

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Desarrollo tecnológico y generación de riqueza sustentable

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

**PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA
SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL ENERGÉTICA Y ALIMENTARIA**



ITESO

Universidad Jesuita
de Guadalajara

**4D08A DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD
AMBIENTAL ENERGÉTICA Y ALIMENTARIA**

**ANÁLISIS, SIMULACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE MODELOS DE
CRECIMIENTO MICROBIANO PARA LA OBTENCIÓN DE *LACTOBACILLUS
PLANTARUM*, *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* Y *SACCHAROMYCES
BOULARDII* EN UN BIORREACTOR MULTICULTIVO TIPO LOTE
ALIMENTADO**

PRESENTAN

IQ697103 Ana Elisa Carranza Volquarts

IQ697347 Ana Martínez Negrete Vera

IQ698663 Patricia del Carmen Vergara Rodríguez

Profesor PAP: Felipe Sánchez Carrillo

**Asesores PAP: Franklin Jesús Estrada Girón, Carlos González Figueredo,
José Carlos Peña Partida, Oscar Ariel Rojas Rejón**

Tlaquepaque, Jalisco, 30 noviembre 2018

ÍNDICE

REPORTE PAP	4
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	4
Resumen	4
1.1. Objetivos.....	5
1.1.1 Objetivo General del Proyecto:.....	5
1.1.2 Objetivos Individuales:	5
1.2. Justificación	5
1.3. Antecedentes	7
1.3. Contexto.....	8
2. Desarrollo	9
2.1. Sustento teórico y metodológico	9
2.2. Planeación y seguimiento del proyecto.....	18
2.2.1 Diagrama de Gantt	20
2.2.2 Corridas experimentales en reactores tipo lote para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i>	21
2.2.3 Corrida experimental en reactor tipo lote alimentado para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i>	24
3. Resultados del trabajo profesional	29
3.1. Obtención de parámetros cinéticos de crecimiento de los microorganismos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i> en los reactores tipo lote con medio de cultivo optimizado	29
3.1.1 Resultados obtenidos para conteo de carbohidratos: glucosa, sacarosa y lactato con el YSI 2900 para las muestras de los tres reactores tipo lote de crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i>	29
3.1.2 Curvas de relación de concentración de biomasa en unidades de UFC/mL a g/L	35
3.1.3 Resultados de concentración de biomasa para las muestras de los tres reactores tipo lote de crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i>	37
3.2. Comparación de modelos cinéticos de crecimiento de microorganismos...	40

3.3 Resultados de la corrida experimental del biorreactor multicultivo de tipo lote alimentado para la producción de los microorganismos LR, LP y SB a partir de un reactor continuo con LR y LP y con medio cultivo optimizado	44
3.3.1 Curvas de calibración del flujo entregado en función de la potencia de las bombas 1, 2 y 3 usadas en la corrida experimental	44
3.3.2 Curva de estándar de sacarosa por el micrométodo de ácido sulfúrico y UV	46
4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto	63
5. Conclusiones	70
6. Bibliografía	73
Anexos	77
A.1 Desarrollo experimental	77
A.1.1 Producción en un reactor tipo lote de los microorganismos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i> en medio optimizado a base de melazas de betabel	77
A.1.2 Conteo de biomasa producida en el reactor tipo lote para los microorganismos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i> durante la corrida experimental	84
A.1.3 Conteo de carbohidratos presentes en el reactor tipo lote durante la corrida experimental	89
A.1.4 Obtención de curva de relación entre las unidades formadoras de colonias (UFC) y la concentración de biomasa en unidades de g/L	90
A.2 Memoria de datos experimentales- RL	95
A.2.1 Datos del reactor de lote- LR	95
A.2.1.1 Medición de carbohidratos	95
A.2.1.2 Curva de calibración UFC- g/L para biomasa	97
A.2.1.3 Datos de biomasa	99
A.2.2 Datos del reactor de lote- SB	103
A.2.2.1 Medición de carbohidratos	103
A.2.2.2 Curva de calibración UFC- g/L para biomasa	105
A.2.2.3 Datos de biomasa	107
A.3 Memoria de correlaciones calculadas para la caracterización del crecimiento de los microorganismos LR y SB con el <i>Software MATLAB®</i>	111
A.3.1 Datos del reactor de lote- LR	111

A.3.1.1 Modelo de Han and Levenspiel	111
A.3.1.2 Modelo de Monod	112
A.3.1.3 Modelo de Aiba	113
A.3.2 Datos del reactor de lote- SB	115
A.3.2.1 Modelo de Han and Levenspiel	115
A.3.2.2 Modelo de Aiba	115
A.4 Memoria de datos experimentales- RC y RLA	117
A.2.1 Datos de la curva estándar de sacarosa con el micrométodo de ácido sulfúrico- UV	117
A.2.2 Datos del reactor continuo- RC: LR y LP	117
A.2.2.1 Medición de carbohidratos	117
A.2.2.2 Medición de biomasa	119
A.2.2 Datos del reactor continuo- RLA: SB, LR y LP	120
A.2.2.1 Medición de carbohidratos	120
A.2.2.2 Medición de biomasa	122

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.

A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

A través del proyecto se caracterizó la cinética de crecimiento de los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* (similar a Lr) y *Saccharomyces boulardii* en reactores tipo lote, con un medio de cultivo previamente optimizado a base de melazas de betabel, sacarosa y extracto de té verde (*Camellia sinensis*) como fuente de carbono y nitrógeno, para el aumento de la producción de biomasa, esto con el apoyo del Software MATLAB® para el tratamiento de datos. Para LR el mejor ajuste se calculó con el modelo de Monod, tomando en cuenta un término de hidrólisis de sacarosa que realiza el LR, en el balance de masa en el modelo del reactor, con μ_{max} de 0.28831/h, k_{sglu} 0.0658g/L, Y_{xsglu} 0.3445 y k_h 0.0238; para Lr se prefirió usar valores de trabajos previos, debido a que no se lograron ajustar datos experimentales. Posteriormente, se implementaron estos resultados para el diseño y operación de un biorreactor multicultivo tipo lote alimentado con los tres microorganismos; encontrando el fenómeno de mutualismo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo General del Proyecto:

Diseñar un sistema de producción de microorganismos *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* en un biorreactor multicultivo de tipo lote alimentado con medio de cultivo previamente optimizado (MBT) (Peña, 2018) a base de melazas de betabel, sacarosa, extracto de levadura y extracto de té verde (*Camellia sinensis*) como fuente de nitrógeno y carbono para lograr más producción de biomasa; bajo condiciones controladas.

1.1.2 Objetivos Individuales:

- Caracterizar la cinética de crecimiento de los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* (pudiéndose considerar igual a la de LR) y *Saccharomyces boulardii* en medio MBT en un proceso por lote; esto comparando diversos modelos cinéticos que describan el crecimiento de los microorganismos haciendo uso del Software *MATLAB*® para la obtención del mejor ajuste.
- Diseñar un proceso de producción de los microorganismos *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* en un biorreactor multicultivo de tipo lote alimentado, esto de un reactor con operación continua con los microorganismos LR y LP; todo con medio MBT como fuente de carbono y nitrógeno; haciendo uso de los parámetros cinéticos previamente calculados y la herramienta *MATLAB*®.

1.2. Justificación

Se busca diseñar un sistema de producción de los microorganismos *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* en un medio de cultivo económicamente viable que permita ser distribuido en los sectores más marginados y, por ende, con más complicaciones por sobrepeso y obesidad en el país. Según el estudio publicado por la Universidad Nacional

Autónoma de México en conjunto con la Universidad Autónoma Metropolitana titulado “Carga económica de la obesidad y sus comorbilidades en pacientes adultos en México” el gobierno del país destina 120 mil MDP anuales a programas de salud y comunicación relacionados con obesidad y sobrepeso lo cual hace que la obesidad se convierta en un problema de salud pública más que una cuestión estética o simplemente de cuestión social (Molina et. Al 2015). Aunado a esto se observa que el sector que cuida menos su ingesta nutricional es precisamente el sector más desprotegido de la sociedad, el cual se ve muchas veces obligado a consumir alimentos con bajo contenido vitamínico y alto contenido en azúcares o grasas lo que lleva a convertirse en un problema mayor ya que, cuando se desarrollan enfermedades a causa de la obesidad y sobre peso como diabetes o hipertensión entre otras, estos sectores no tienen las mismas capacidades económicas para llevar tratamientos adecuados en un servicio médico probado lo que se refleja en más gastos en los servicios de salud pública, además claro de la desinformación, la falta de cuidados diarios y de atención a estas enfermedades que las lleva a progresar de manera más rápida.

Por ello para este proyecto se busca desarrollar un sistema de cultivo que permita obtener la mayor producción de biomasa de los 3 microorganismos de tal forma que sea económicamente viable el generar una producción comercial que se pueda distribuir en los sectores más desprotegidos de la sociedad.

Los *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* son microorganismos (prebióticos y probióticos) que se ha observado mantienen una estrecha relación con una mejora en los índices metabólicos en pacientes con sobrepeso y obesidad ya que apoyan en la degradación de azúcares y grasas, además de algunas proteínas entre otros, que permiten una mejor digestión ayudando también a mejorar la asimilación de nutrientes y disminuyendo la cantidad de azúcares en la sangre que es el principal problema relacionado con enfermedades consecuencia de obesidad y sobrepeso. Por ello se buscó obtener una cinética de los microorganismos que permitiera simular las mejores condiciones

de operación para que de los reactores se obtenga la mayor cantidad de biomasa permitiendo así bajar los costos de producción.

1.3 Antecedentes

Los probióticos plantean ser una solución para diversas problemáticas que enfrenta México, entre ellas, un índice alto de obesidad (Mekkes, Weenen, Brummer, & Claassen, 2014); es por esto que su producción y venta se ha vuelto de gran interés para la industria.

Este proyecto empezó con la determinación de modelos cinéticos que describieran el crecimiento de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* en medio comercial (MRS) y en medio (MBT), este último es un medio sustituto al medio comercial que fue diseñado a base melaza de betabel, extracto de té verde (*Camellia sinensis*), sacarosa y extracto de levadura; lo que llevó a la publicación del primer artículo con título “Análisis de modelos de regresión no lineales para la obtención de parámetros cinéticos en cultivos de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus*”. El segundo artículo titulado “Simulación de un cultivo por lote alimentado para el mantenimiento de cultivos de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus*” se escribió con la intención de optimizar la producción de estos microorganismos a partir de la obtención de flujos de alimentación ideales con herramientas de simulación como *MATLAB*®. El escrito más reciente de este proyecto buscó encontrar los modelos cinéticos que mejor se ajustaban al crecimiento microbiano de los probióticos *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* en medio comercial MRS, logrando el mejor ajuste con los modelos Ghose-Tyagi y Aiba-Schoda (Mora, Peña Partida, Figueredo, & Rejón, 2018).

El presente proyecto nace de estos antecedentes, y propone optimizar la producción de los microorganismos ya mencionados usando una alternativa económica para el medio, y operando con un sistema co-cultivo por lote alimentado, donde puedan crecer contiguos los *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii*.

1.3. Contexto

Los probióticos son microorganismos que, al ser consumidos, tienen un efecto positivo en la prevención y tratamiento de condiciones patológicas específicas. Se ha encontrado que muchos mecanismos por los cuales los probióticos mejoran la salud intestinal, incluyendo la estimulación de la inmunidad (Sanders, 2000) y que juegan un rol importante al prevenir casos de diabetes tipo 1 (Calcinaro et al., 2005). Además, estudios demuestran que el consumo de probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* pueden reducir adiposidad, peso y el aumento de peso en pacientes con obesidad (Mekkes et al., 2014).

Estos microorganismos se han vuelto de gran interés porque prometen, y tienen el potencial de ser la solución a problemas que enfrentan los países como son los índices altos de obesidad, de diabetes y otras enfermedades que reducen drásticamente la calidad y esperanza de vida de la población.

Según el INEGI, en el año 2012 se registró que el 32.4% de la población mexicana mayor a 20 años padecía de obesidad (INEGI, 2012) el 8.6% de la población adulta masculina y el 9.67% de la población femenina padecían diabetes. Cabe mencionar que estas enfermedades van de la mano, ya que el 90% de los casos de diabetes mellitus se relacionan con sobrepeso y obesidad.

2. Desarrollo

2.1. Sustento teórico y metodológico

La cinética de los microorganismos se considera que es exponencial, y se define según la Ecuación 2.1.

Ecuación 2.1 Ecuación que define el crecimiento exponencial (Nauman, 2008)

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Donde el t representa al tiempo, μ es la velocidad de crecimiento específico del cultivo y X es la concentración de biomasa.

El crecimiento exponencial no ocurre durante toda la vida del cultivo, el desarrollo de los cultivos está dividido en etapas, las cuales se pueden ver en la figura 2.1. El desarrollo empieza con la etapa "lag", en esta casi no hay crecimiento celular. El crecimiento sucede en la siguiente etapa, la de aceleración, y ésta le da entrada a la etapa exponencial que continua hasta que la fuente de sustrato se consume por completo. Después viene la etapa estacionaria y por último la fase de declinación o muerte (Nauman, 2008).

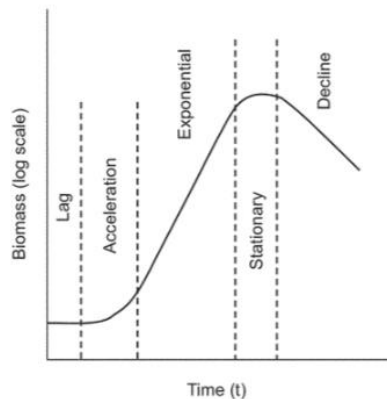


Figura 2.1 Etapas de crecimiento celular (Nauman,2008)

Para la cinética de crecimiento de los microorganismos existen diversos modelos porque hay una gran variedad de especies y cada una tiene un desarrollo específico,

por lo que es muy difícil ajustar un solo modelo a todas las especies de microorganismos.

El modelo más conocido es el modelo de Monod, éste permite la correlación matemática de la concentración de sustrato con la cinética de crecimiento y está basado en la cinética enzimática de Michaelis-Menten (Takors, 2009).

Ecuación 2.2 Modelo de Monod (Takors, 2009)

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S}$$

También existen modelos para los casos de inhibición por producto, inhibición por sustrato e incluso inhibición por biomasa.

Modelos de inhibición por producto y por sustrato

Ecuación 2.3 Ecuación de Monod (Takors, 2009)

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{K_P}{K_P + S}$$

Ecuación 2.4 Ecuación de Han and Levenspiel (Takors, 2009)

$$\mu = k \cdot \mu_m \left[\prod_{i=1}^i \left[1 - \frac{P}{P_m} \right] \right] \cdot \frac{S}{S + K_S \left[\prod_{i=1}^i \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^m \right]} \cdot \left[\prod_{i=1}^i \left(1 - e^{\left(-\frac{S}{S_{min}} \right)} \right) \right]$$

Ecuación 2.5 Ecuación de Hinselwood (Takors, 2009)

$$\mu = \mu_m \cdot \left(\frac{C_S}{C_S + K_S} \right) \cdot \left[\prod_{i=1}^i (1 - K_P \cdot C_P) \right] \cdot \left[\prod_{i=1}^i \left(1 - e^{\left(-\frac{C_S}{C_{Smin}} \right)} \right) \right]$$

Ecuación 2.6 Ecuación de Aiba and Shoda (Takors, 2009)

$$\mu = \mu_m \cdot \left(\frac{C_S}{C_S + K_S} \right) \cdot \left[\prod_{i=1}^i (e^{-K_P \cdot C_P}) \right] \cdot \left[\prod_{i=1}^i \left(1 - e^{\left(-\frac{C_S}{C_{Smin}} \right)} \right) \right]$$

Ecuación 2.7 Ecuación de Levenspiel (Takors, 2009)

$$\mu = \mu_m \cdot \left(\frac{C_S}{C_S + K_S} \right) \cdot \left[\prod_{i=1}^i \left(1 - \frac{C_P}{C_{Pm}} \right)^n \right] \cdot \left[\prod_{i=1}^i \left(1 - e^{\left(-\frac{C_S}{C_{Smin}} \right)} \right) \right]$$

Ecuación 2.8 Ecuación de Ghose & Tyagi (Takors, 2009)

$$\mu = \mu_m \cdot \left(\frac{C_S}{C_S + K_S} \right) \cdot \left[\prod_{i=1}^i \left(1 - \frac{C_P}{C_{Pm}} \right) \right] \cdot \left[\prod_{i=1}^i \left(1 - e^{\left(-\frac{C_S}{C_{Smin}} \right)} \right) \right]$$

Para los datos cinéticos de este proyecto solo se usarán modelos de inhibición por producto e inhibición por sustrato porque se ha reportado que los *Lactobacillus rhamnosus* sufren de una inhibición en su crecimiento cuando hay un exceso de su producto, ácido láctico, ya que hay un cambio de pH y éste afecta directamente al crecimiento del microorganismo. A menos pH el tiempo de fermentación es más alto, consume menos glucosa, y en general hay una productividad más baja (Gonçalves, Ramos, Almeida, Xavier, & Carrondo, 1997).

