BS18 3 3.651 A



Biomasa

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence
C16 N Mean Grouping

BS50 3 8.705 A

BS18 3 7.978 A

BS31 2 7.737 A