El crecimiento de las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, familiar cercano de *Saccharomyces boulardii*, es inhibido por exceso de sustrato y de etanol, su producto (T.K. Ghose, 1979). Pero su pH óptimo es 4, por lo que no se vería inhibido si hubiera presencia de ácido (Salari & Salari, 2017).

Un factor importante para el desarrollo y crecimiento de los microorganismos es el tipo de sustrato que se va a alimentar. Hay estudios que demuestran que al usar sacarosa (azúcar) como sustrato para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, se presenta la hidrólisis por la invertasa en el espacio periplásmico, que es afuera de la célula, entre la pared celular y la membrana citoplásmica. Una vez que se hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa, estos monosacáridos entran a la célula por difusión y se vuelven disponibles para la fosforilización intracelular (Marques, Raghavendran, Stambuk, & Gombert, 2015). Esto último es de interés, porque la

principal fuente de sustrato en el medio a utilizar es la sacarosa que está presente en la melaza de betabel y en el mismo azúcar. Se espera que *Saccharomyces boulardii* al ser una variedad cercana a *Saccharomyces cerevisiae* tenga un comportamiento similar.

En cambio, para *L. rhamnosus* existen cepas que no pueden o son muy lentos e ineficientes en fermentar la sacarosa en sistemas aerobios o anaerobios. Los sustratos con los que mejor crecen son azúcares simples, como glucosa y fructosa (Hedberg, Hasslöf, Sjöström, Twetman, & Stecksén-Blicks, 2008). Al no mostrar actividad con sacarosa, nos lleva a pensar que no tienen la capacidad de hidrolizar este azúcar.

El crecimiento de los microorganismos se lleva a cabo en reactores donde variables como pH, temperatura, antiespumante, flujos de entrada y salida y concentración de oxígeno, entre otros, se pueden controlar para asegurar las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo.

Existen tres tipos de operación de un reactor: lote, lote alimentado y continuo.

La operación por lotes se caracteriza por no tener entradas ni salidas del reactor (Fogler, 2001) y el sustrato con el que cuenta el cultivo es limitado, por lo que llegan pronto a una etapa estacionaria. Un factor importante en un reactor por lote es la agitación constante ya que asegura la homogeneidad dentro del sistema, que todos los microorganismos dentro de él tengan acceso al sustrato y oxígeno y que se mantengan condiciones isotérmicas (Towler & Sinnott, 2013). Este tipo de operación es preferible cuando se desean tiempos de fermentación cortos (Currel R.C. Van Dam, 1997).

Considerando que el balance de materia de los reactores es que la acumulación es igual a la cantidad de la especie que se está produciendo por la reacción más la alimentación de esta misma especie menos la salida de esta (ACUMULACIÓN =

REACCIÓN + ENTRADA – SALIDA) (Fogler, 2001), el balance de materia para el reactor por lotes para cada especie queda de la siguiente manera:

Ecuación 2.8 Balance de materia en un reactor por lotes

Biomasa

$$X \cdot \mu = \frac{dX}{dt}$$

Sustrato

$$-\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} = \frac{dS}{dt}$$

Producto

$$\frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \mu \cdot X = \frac{dP}{dt}$$

Por otro lado, la operación por lote alimentado cuenta únicamente con una entrada de sustrato. Al alimentar sustrato constante o intermitentemente se extiende la etapa exponencial de crecimiento, por lo que se logran concentraciones de biomasa elevadas. Las ecuaciones de balance de materia por especie son las siguientes:

Ecuación 2.9 Balance de materia en un reactor de lote alimentado

Biomasa

$$\mu \cdot X \cdot V_R = \frac{dm_X}{dt}$$

Sustrato

$$F_{in,S} \cdot S_{in} - F_{out} \cdot S_R + \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot V_R = \frac{dm_S}{dt}$$

Producto

$$\frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \mu \cdot X \cdot V_R = \frac{dm_P}{dt}$$

Volumen reactor

$$F_{in,S} = \frac{dV_R}{dt}$$

Los reactores que operan por continuo tienen una alimentación constante de sustrato y una salida de productos y biomasa. Las ecuaciones de balance de materia por especie definidas para este sistema son las siguientes.

Ecuación 2.10 Balance de materia para un reactor con operación continua

Biomasa

$$F_{out} \cdot X_R + \mu \cdot X \cdot V_R = \frac{dm_X}{dt}$$

Sustrato

$$F_{in,S} \cdot S_{in} - F_{out} \cdot S_R + \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu \cdot V_R = \frac{dm_s}{dt}$$

Producto

$$F_{out} \cdot P_R + \frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \mu \cdot X \cdot V_R = \frac{dm_P}{dt}$$

Volumen reactor

$$F_{in,S} - F_{out} = \frac{dV_R}{dt}$$

Uno de los objetivos de este proyecto es operar un reactor multicultivo donde estén creciendo contiguamente los microorganismos probióticos LR, LP y SB. Los reactores multicultivo son sistemas en los que diferentes poblaciones celulares crecen juntas tratando de simular un ambiente natural donde los microorganismos

coexisten dentro de comunidades microbianas complejas (Marmann, Aly, Lin, Wang, & Proksch, 2014). El uso de reactores con crecimiento multicultivo es tentativo porque se pueden reducir múltiples operaciones y con ello costos; además, se ha encontrado que la interacción entre ciertas especies de cultivos celulares puede proporcionar beneficios en el crecimiento de ellas o bien, en la producción objetivo (Goers, Freemont, & Polizzi, 2014). Hay variables que distinguen y definen los tipos de co-cultivos y su complejidad; entre ellas están el número de poblaciones celulares, el grado de similitud entre ellas, el ambiente indicado para cada una de las poblaciones y el grado de separación entre poblaciones. Se vuelve más impredecible e inestable el comportamiento de los microorganismos mientras más poblaciones celulares estén interactuando y aún más cuando los microorganismos son de diferente especie, porque pueden tener diferente velocidad de crecimiento o existe la posibilidad de que se inhiban entre sí (Goers et al., 2014).

Se está buscando mutualismo entre LR, LP y SB, es decir, que todos los organismos se vean beneficiados por su interacción; u otro buen panorama, el cual sería el comensalismo, que es cuando uno o dos de los microorganismos obtienen ventajas y el otro no se ve afectado (Stadie, Gulitz, Ehrmann, & Vogel, 2013). Se ha reportado que la interacción entre levaduras y lactobacilos es de tipo comensalismo, donde el rendimiento y la velocidad de crecimiento de los lactobacillus incrementó, pero las levaduras no se vieron afectadas. Se cree que las levaduras compiten parcialmente con las bacterias por la fuente de nitrógeno y que sintetizan y excretan aminoácidos esenciales y estimulantes que mejoran el rendimiento de los lactobacillus (Gobbetti, Corsetti, & Rossi, 1994).

El balance de materia que describe a un biorreactor que se comportó como tipo lote para la producción de SB y posteriormente se convirtió en lote alimentado, a partir del ingreso de un flujo proveniente de un reactor en continuo con los microorganismos LR y SB; ambos alimentados con medio MBT es el siguiente:

Ecuación 2.11 Balance de materia para un reactor co-cultivo con los microorganismos LR, LP y SB

Biomasa – SB

$$\mu \cdot X_{lev,R} \cdot V_R = \frac{dm_{X,lev}}{dt}$$

Biomasa - LR y LP

$$F_{in,lac} \cdot X_{lac,in} + \mu \cdot X_{lac,R} \cdot V_R = \frac{dm_{X,lac}}{dt}$$

Producto – Lactato

$$F_{in,P} \cdot P_{in} + \frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \mu \cdot X_{lac,R} \cdot V_R = \frac{dm_P}{dt}$$

Sacarosa

$$F_{in,sac} \cdot S_{sac,in} + \mu \cdot S_{sac,R} \cdot V_R = \frac{dm_{S,sac}}{dt}$$

Glucosa

$$F_{in,glu} \cdot S_{glu,in} + \mu \cdot S_{glu,R} \cdot V_R = \frac{dm_{S,glu}}{dt}$$

Volumen del reactor

$$F_{in,lac} + F_{in,P} + F_{in,sac} + F_{in,glu} = \frac{dV_R}{dt}$$

Cuando se trabaja con biorreactores se hace uso de uno de los métodos de la medición de la biomasa como la medición indirecta por medio de la capacitancia del medio.

La capacitancia o capacidad eléctrica se refiere a la capacidad de un componente de recibir y almacenar cargas eléctricas, para ello se realiza una prueba sencilla en

la cual se colocan dos láminas conductoras dejando el posible capacitor entre ellas y se deja pasar una corriente eléctrica conocida de una a otra lámina y se cuantifica cuánto de ese voltaje llegó a la segunda lámina (Tapias, 1962).

Se usa la capacitancia para cuantificar biomasa viable que no es posible cuantificar con otros métodos como turbidez además de ser más práctica que las técnicas de cuantificación de biomasa total tales como técnica de Bradford entre otras. Se ha observado la viabilidad de la cuantificación de biomasa viable a partir de varios estudios realizados en los años 80 que han continuado hasta la actualidad (Blake-Coleman, 1984), (Ciureanu, 1997) los cuales se basaron en la observación de las propiedades capacitivas de las células vivas tanto en procariontas como en eucariontas desde hace casi 70 años (Schwan, 1957). En los estudios de Schwan se observó la permisividad eléctrica de las células vivas y la variación de la misma al modificar la frecuencia de las cargas añadidas. Se observó también que la capacitancia depende en gran medida de la geometría y la superficie de intercambio que presente el objeto lo cual presenta una variación determinante entre cada célula.

A partir de estos estudios se determinó un método de cuantificación de células viables cuyo funcionamiento se basa en hacer pasar una corriente en Pv de una lámina a otra, se mide la capacitancia en la sustancia y, con ayuda de un factor específico determinado empíricamente a partir de una curva de calibración con volúmenes conocidos de célula en el mismo medio y condiciones de crecimiento, se realiza la estimación de la cantidad de células viables, por tanto vivas y que presentan capacitancia, en el reactor analizado (Arnoux, 2005).

2.2 Planeación y seguimiento del proyecto

Se trabajó el proyecto a partir del cumplimiento de objetivos particulares. El primer objetivo fue caracterizar la cinética de crecimiento de los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus* (el cual tiene una cinética semejante al *Lactobacillus plantarum*, por lo que para esta segunda se tomó en cuenta que era igual a la primera) y *Saccharomyces boulardii*; para lo cual fue necesario la obtención de datos experimentales y posteriormente, su tratamiento con el Software *MATLAB*®, en donde se compararon diversos modelos cinéticos teóricos para tomar el que mejor describiera la cinética.

Se comenzó realizando corridas experimentales para los microorganismos LR y SB en operación por lote y realizando las mediciones correspondientes para el conteo de sus carbohidratos y biomasa. Posterior a las mediciones se obtuvieron curvas de relación de concentración de biomasa para relacionar las UFC contadas por el método de conteo en placa y la concentración en unidades de g/L.

Al tener los datos experimentales de los reactores tipo lote con LR y SB se calculó un modelo teórico con el Software *MATLAB*® que describiera de manera acertada a los primeros.

Para el cumplimiento de nuestro segundo objetivo particular se modeló una corrida preliminar de un biorreactor multicultivo de tipo lote alimentado; en el cual se alimentaban LR y LP provenientes de un reactor de tipo continuo al lote alimentado con SB; todo con medio MBT como fuente de carbono y nitrógeno. Posteriormente, se aplicaron los parámetros preliminares como concentraciones iniciales, volúmenes y flujos a una nueva corrida experimental con las características deseadas de operación; se midieron sus carbohidratos y biomasa, para finalmente, obtener un modelo teórico que emulara el co-cultivo hecho.

El proceso experimental se describe en las siguientes secciones de manera general; mientras que las actividades hechas para la obtención de datos experimentales de los reactores tipo lote se describen con mayor exactitud en la sección 1 de anexos.

2.2.1 Diagrama de Gantt

El diagrama de la figura 2.2.1 y 2.2.2 muestra la organización de tareas que se efectuó para la elaboración del proyecto.

Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Occidente
Elisa C. Volquarts, Ana Martínez, Carmen Vergara.

mié, 8/29/2018

1



Figura 2.1 Diagrama Gantt para la elaboración del proyecto

2.2.2 Corridas experimentales en reactores tipo lote para *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii*

2.2.2.1 Preparación de medio MBT

El medio MBT fue diseñado y preparado como un trabajo previo de Peña, el cual se basa en utilizar una concentración de 40g/L de sacarosa, 100g/L de melazas de betabel al 10% p/v (comprado en un mercado local), 5.71g/L de extracto de levadura y 20ml de extracto de té verde al 10% p/v. La mezcla le da al microorganismo una fuente rica en carbohidratos y nitrógeno para lograr la máxima producción de biomasa (Peña, 2018)

Este medio se esterilizó a 80°C durante una hora (Peña,2018) en una autoclave YAMATO SQ-510-C (Japón) para lograr las condiciones del medio requeridas para las corridas experimentales.

Cabe mencionar que para la corrida experimental de LR no se tomó en cuenta que las melazas de betabel se encontraban al 10% de concentración, por lo que se trabajó con 10g/L de este en el medio MBT.

2.2.2.2 Corrida experimental

Las cepas de LP y SB se obtuvieron de Raff Lactoingredientes, México. Estas fueron reactivadas y propagadas en medios comerciales como MRS (Difco™) y YPD (BD), lo cual se tomó como stock de cultivo. Se tomaron las cepas de estos medios y se realizó la propagación de ellas en medio MBT durante 11hrs a una temperatura de 37.5°C y con agitación orbital de 150rpm en una incubadora rotatoria Infors HT Ecotron, EUA; esto para disminuir la etapa “lag” al inocular al reactor lote.

Se usó como reactor tipo lote un reactor PYREX® de 1L, el cual tuvo un volumen inicial de MBT de 600ml estéril. El inóculo fue del 1% v/v y las condiciones a las que estuvieron fueron de 37°C y 125rpm, haciendo uso de parrillas de calentamiento con agitación. En el caso de los lotes para SB se tuvo además el control de flujo de aire a una velocidad de 1L/min con ayuda de un rotámetro. El tiempo de operación

de los reactores fue de 25hrs; tomando muestras por triplicado de los tres reactores operados para cada una de las corridas (corrida 1- LR y corrida 2- SB) en tubos Eppendorf® durante los tiempos 0-6,8-11,25hrs, mantenidos en refrigeración a 3°C hasta su análisis.

La corrida experimental se puede observar en la foto de la figura 2.2.

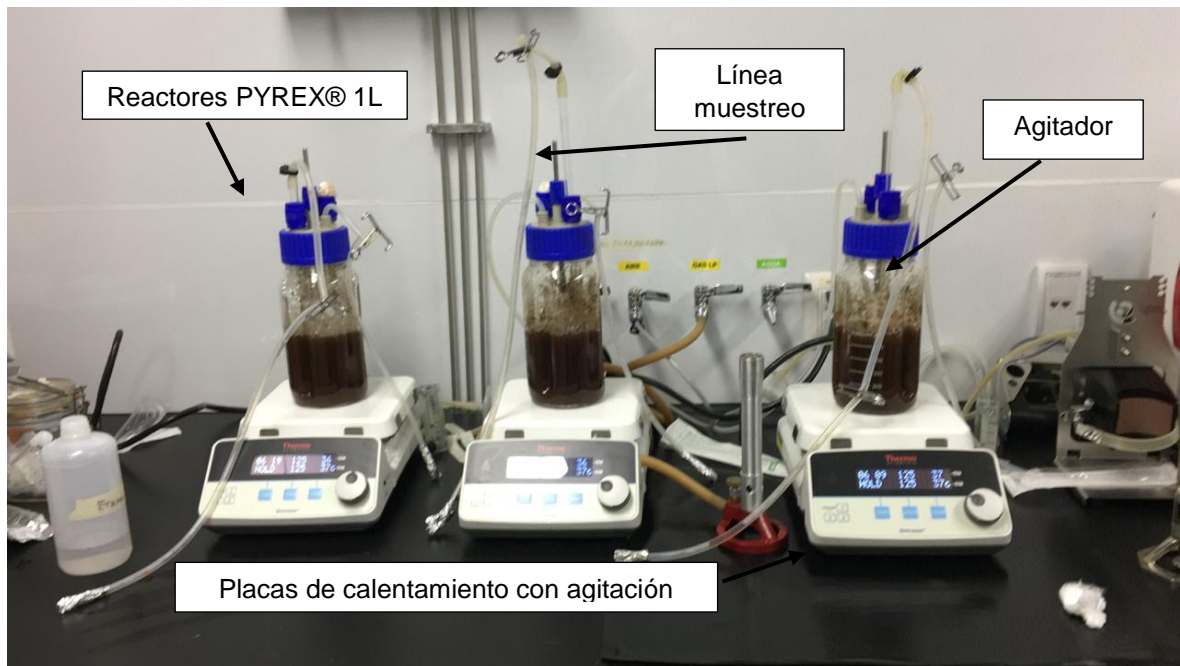


Figura 2.2 Corrida experimental para reactor por lote

2.2.2.3 Medición de carbohidratos y biomasa viable

Para el conteo de carbohidratos: sacarosa, glucosa y lactato (para el caso de LR), se utilizó el analizador bioquímico YSI 2900, USA. Como diluyente se usó una disolución salina 0.85% p/v.

Por otro lado; el conteo de biomasa viable se hizo por medio del método de conteo en placa por técnica de microgota, con cajas Petri con MRS o YPD como fuente de carbono para LR y SB, respectivamente y agar. Las diluciones se hicieron con disolución salina 0.85% p/v. El sembrado fue por triplicado por dilución para cada toma de los reactores, las cajas fueron incubadas hasta su conteo a una

temperatura de 37°C. Los conteos se hicieron 24hrs después de su sembrado y se confirmaron 48hrs después.

Para obtener los datos de concentración de biomasa en unidades de UFC/mL a g/L se hizo una curva de relación, sembrando a los microorganismos LR y SB crecidos en medios comerciales a las mismas condiciones que para las corridas experimentales, pero por tiempos de 6 y 8hrs; en cajas Petri con MRS o YPD y agar; centrifugados a 4000rpm y una temperatura de 4°C por 10min en una LABOGENE 1730 R, Allerod, Selandia; lavados y diluidos con una disolución salina al 0.85% p/v. Se relacionó el conteo de sus UFC con el peso de los microorganismos medido en una balanza miroanalítica hfhjfhj de un volumen específico de las diluciones hechas (1;1, 1;5, 1:10, 1:30, 1:70 y 1:100), para lo cual fue necesario previamente dejar los vasos usados para el procedimiento a peso constante; siendo secados en una estufa MEMMERT UF75, Shanghai, China.

Se hizo el conteo de la siembra por triplicado de las diluciones de las 12 muestras de los 3 reactores para cada uno de los microorganismos. Se tomó el dato de biomasa en UFC de la dilución más concentrada en donde se haya podido realizar el conteo y se realizó un promedio de los tres datos. La cantidad de UFC se pasó a unidades de concentración de biomasa en UFC/MI, tomando en cuenta que la cantidad de dilución sembrada fue de 10µL, con apoyo de la ecuación 3.1.

Ecuación 3.1

$$\text{Concentración de biomasa} = \frac{\text{Promedio de conteo de UFC} * 10^{\text{factor de dilución}}}{0.01\text{mL}}$$
$$[=] \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

Se hizo uso de la ecuación 3.1 para obtener las concentraciones de biomasa en unidades de UFC/MI a partir del promedio del triplicado de los datos.

Por otro lado, se obtuvo el peso de las células o de la disolución salina a partir de la diferencia del peso de los vasos vacíos menos el peso de los vasos con las diluciones de microorganismos o disolución salina a peso constante.

Por medio de la ecuación 3.2 se calculó la concentración promedio de las células en unidades de g/L.

Ecuación 3.2

Concentración de biomasa

$$= \frac{\text{Promedio de conteo de peso células } g}{0.01mL} - \frac{\text{Promedio de masa de disol. salina } g}{0.01mL}$$
$$[=] \frac{g}{mL}$$

2.2.3 Corrida experimental en reactor tipo lote alimentado para *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces boulardii*

2.2.3.1 Caracterización de bombas peristálticas

Se trabajó la corrida con tres bombas peristálticas MASTERFLEX L/S, EUA; las cuales se calibraron con manguera Masterflex 14, tomando distintos puntos de flujo entregado por esta (medido con probeta y cronómetro) con respecto a la potencia programada.

2.2.3.2 Corrida experimental

El procedimiento para la obtención de las cepas a inocular fue el mismo que se hizo para los reactores por lote, a excepción de que los medios usados para el inóculo fueron comerciales: MRS (Difco™) y YPD (BD) para LR y LP y SB respectivamente, haciendo los pases necesarios para lograr una concentración de 10^7 células.

La producción de LR y LP se realizó en un biorreactor tipo continuo APPLIKON My Control de 250mL, Guangzhou, China; con sensores de pH y OD APPLISENSE Z-010012080, Guangzhou, China. El volumen inicial de medio MBT fue de 200mL con un inóculo de LR y LP del 10% v/v con una relación de 50%/50% entre los microorganismos. Las condiciones de operación programadas fueron de $\text{pH}=6 \pm 1$; $T=37^{\circ}\text{C} \pm 4$; y 250rpm. La velocidad de alimentación y salida fue de 20mL/h de medio MBT, el cual se encontraba calentado y agitado con ayuda de una placa de calentamiento con agitación, desde la hora 0 hasta la 29, en donde el flujo de alimentación y salida se aumentó hasta 80mL/h; ocasionando mayor cantidad de alimento, pero disminuyendo el tiempo de residencia del reactor. Posteriormente en la hora 35 se dejó de alimentar medio, para luego, en la hora 37.5 regresar a un flujo aproximado de 23mL/h. Finalmente, en la hora 47 se dejó de alimentar MBT de manera continua al reactor, para agregar por pulsos una cantidad de 20mL en las horas 49, 50 y 51; parando la operación en la hora 52. Cabe mencionar que la etapa estacionaria del reactor continuo se logró en un tiempo aproximado de 3hrs.

La producción de SB como tipo lote y el posterior multicultivo como tipo lote alimentado se hizo en un reactor APPLIKON Ez- Control de 7L, Guangzhou, China; conectado a un cuantificador de biomasa. El volumen inicial del reactor fue de 2L, a lo que se agregó un inóculo del 10% v/v del microorganismo SB, dejando el reactor como tipo lote durante un tiempo de 12hrs, antes de su conexión con medio MBT y el reactor continuo.

La levadura se encontraba en etapa estacionaria de crecimiento cuando se comenzó a alimentar a los L a una velocidad de 20,mL/h, flujo equivalente a la alimentación de MBT. El RLA comenzó a operar en la hora 24 del sistema. Las condiciones de operación fueron: $33^{\circ}\text{C} \pm 2$, 250rpm, $\text{OD}=30\% \pm 10$ y $\text{pH}= 6.5 \pm 1$ durante las primeras 5hrs, realizando un segundo ajuste, cambiando la agitación a 500rpm; así como los flujos de alimentación del reactor C y el medio MBT a 8mL/h. En la hora 32, debido a que las melazas de betabel obstruyeron la manguera Masterflex 14 hubo una desconexión del sistema por la presión originada en esta.

Por otro lado, en la hora 35 se dejó de alimentar medio, para en la hora 37.5 agregar 800ML de medio y convertirlo en un reactor de tipo lote. En la hora 47 se hizo una cosecha de 1L para luego reconectar al medio MBT con un flujo de 23mL/h.

El control de pH en este reactor no estuvo automatizado todo el tiempo, sino hasta la hora 36.5.

Las muestras del RC se tomaron aproximadamente cada 3hrs, mientras que del RLA cada hora, esto en tubos Eppendorf® mantenidos en refrigeración a 3°C hasta su análisis.

La corrida experimental se puede observar en la foto de la figura 2.3 y en el diagrama de la figura 2.4.

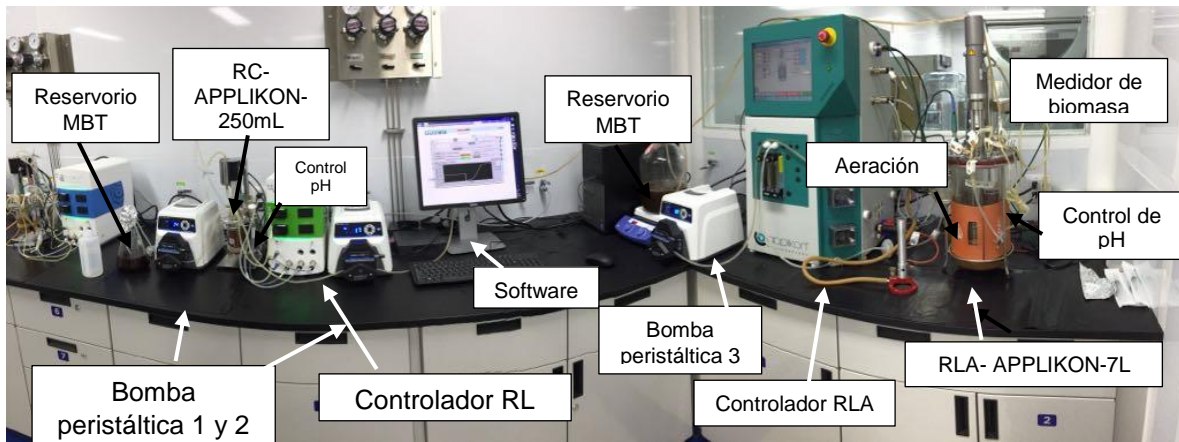


Figura 2.3 Corrida experimental para reactor de lote alimentado

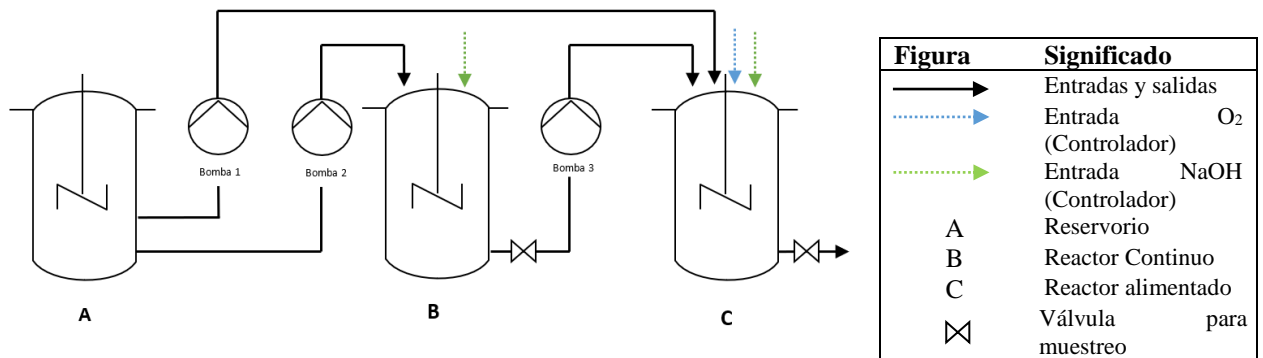


Figura 2.4 Corrida experimental para reactor de lote alimentado

Las condiciones monitoreadas para el reactor C se encuentran en la tabla 3.1, mientras que para el reactor LA en la tabla 3.2.

Tabla 3.1 Condiciones monitoreadas para el RC

Reactor C				
Condiciones monitoreadas				
Tiempo (h)	pH	T (°C)	OD (%)	rpm
0	6.04	37	0	250
3	6.02	36.7	0	250
4	6.05	36.6	0	250
25	6.01	37.1	0	250
28	6.04	36.7	0.3	250
31	6.51	35.1	0	250
34	6	36.7	0.9	250
37	4.67	36.7	0.9	250
47	6.1	36.6	7.3	250
50	6.1	37	11.8	250
52	6.11	37	12	250

Tabla 3.1 Condiciones monitoreadas para el RLA

Reactor LA							
Condiciones monitoreadas							
Tiempo (h)	Biomasa (cell/mL)	Capacitancia (pF/cm)	Conductividad (mS/cm)	pH	OD (%)	T (°C)	rpm
24	4.72E+10	8.16	3.94	4.71	0	30.3	250
25	4.50E+10	7.76	5.19	6.38	3.2	32.2	250
26	4.50E+10	7.76	5.15	6.13	3	32	250
27	4.39E+10	7.57	5.44	6.36	5.2	33	250
30	4.19E+10	7.21	6.07	6.6	20	33.8	500
31	4.13E+10	7.11	5.87	6.2	20	33	500
33	3.52E+10	6.07	5.81	5.71	22.1	32.9	500
34	3.21E+10	5.53	6.25	6.18	25.7	33.1	500
35	2.93E+09	5.05	6.52	5.69	36.1	33.3	500
36	2.52E+10	4.34	7.37	6.55	30	33.1	500
37	2.27E+10	3.91	7.87	6.52	37.9	33	500
37.5	2.15E+10	3.71	8.16	6.54	35.5	33	500
47	1.40E+10	2.39	10.51	6.56	9.2	33.1	500
48	1.31E+10	2.26	70.61	6.45	31	33.2	500
49	1.14E+10	1.95	10.79	6.49	17.7	33	500
50	9.69E+09	1.66	10.98	6.49	19.4	32.8	500
51	8.44E+09	1.45	11.2	6.48	46.1	32.9	500
52	1.16E+01	-	-	6.33	0	33	500

2.2.3.3 Medición de carbohidratos y biomasa viable

Se siguió el procedimiento previamente mencionado en la sección 2.2.1.3 para la medición de carbohidratos sacarosa, glucosa y lactato (LR) con el YSI 2900, USA; así como el conteo de la siembra en cajas Petri por medio de la técnica de microgota para la biomasa viable y su relación a unidades de concentración en g/L con las relaciones ya calculadas tanto para LR (se considera igual para LP) como para SB.

Para confirmar el conteo de sacarosa se implementó la microtécnica de ácido sulfúrico- UV. Se comenzó con la realización de la curva estándar usando un stock de sacarosa 0.1g/L; haciendo diluciones de concentración conocida de la misma y midiendo la absorbancia del resultado de agregar 75 μ L de ácido sulfúrico a 25 μ L de la disolución (315nm). Las mediciones se realizaron en un lector de microplacas programado a una agitación alta y temperatura de incubación de 25°C, por triplicado. Posteriormente, se trabajó con las diluciones de las muestras de los reactores y se implementó la curva estándar.

2.2.2.4 Obtención de imágenes de los microorganismos

Se obtuvieron microfotos con una cámara digital marca OPTIKA conectada a un microscopio. Estas fotos fueron de tres muestras diferentes, una al principio de la corrida del reactor lote alimentado para apreciar a las levaduras (T24), otra al final de este mismo reactor (T47) para apreciar a ambos microorganismos juntos y por último de una muestra del reactor continuo (T34) para apreciar a los lactobacillus solos.

Se colocó una gota de cada muestra sin diluir en un portaobjetos diferente y encima de estos se colocaron el cubreobjetos. Se situaron sobre la platina del microscopio y se analizaron las muestras. Los objetivos usados fueron 40X y 100X.

La finalidad de estas fotos fue confirmar que los tres cultivos estuvieran creciendo (LR, LP y SB) y como se puede apreciar en la Figura 3.29 y 3.30, los tres microorganismos están presentes en el reactor alimentado.

3. Resultados del trabajo profesional

3.1 Obtención de parámetros cinéticos de crecimiento de los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* en los reactores tipo lote con medio de cultivo optimizado

3.1.1 Resultados obtenidos para conteo de carbohidratos: glucosa, sacarosa y lactato con el YSI 2900 para las muestras de los tres reactores tipo lote de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii*

Se obtuvieron los datos de concentración de glucosa, sacarosa y lactato (en caso de LR) para las muestras tomadas en las corridas experimentales por triplicado para los tres reactores. Se hizo un promedio de las tres réplicas y de esta manera se graficaron los promedios de las concentraciones de los carbohidratos con respecto al tiempo de cada reactor. Los resultados se pueden observar en las figuras 3.1-3 para el microorganismo *Lactobacillus rhamnosus*; mientras que las figuras 3.4-5 corresponden a *Saccharomyces boulardii*.

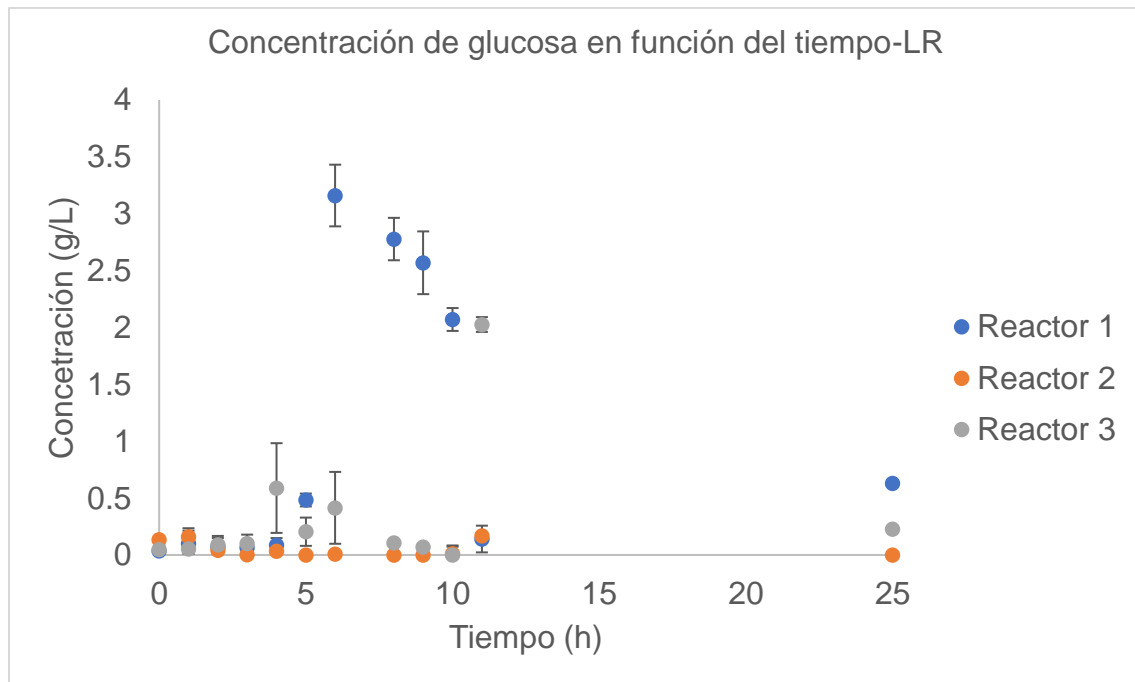


Figura 3.1 Concentración de glucosa en función del tiempo en los reactores 1, 2 y 3 para la producción de *Lactobacillus rhamnosus*

La glucosa proviene de las melazas del betabel y es consumida casi en su totalidad por los microorganismos. Se puede concluir a partir de la figura que la concentración fue muy baja durante la corrida de 24hrs; siendo el principal carbohidrato del que se estuvieron alimentando los microorganismos. La diferencia de datos entre los reactores 1,2 y 3 se piensa que se deben a un error de homogeneización del medio cuando se vertió en los reactores, a la inoculación de estos por diferentes usuarios y los posibles puntos en donde los reactores estuvieron a diferentes condiciones. La desviación estándar mostrada es la propia de las tres réplicas de medición que hizo el YSI.

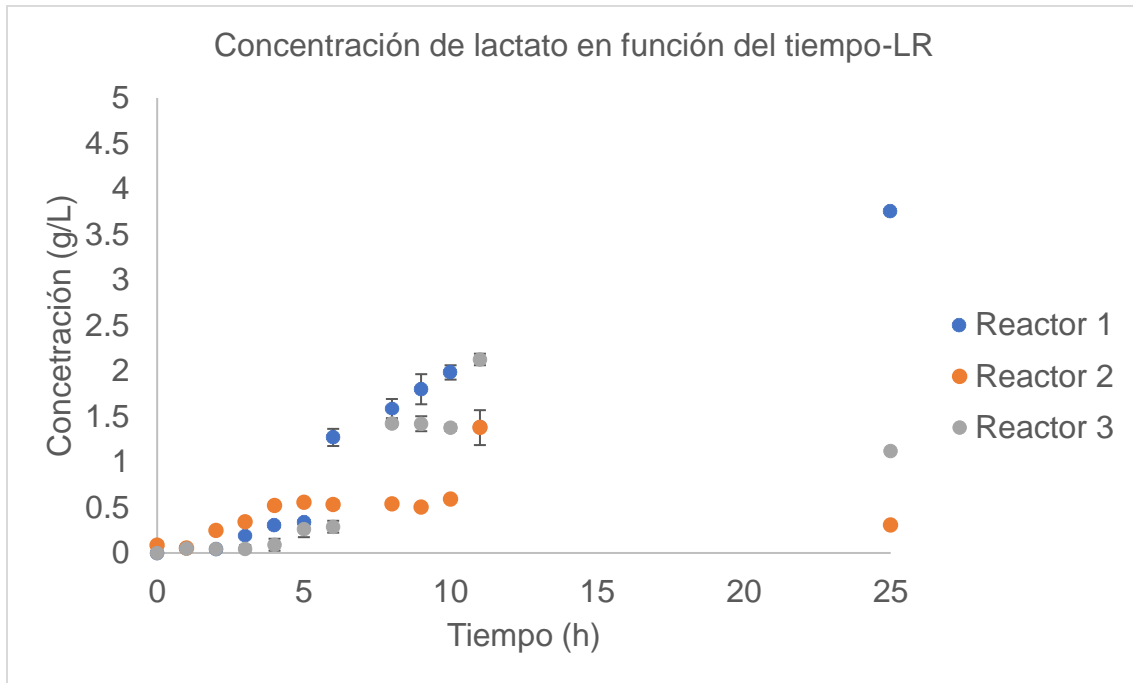


Figura 3.2 Concentración de lactato en función del tiempo en los reactores 1, 2 y 3 para la producción de *Lactobacillus rhamnosus*

En los tres reactores se observa la misma tendencia de producción de lactato; excepto en el punto final, en donde se piensa que los reactores 2 y 3 pudieron quedarse sin fuente de carbono; datos que coinciden con la producción de biomasa.

Si se compara la cantidad de glucosa que había en el reactor 1 (más que en el reactor 2 y 3) se puede explicar por qué se formó más lactato y biomasa en este, ya que tenía más fuente de carbono.

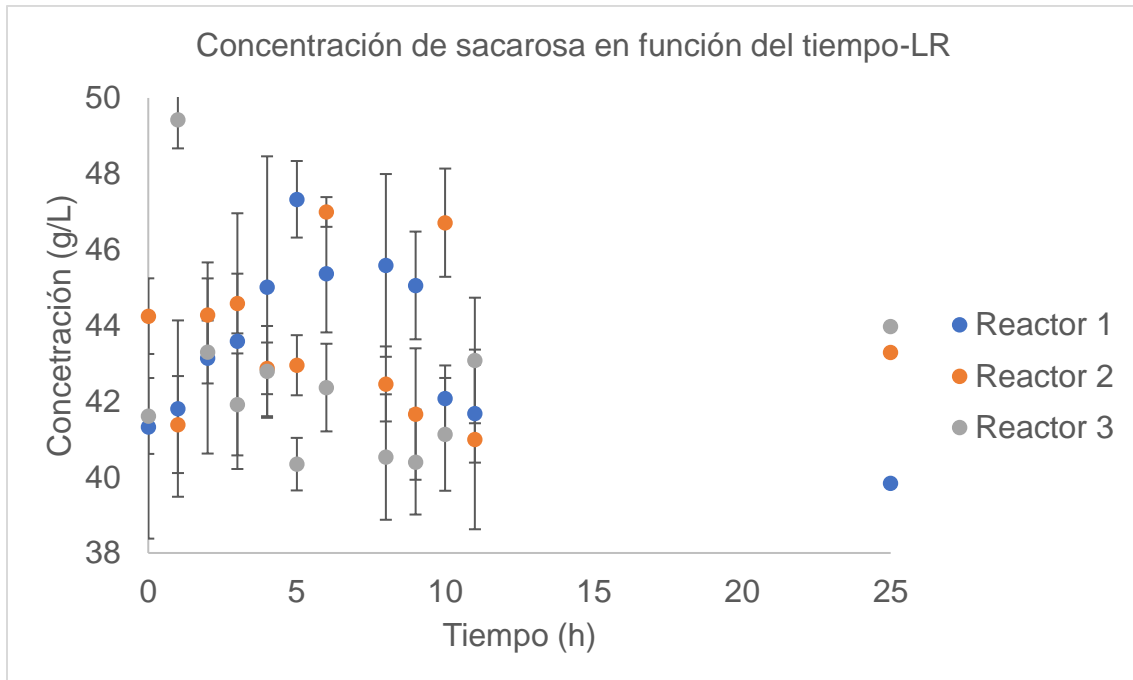


Figura 3.3 Concentración de sacarosa en función del tiempo en los reactores 1, 2 y 3 para la producción de *Lactobacillus rhamnosus*

Se piensa que el microorganismo LR, a diferencia de SB no hidroliza la sacarosa ni la consume; por lo que la concentración permaneció relativamente constante, teniendo variaciones en la medición por causas como la propia medición. Lo observado concluye con la teoría. La desviación estándar entre las réplicas puede ser un efecto de que no fueron hechas por el medidor al mismo tiempo y pudo ocurrir un efecto de sedimentación de los azúcares, ocasionando distintos valores.

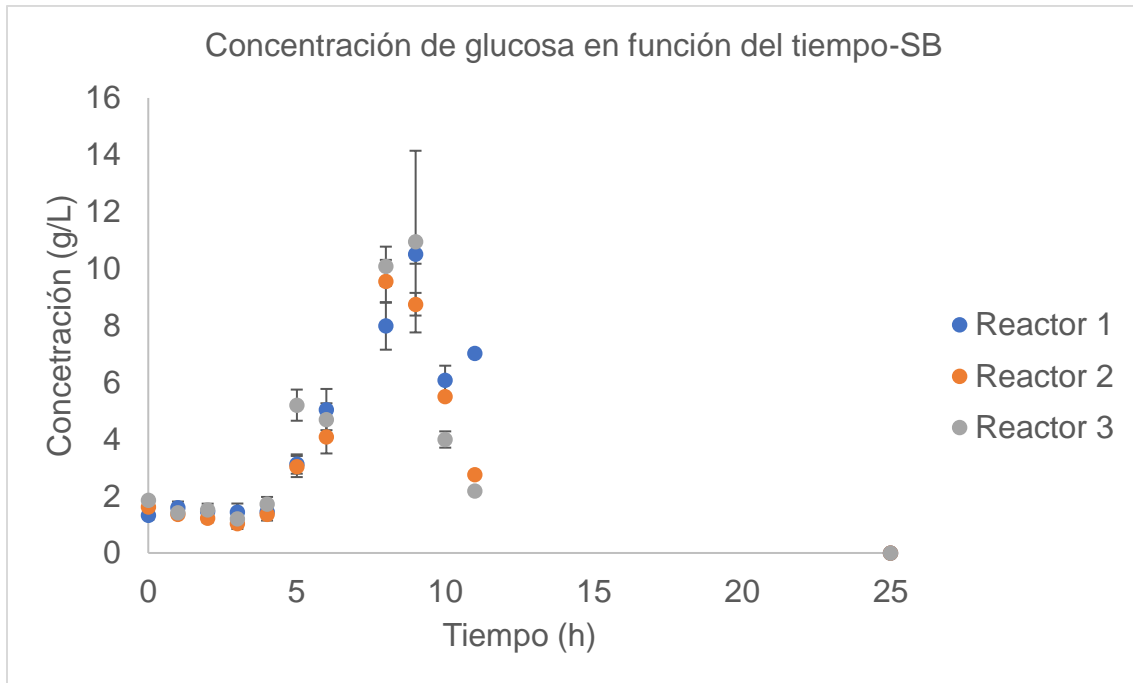


Figura 3.4 Concentración de glucosa en función del tiempo en los reactores 1, 2 y 3 para la producción de *Saccharomyces boulardii*

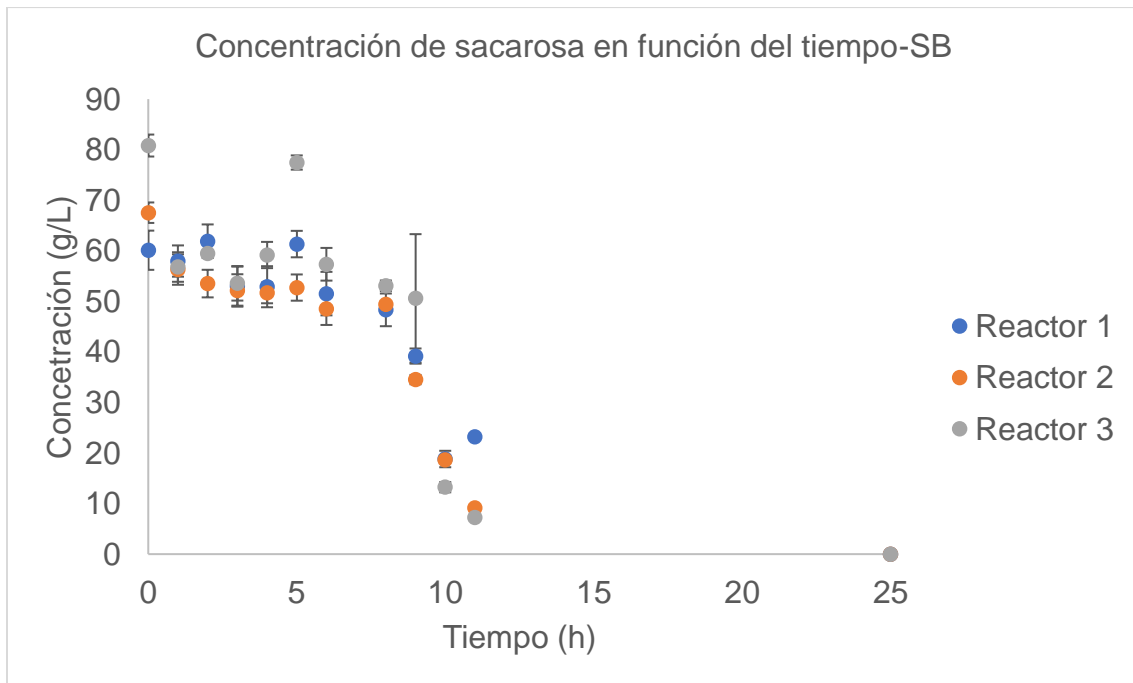


Figura 3.5 Concentración de sacarosa en función del tiempo en los reactores 1, 2 y 3 para la producción de *Saccharomyces boulardii*

La concentración de glucosa comenzó muy baja (correspondiente al medio MBT) y aumentó por un efecto de hidrólisis de la sacarosa por parte del microorganismo de SB; bajando de nuevo al ser su alimento principal para su crecimiento celular (siendo el efecto inverso con la sacarosa). Se pueden ver pocas diferencias entre las réplicas del medidor; así como la misma tendencia de los reactores; lo que significa que las condiciones para éstos si fueron correctamente replicadas.

Comparando de manera general los datos de LR y SB se hace la observación de que no se trabajó con la cantidad correcta de melazas de betabel del medio optimizado MBT para la corrida de LR, una posible causa de los datos tan entrópicos que se midieron para sus carbohidratos.

3.1.2 Curvas de relación de concentración de biomasa en unidades de UFC/mL a g/L

Los resultados de la obtención de la curva de calibración se muestran en las figuras 3.9 y 3.10.

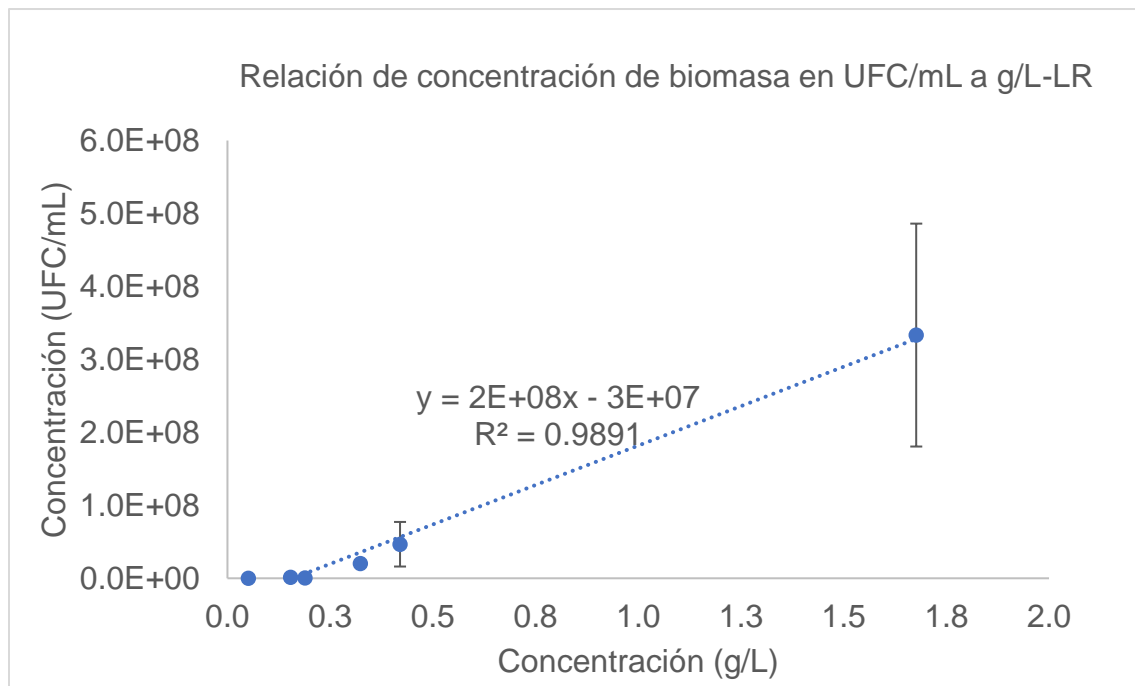


Figura 3.9 Relación de concentración de biomasa en unidades de UFC/mL a g/L para *Lactobacillus rhamnosus*

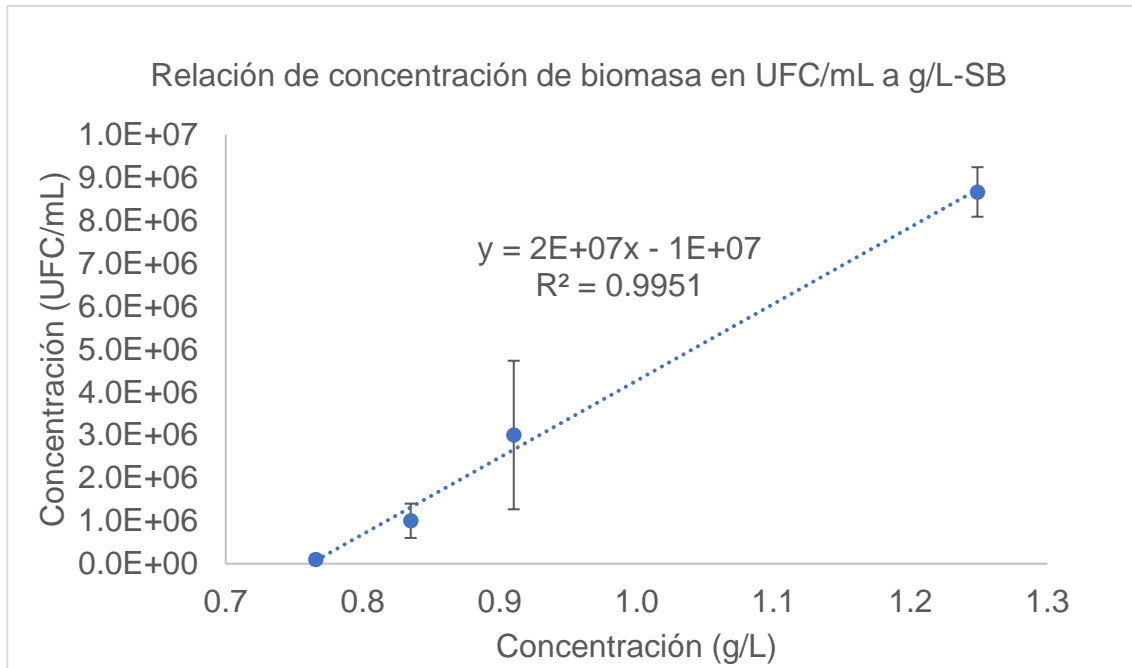


Figura 3.10 Relación de concentración de biomasa en unidades de UFC/mL a g/L para *Saccharomyces boulardii*

3.1.3 Resultados de concentración de biomasa para las muestras de los tres reactores tipo lote de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii*

Como resultado del conteo de UFC con la técnica previamente descrita y su posterior conversión con la curva de calibración a unidades de g/L se logró la obtención de las figuras 3.11 y 3.12 para las corridas experimentales de LR y SB respectivamente.

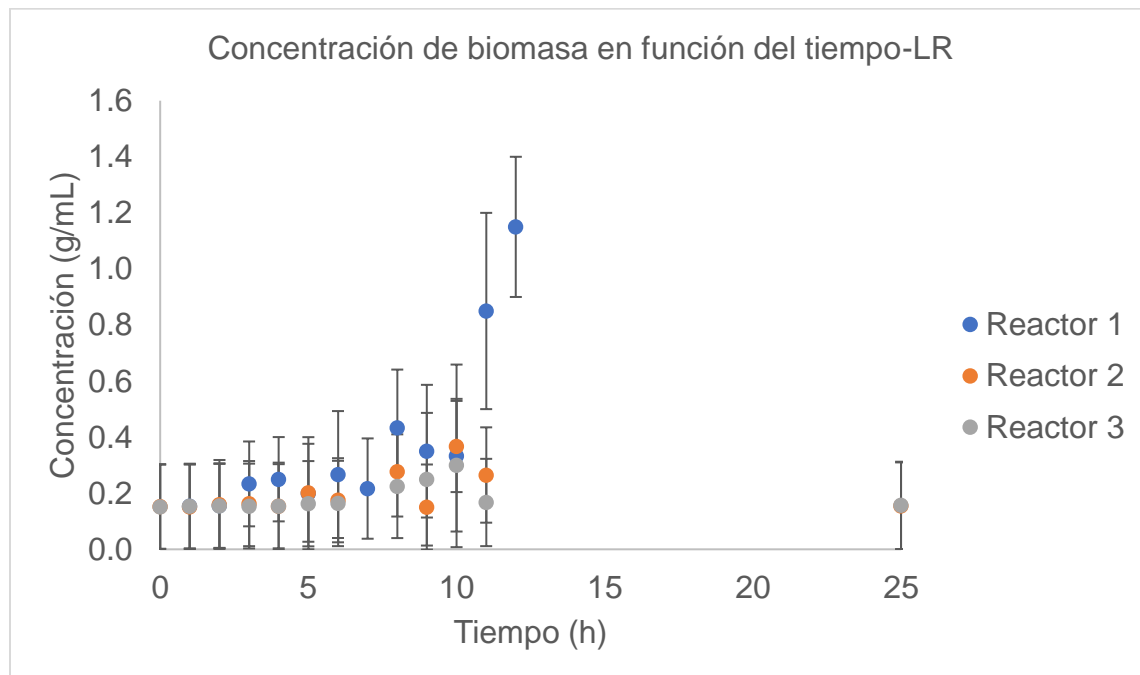


Figura 3.11 Concentración de biomasa en unidades de g/L para *Lactobacillus rhamnosus*

Al relacionar los datos de lactato con los de biomasa podemos observar que la producción de lactato en el reactor 1 fue mayor que en el reactor 2 y 3; igual que la biomasa y esto se debe a que la concentración de glucosa también fue mayor en ese reactor; mientras que en el 2 y 3 se alcanzó la etapa de mortandad por falta de alimento. Como ya se había comentado en la sección de medición de carbohidratos la diferencia entre los reactores puede ser a que el contenido de medio MBT. La

desviación estándar entre las réplicas en este caso es muy grande debido a que son muchos los factores que pueden repercutir en errores como la técnica de sembrado en placa, diluciones, conteo, entre otros.

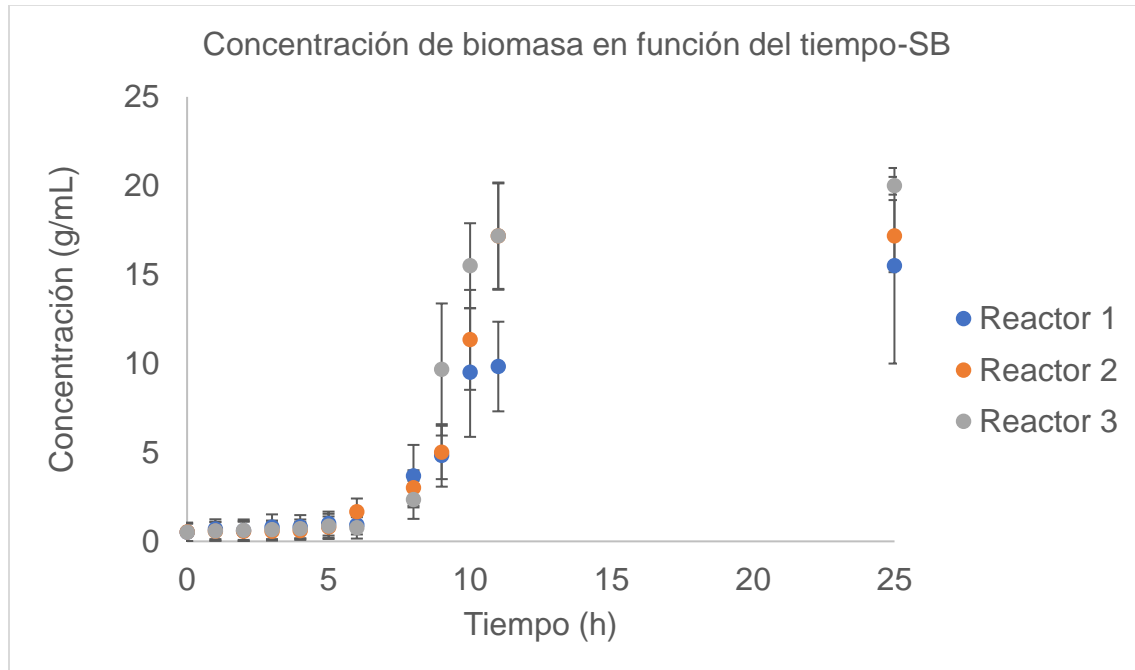


Figura 3.12 Concentración de biomasa en unidades de g/L para *Saccharomyces boulardii*

El gráfico coincide con las mediciones de glucosa y sacarosa, ya que primero se observa claramente la hidrólisis de la sacarosa (crecimiento de concentración de glucosa) y posteriormente un crecimiento en la concentración de biomasa, originado del consumo de ésta. Los tres reactores tuvieron la misma tendencia y alcanzaron concentraciones muy parecidas. De igual forma las desviaciones estándar son considerables por la cuestión de las posibles causas mencionadas.

De manera general se compara como en el caso de los reactores de tipo lote en donde se produjo LR se alcanzaron concentraciones muy pequeñas comparadas con SB. En el caso de este último si se manejó la cantidad de melazas de betabel en el MBT correctas, ocasionando una mayor producción de biomasa y por el hecho de que la morfología de ese tipo de microorganismo es mucho más grande que la de LR.

3.1.4 Modelos matemáticos que describen el proceso de producción por lote

Al ser un modelo por lotes el volumen del reactor (V_r) es constante y solo se consideró la reacción que estaba sucediendo en el reactor para las ecuaciones de balance de materia.

3.1.4.1 Corrida *Lactobacillus rhamnosus*

Los resultados de esta corrida no se pudieron ajustar a ningún modelo porque los datos obtenidos fueron muy diferentes en cada lote, por lo que se tomaron los datos de un trabajo previo a este. El modelo tomado está considerando que el lactobacillus se está alimentando de los dos azúcares (sacarosa y glucosa) algo que en este reporte se dice que no está sucediendo. Además, se buscó el mejor ajuste para el crecimiento del microorganismo, no para el consumo del sustrato o producción de lactato.

Modelo cinético (Ghose & Tyagi)

$$\mu = \mu_m \cdot \left(\frac{C_{Sac}}{C_{Sac} + K_{Sac}} \right) \cdot \left(\frac{C_{Glu}}{C_{Glu} + K_{Glu}} \right) \cdot \left(1 - e^{\left(-\frac{C_{Sac}}{C_{Sac.min}} \right)} \right) \cdot \left(1 - e^{\left(-\frac{C_{Glu}}{C_{Sac.min}} \right)} \right) \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_{Pm}} \right)$$

Biomasa

$$X \cdot \mu \cdot V_r = \frac{dm_X}{dt}$$

Sustrato

$$-\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/Sac}} \cdot V_r = \frac{dm_{Sac}}{dt}$$

$$-\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/Glu}} \cdot V_r = \frac{dm_{Glu}}{dt}$$

Producto

$$\frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \mu \cdot X \cdot V_r = \frac{dm_P}{dt}$$

3.1.4.2 Corrida *Saccharomyces boulardii*

El modelo para esta corrida se obtuvo a partir de las gráficas experimentales. Como en las gráficas era muy notoria la hidrólisis de la sacarosa fue necesario añadir una constante (K_h) que describiera este fenómeno. Además, se está tomando en cuenta que la glucosa es el azúcar que el microorganismo está usando para su crecimiento y la sacarosa solo la está hidrolizando para la producción de glucosa.

Modelo cinético (Monod Simple)

$$\mu = \mu_m \cdot \left(\frac{C_{Glu}}{C_{Glu} + K_{Glu}} \right)$$

Biomasa

$$X \cdot \mu \cdot V_r = \frac{dm_X}{dt}$$

Sustrato

$$-K_h \cdot C_{sac} \cdot X \cdot V_r = \frac{dm_{Sac}}{dt}$$

$$-\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/Glu}} \cdot V_r + K_h \cdot C_{sac} \cdot X \cdot V_r = \frac{dm_{Glu}}{dt}$$

Producto

$$\frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \mu \cdot X \cdot V_r = \frac{dm_P}{dt}$$

3.2 Comparación de modelos cinéticos de crecimiento de microorganismos

Se realizaron diversas corridas del programa que se tenía modelado en el Software de *MATLAB*® para la obtención de los parámetros cinéticos, a partir de los datos experimentales. Las mejores corridas para cada modelo simulado se tienen en la sección de anexos.

El mejor ajuste que se tuvo para los microorganismos SB fue con el modelo más simple: Monod. En el balance de masa que describe al reactor se tuvo que incluir una variable que representara la hidrólisis de la sacarosa.

Los parámetros calculados se pueden observar en la tabla 3.1, mientras que los datos experimentales y teóricos modelados por el Software en la figura 3.13.

Tabla 3.1 Parámetros cinéticos que describen la cinética de crecimiento de la corrida experimental del reactor tipo lote con el microorganismo *Saccharomyces boulardii*

Modelo Monod				
mumax (1/h)		0.2883		
Ksglu (g/L)		0.0658		
Yxsglu		0.3445		
kh		0.0238		
Variables	Error Promedio	Desv. Error	Correlación	MSR
Biomasa	-1.1965	1.3089	0.9449	9.5017
Sacarosa	-0.1359	0.6054	0.8185	3.1759
Ácido láctico	-0.1188	1.8062	0.9604	50.2614

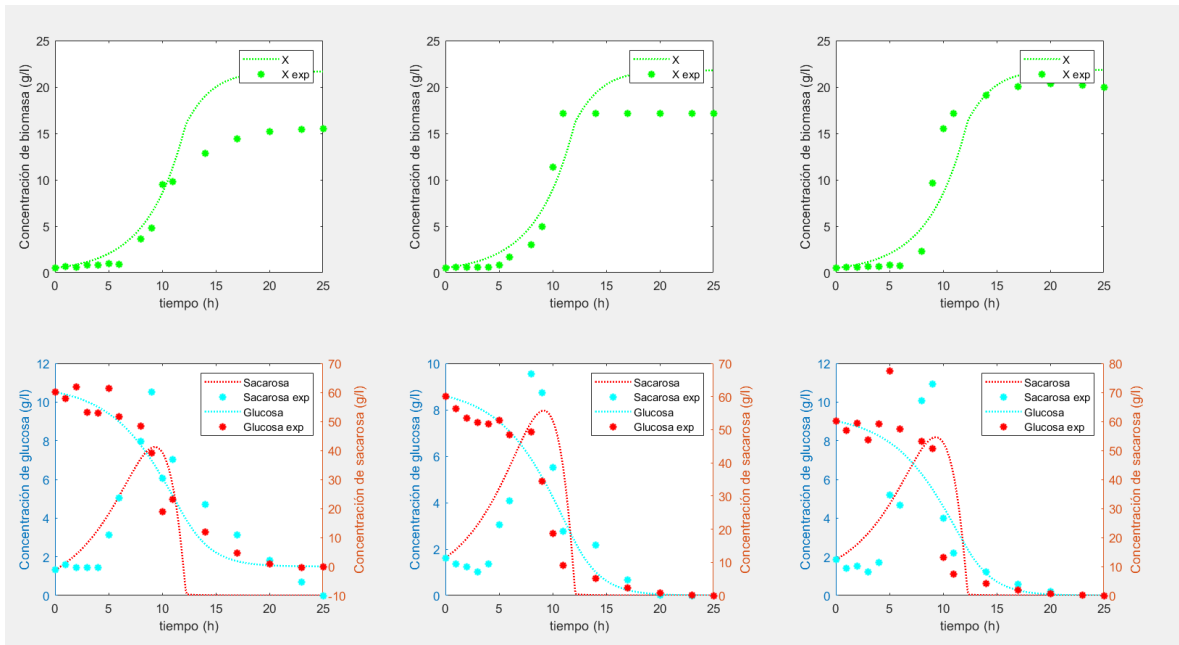


Figura 3.13 Datos experimentales y teóricos modelados con el Software *MATLAB*® para la corrida experimental del reactor tipo lote con el microorganismo *Saccharomyces boulardii*

Para poder tener una curva que describiera los datos de una manera más suavizada entre los tiempos 11 y 25hrs se obtuvo una relación de los datos experimentales con la herramienta del mismo Software llamada “Cftool” y se calcularon 4 puntos adicionales.

Por otro lado, no se encontró un ajuste que representara correctamente los datos experimentales de los microorganismos LR debido a las diferencias que había entre los reactores en las variables de biomasa y glucosa; por lo que se optó por usar el ajuste cinético de un trabajo pasado, estos se muestran en la tabla 3.2 y figura 3.14.

Tabla 3.2 Parámetros cinéticos que describen la cinética de crecimiento de la corrida experimental del reactor tipo lote con el microorganismo *Lactobacillus rhamnosus*

Modelo Ghose y Tyagi			
mumax (1/h)	0.496		
Ksglu (g/L)	0.0085		
Yxsglu	4.85		
Yxssac	3		
Kssac (g/L)	0.0034		
Yxp	4.71		
Pmax (g/L)	8.15		
Sglumin (g/L)	1.75		
Ssacmin (g/L)	1.75		
Variables	Error Promedio	Desv. Error	Correlación
Biomasa	-1.2994	0.4365	0.9502
Sacarosa	1.3157	0.3466	0.9344
Ácido láctico	0.1268	0.0173	0.9665

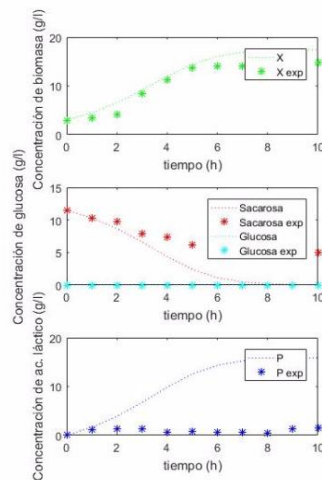


Figura 3.14 Datos experimentales y teóricos modelados con el Software *MATLAB*® para la corrida experimental del reactor tipo lote con el microorganismo *Lactobacillus rhamnosus*

(Mora, 2018)

3.3 Resultados de la corrida experimental del biorreactor multicultivo de tipo lote alimentado para la producción de los microorganismos LR, LP y SB a partir de un reactor continuo con LR y LP y con medio cultivo optimizado

3.3.1 Curvas de calibración del flujo entregado en función de la potencia de las bombas 1, 2 y 3 usadas en la corrida experimental

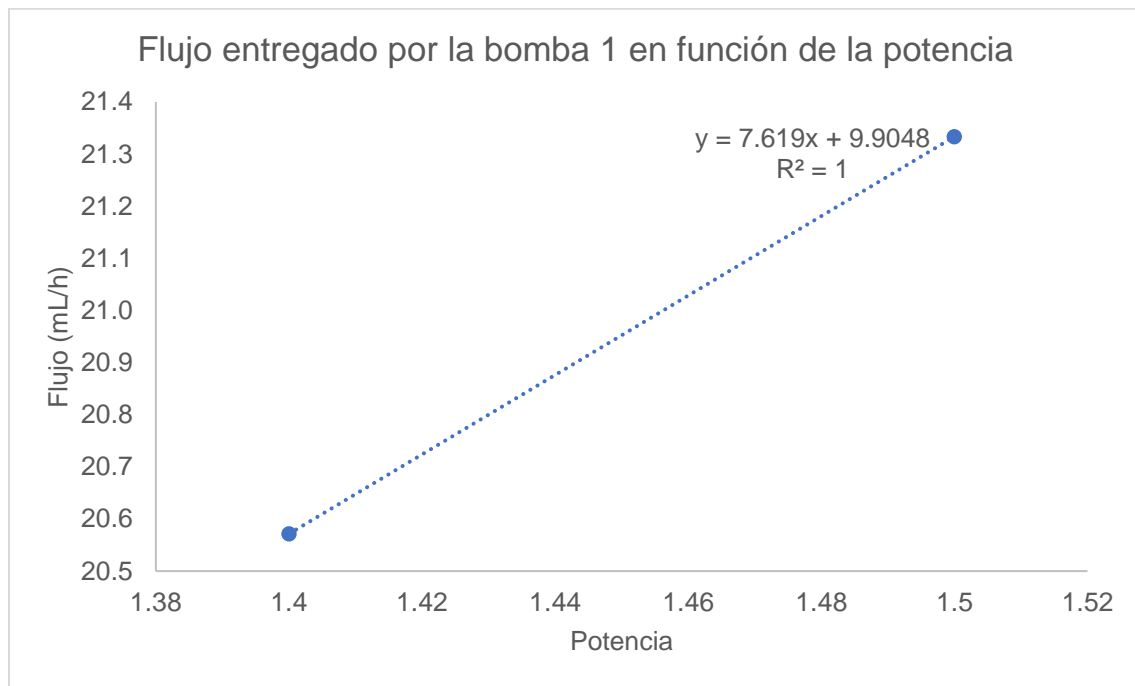


Figura 3.15 Flujo entregado por la bomba 1 en función de su potencia

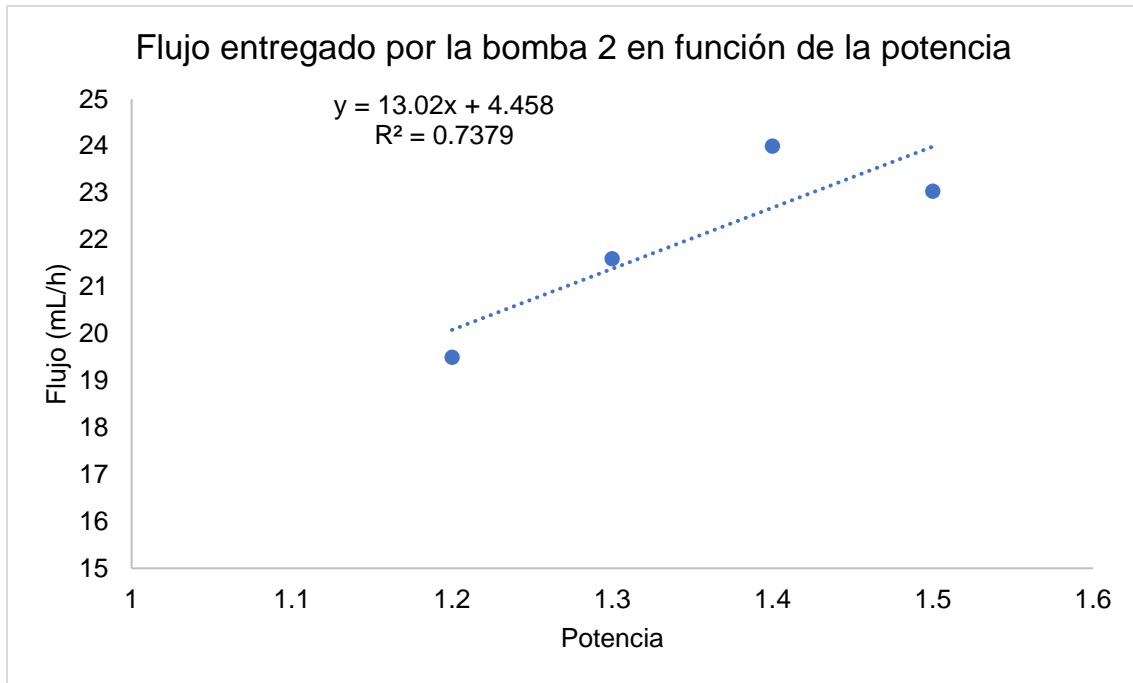


Figura 3.16 Flujo entregado por la bomba 2 en función de su potencia

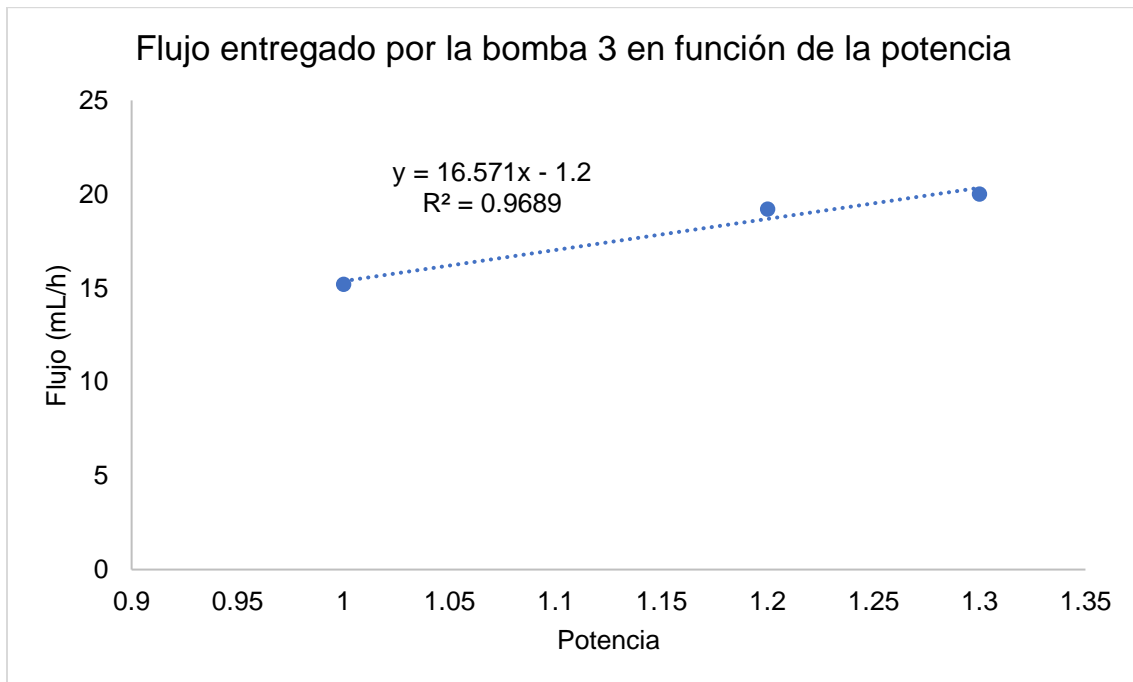


Figura 3.17 Flujo entregado por la bomba 3 en función de su potencia

3.3.2 Curva de estándar de sacarosa por el micrométodo de ácido sulfúrico y UV

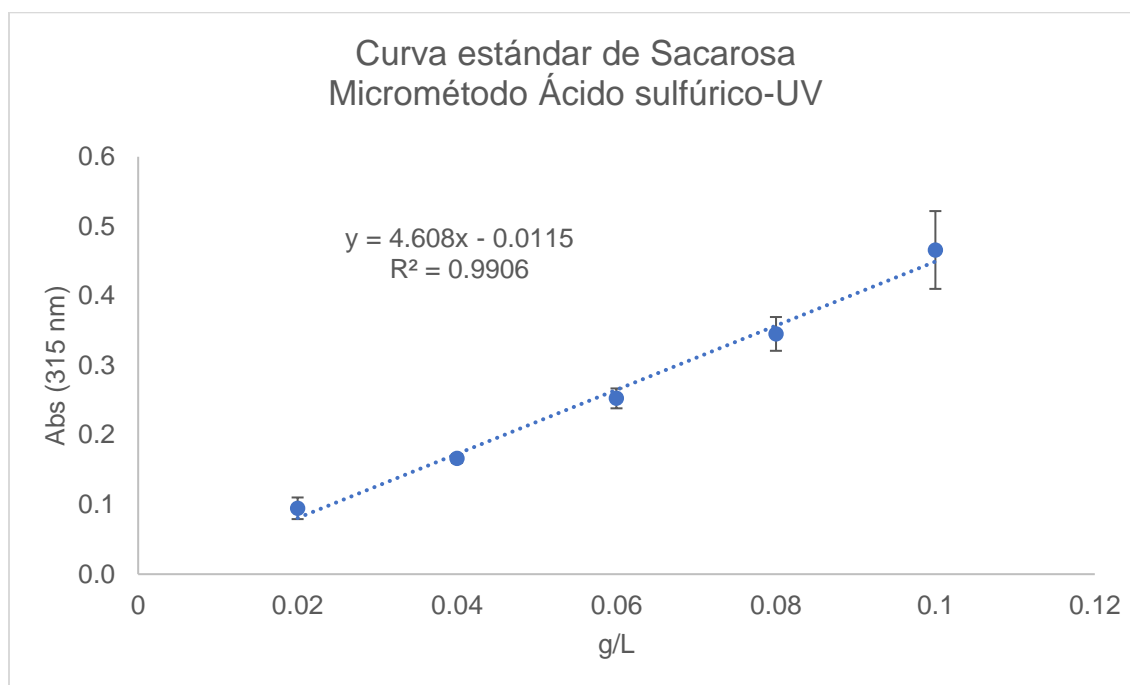


Figura 3.18 Curva estándar de sacarosa por el micrométodo de ácido sulfúrico y UV

3.3.3 Resultados obtenidos para conteo de carbohidratos: glucosa, sacarosa y lactato con el YSI 2900 y microtécnica ácido sulfúrico- UV; y concentración de biomasa para las muestras de los reactores tipo continuo y lote alimentado de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces boulardii*

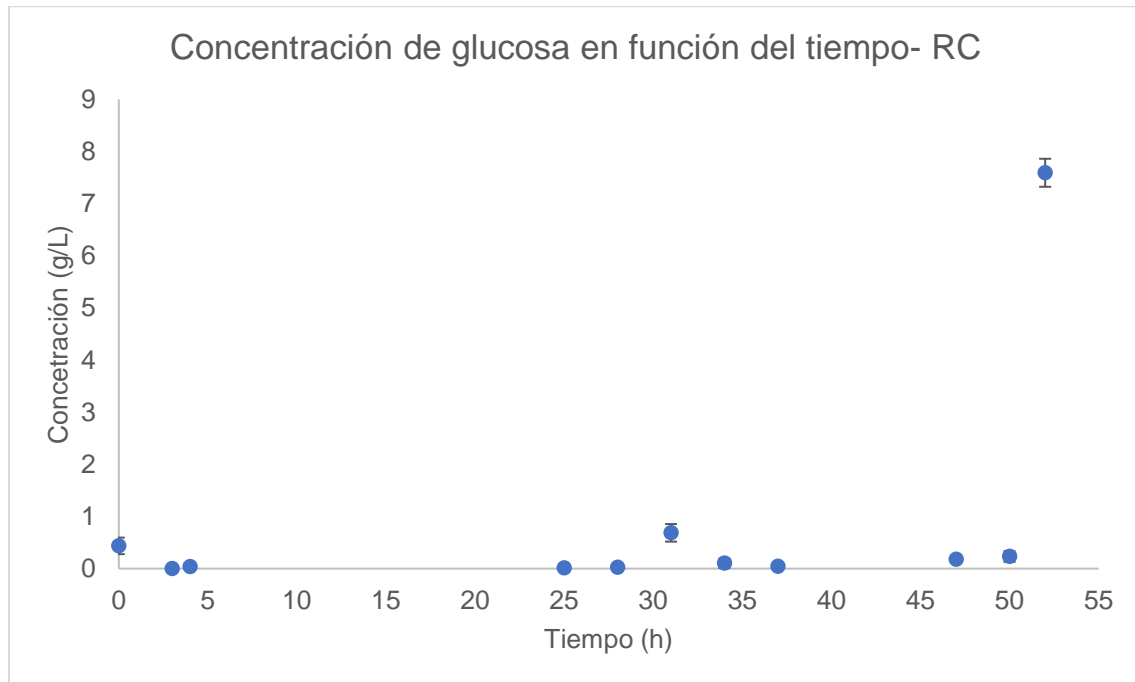


Figura 3.19 Concentración de glucosa en función del tiempo en el reactor continuo para la producción de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*

En general, se observó una concentración muy pequeña, por lo que se piensa que en cuanto entraba una cantidad de glucosa al reactor, esta era usada por los microorganismos LR para su crecimiento celular y producción de lactato.

La concentración inicial es mayor a 0 y comenzó a disminuir inoculado el reactor. El pico de glucosa en el tiempo de 49h se debe a la inyección de medio que se le hizo de 20mL.

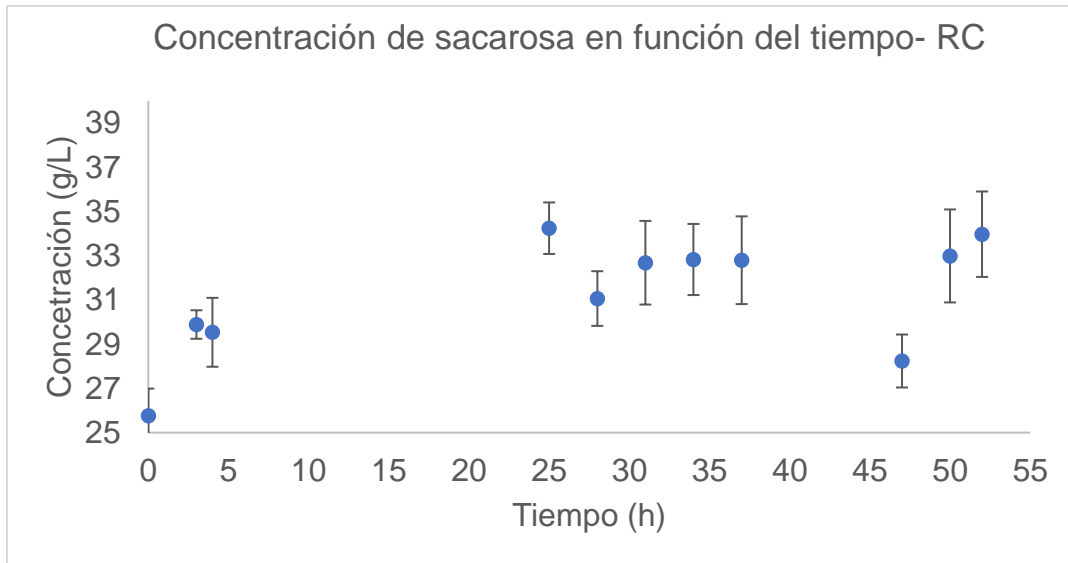


Figura 3.20 Concentración de sacarosa en función del tiempo el reactor continuo para la producción de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*

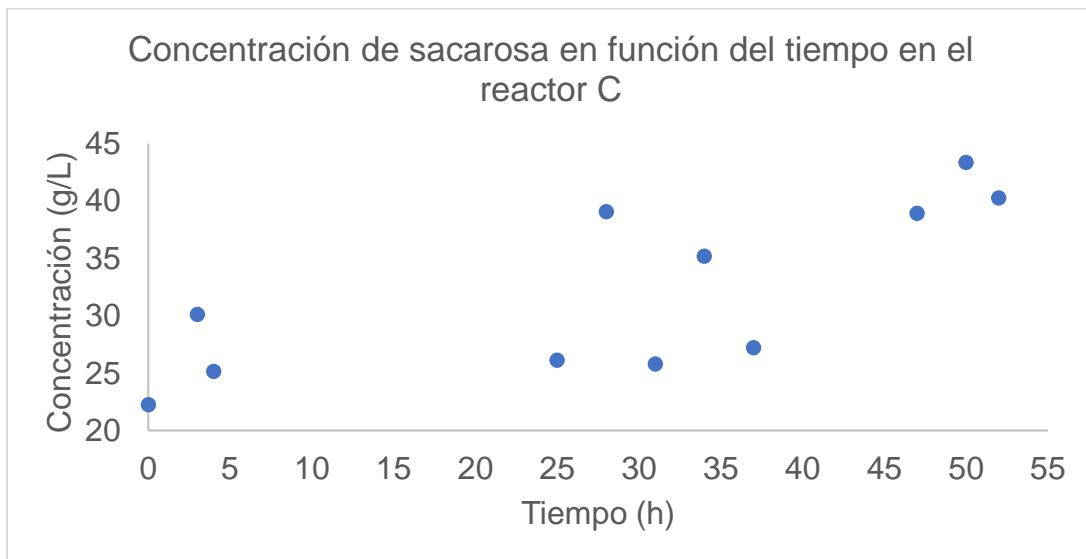


Figura 3.21 Concentración de sacarosa en función del tiempo el reactor continuo para la producción de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*. Medición hecha con microtécnica de ácido sulfúrico-UV.

Las mediciones hechas de la sacarosa por el método de ácido sulfúrico- uv y las medidas con el YSI afirman lo ya mencionado con respecto a la interacción de este carbohidrato y LR; el cual es que no se alimenta de él y no es capaz de hidrolizarlo, ya que no tiene la enzima que, si tiene el SB para hacer este proceso, manteniéndose una concentración relativamente constante a lo largo de la corrida experimental.

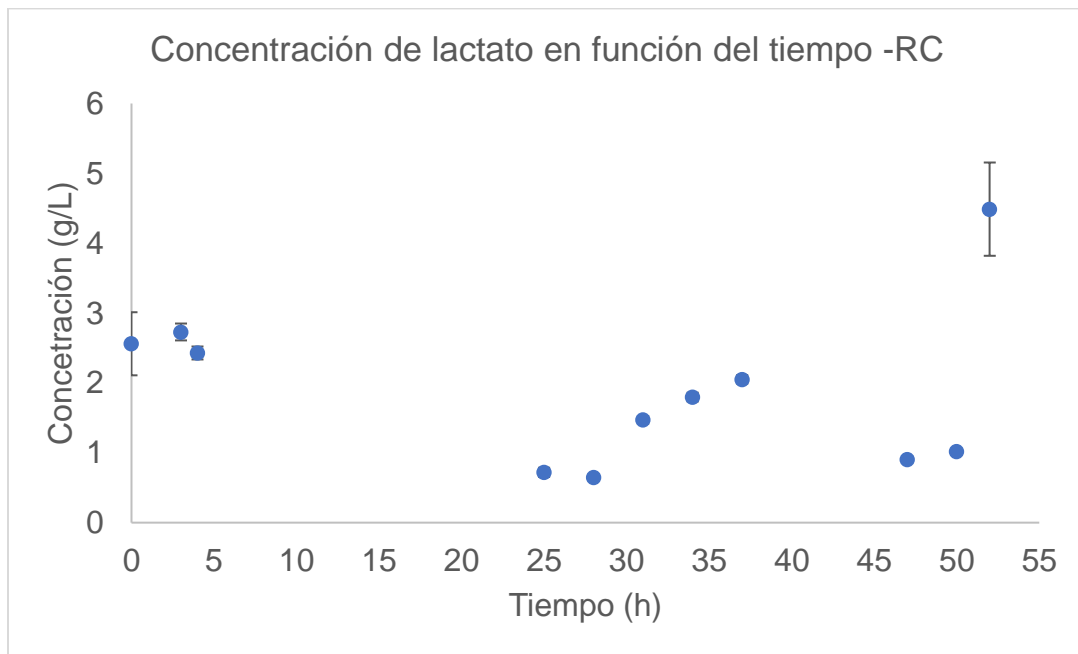


Figura 3.22 Concentración de lactato en función del tiempo el reactor continuo para la producción de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*

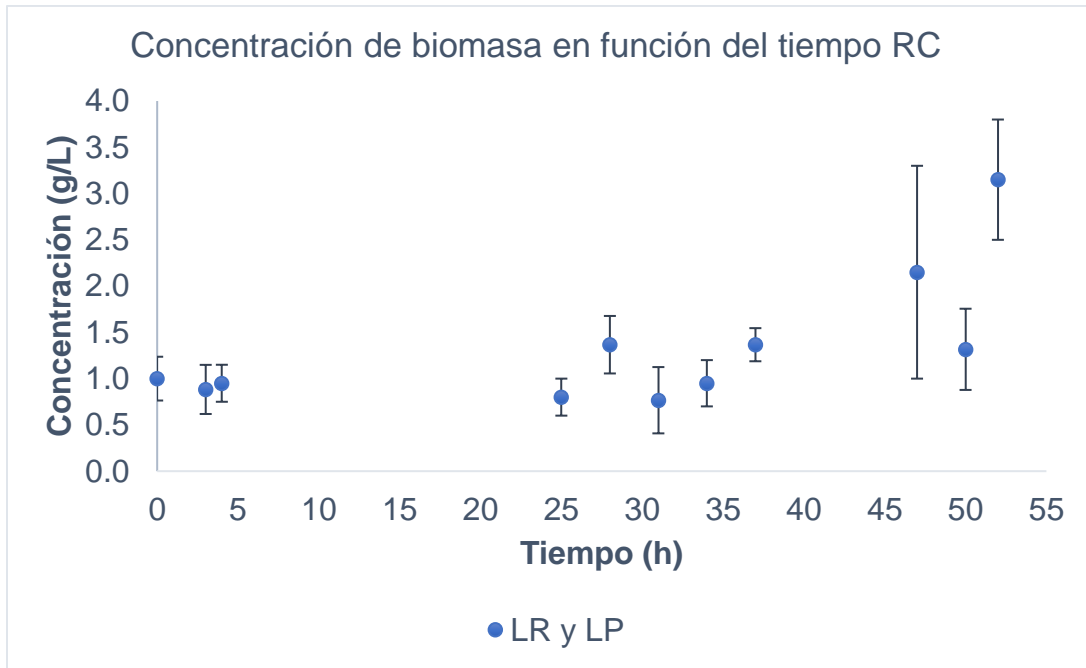


Figura 3.23 Concentración de biomasa en función del tiempo el reactor continuo para la producción de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*

Se observó un comportamiento continuo desde las 3hrs de comenzar la operación del reactor continuo. Por otro lado, el crecimiento celular y producción de lactato se pueden considerar constantes a lo largo de la corrida y presenta variaciones debido a los diversos cambios que se le hicieron a las condiciones de operación. Uno de los cambios hechos fue a la hora 29.

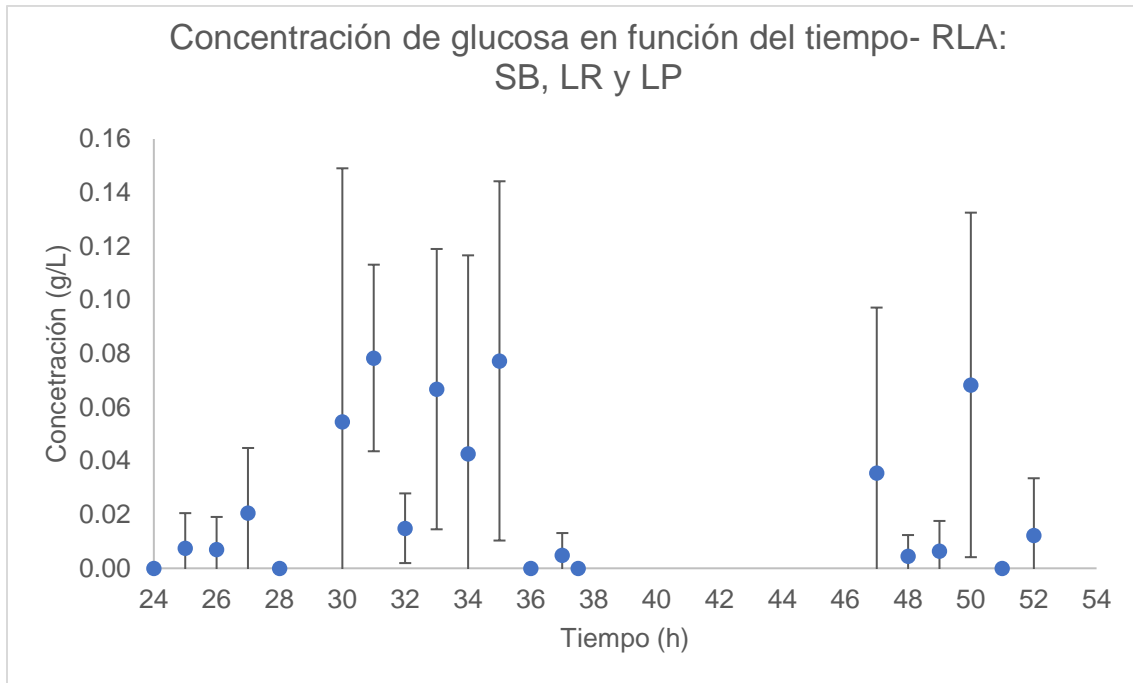


Figura 3.24 Concentración de glucosa en función del tiempo el reactor de lote alimentado para la producción de *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*

Se observa que desde la hora 24 hasta la 29 la cantidad de glucosa era muy baja, debida al flujo de medio MBT que entraba a alimentar el reactor, el cual era de tan solo 20mL/h, no siendo suficiente para alimentar a los microorganismos presentes, originándose la necesidad de aumentar el flujo a 80mL/h, viéndose reflejado en la figura. Otro de los cambios hechos fue el haber agregado 800mL de medio MBT y desconectado la alimentación continua (comportándose como lote desde la hora 37.5 hasta la 47), en donde se le retiró 1L de contenido al reactor, debido a que el antiespumante se había agotado y se volvió a conectar a un flujo de MBT a 23mL/h.

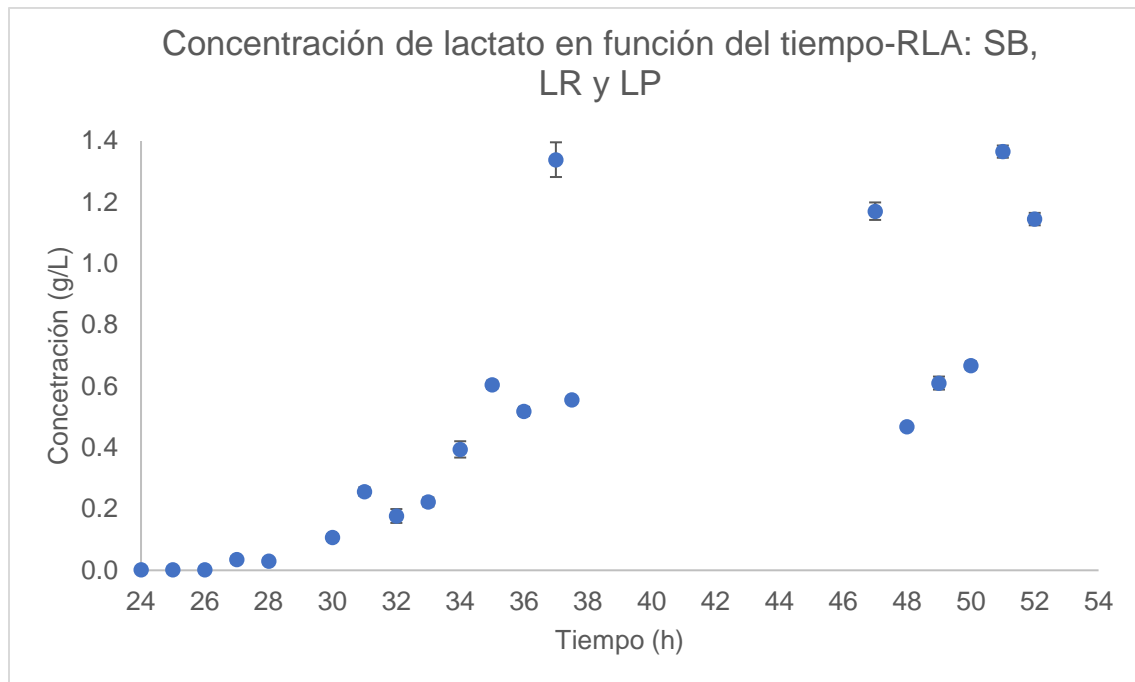


Figura 3.25 Concentración de lactato en función del tiempo el reactor de lote alimentado para la producción de *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*

El lactato registrado coincide con el fenómeno que se presentó en este reactor, en donde la concentración inicial (antes de conectar el microorganismo LR) era de 0g/L y posteriormente fue aumentando, con algunas diferencias de velocidad; siendo una velocidad pequeña en las horas 24-29 y después mayor con el cambio de 20 a 80mL/h de MBT;, con algunas variaciones debidas a los distintos flujos alimentados, mientras que en el tiempo 37.5-47hrs aumentó después de haber disminuido debido a la falta de fuente de carbono.

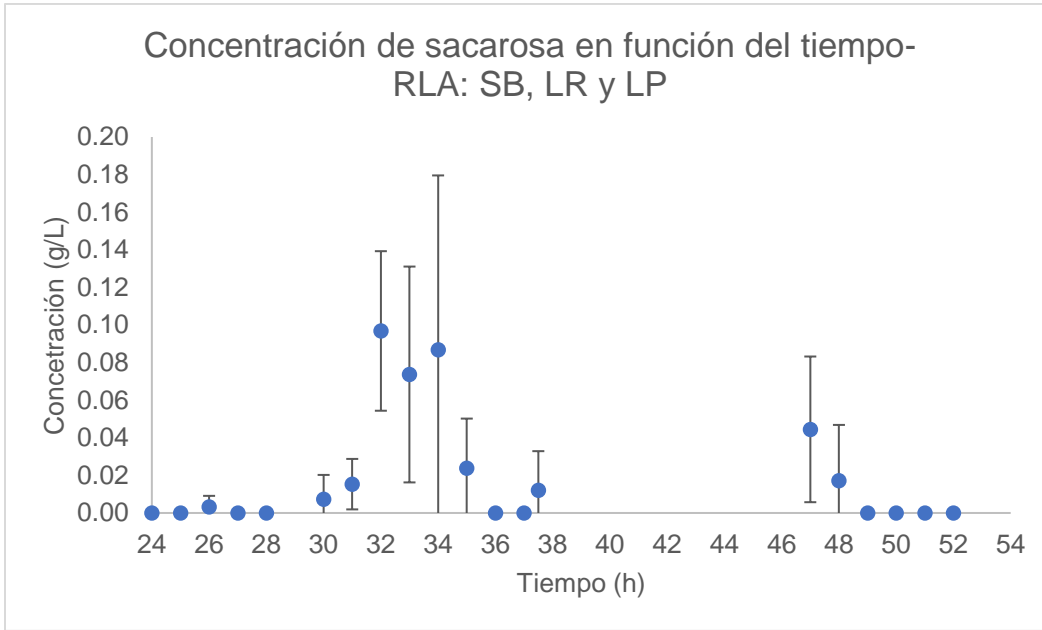


Figura 3.26 Concentración de sacarosa en función del tiempo el reactor de lote alimentado para la producción de *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*

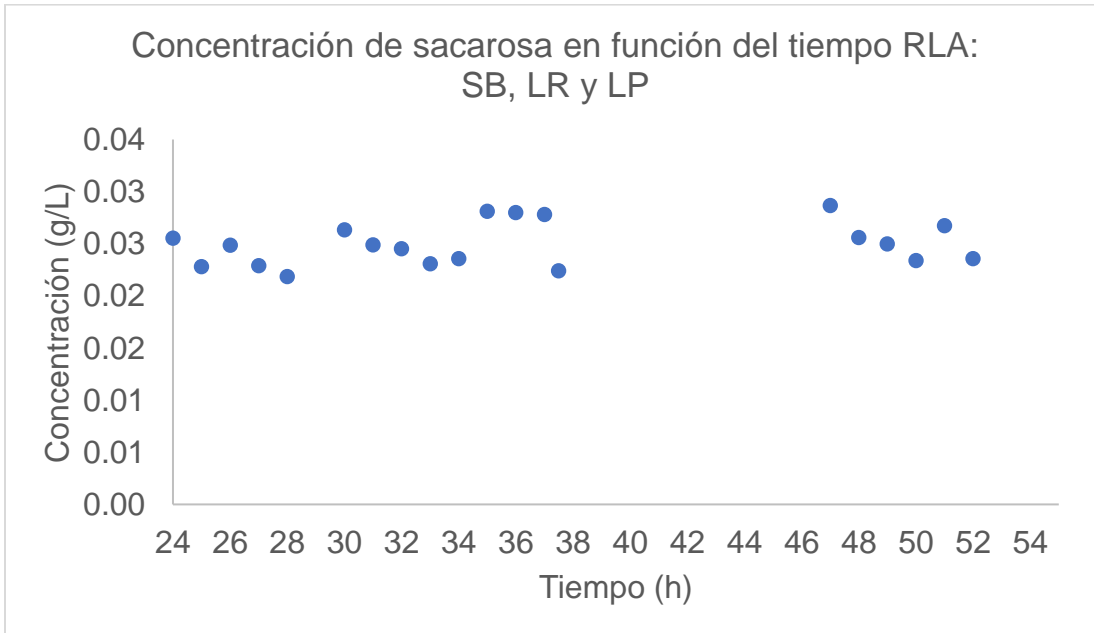


Figura 3.26 Concentración de lactato en función del tiempo el reactor de lote alimentado para la producción de *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*. Medición hecha con microtécnica de ácido sulfúrico-UV.

La concentración de sacarosa se mantuvo casi constante en un valor de 0g/L, debido a que era hidrolizada casi por completo por las levaduras presentes. Cabe mencionar que al conectar los reactores C y LA, este último se encontraba ya en etapa de crecimiento celular estacionaria.

Los puntos de las horas 32-34 son puntos con mucha variación, por lo que no se consideran verdaderos. Desde el tiempo 35hrs el reactor se quedó casi sin alimentación de MBT, por lo que la concentración de sacarosa disminuyó, y volvió a aumentar hasta el agregado del medio al hacer el reactor de tipo lote.

Las diferencias entre los métodos de medición son en este caso considerables, sin embargo, se puede concluir que la concentración en general fue de 0g/L y que por los límites de medición se observan estas variaciones.

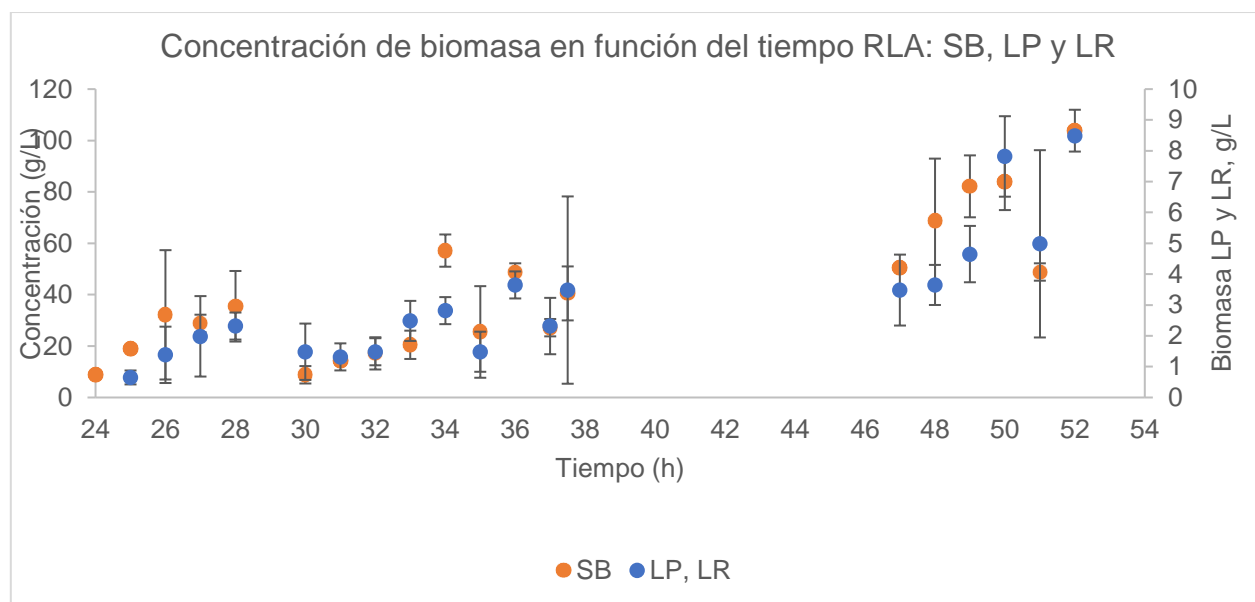


Figura 3.27 Concentración de biomasa en función del tiempo el reactor de lote alimentado para la producción de *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*

Ambos microorganismos siguieron la misma tendencia de crecimiento, mostrando mutualismo entre las tres poblaciones celulares (LR, LP y SB). Se esperaba un comensalismo por lo leído en la literatura, pero tanto para las levaduras como para

los lactobacillus hubo un incremento en su rendimiento, por lo que nos lleva a pensar que los tres microorganismos se vieron beneficiados por su interacción.

Los cambios que hubo en los flujos durante la corrida afectaron al crecimiento celular, estos cambios fueron a las 24, 29, 35, 37.5 y a las 47hrs.

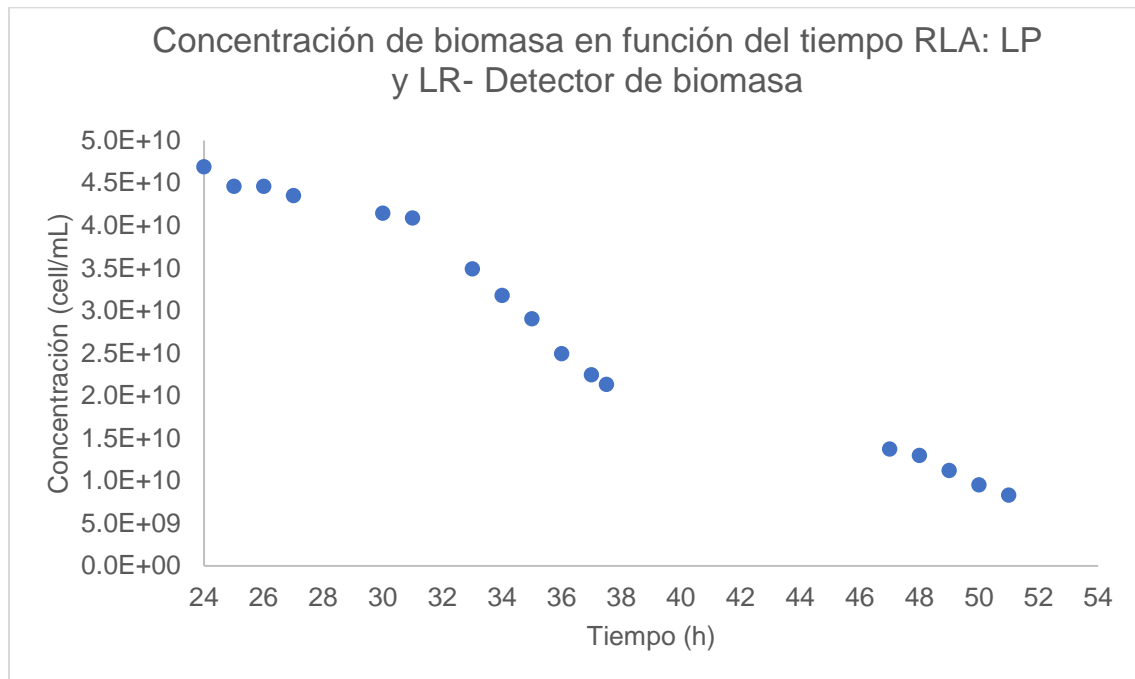


Figura 3.28 Concentración de biomasa en función del tiempo el reactor de lote alimentado para la producción de *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*. Medición hecha con el detector de biomasa

En el caso de nuestro proyecto se observó una variabilidad en el método de medición de biomasa por la medición de la capacitancia del medio ya que, a medida que se observaba el incremento en las células de SB, LB y LR por el método de crecimiento en placa (Pérez, 2014), el medidor presentaba valores decrecientes. Por ello, se consideró primero que a variabilidad en las mediciones del equipo se presentaban debido a la presencia de ácido láctico como producto de crecimiento de LB y LR (Arnoux, 2005); sin embargo, se observó que la cantidad de ácido presente es despreciable respecto al volumen total de la fermentación. En segundo

caso se consideró que la presencia de la disolución buffer (NaOH 5M) podía influir considerándose un electrolito fuerte que podría alterar los valores de conductividad en el medio causando que los valores de capacitancia se vieran alterados (TLee, 1999); esta hipótesis también se descartó al observar que la solución buffer se añadía en pulsos, los cuales no se ven reflejados en los datos. Por último se analizó el funcionamiento del equipo y se observó que la presencia de los *Lactobacillus* genera una distorsión directa en las mediciones de capacitancia al cambiar totalmente las condiciones conocidas ya que la curva de calibración que genera el factor con el cual se calculan los g/L de células viables (Arnoux,2005), no se realizaron en las condiciones reales del experimento ya que se añadió la participación de los *Lactobacillus*, la presencia del ácido láctico producto de su crecimiento y la adición de la solución buffer para controlar el pH del reactor, esto resulta en un cambio en las condiciones primordiales del equipo ya que, al añadir un nuevo microorganismo se deben analizar los cambios físicos tales como el área de intercambio. Para ello se observó que las células de SB son considerablemente más grandes que las de LR y LB lo cual primero hizo pensar que serían valores despreciables en el cálculo, sin embargo, cuando se observó que la cantidad de células de LB y LR presentes es bastante alta, el área total de intercambio sería considerable respecto a la de las células de SB únicamente, además de que la capacitancia se ve modificada exponencialmente con respecto a áreas esféricas (Ciureanu, 1997). Por último, se observó que la participación de los LB y LR en el reactor también modifican los valores al presentar diferentes mecanismos de membrana que pueden alterar notablemente los valores obtenidos. Con ello se concluyó que un multicultivo no puede ser cuantificado con exactitud con este equipo considerando las múltiples variables que se encuentran en el sistema además de la importancia que representan en los cálculos finales. Por ello se considerará más fiable la cuantificación obtenida por la técnica de dilución y conteo en placa (Pérez, 2014).

3.3.4 Fotos de los microorganismos

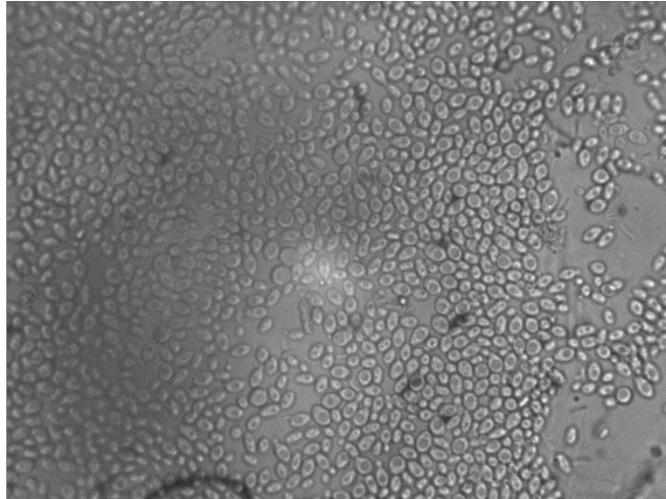


Figura 3.27 Reactor lote alimentado, T24
Saccharomyces boulardii
Diámetro promedio: 6.8 μm

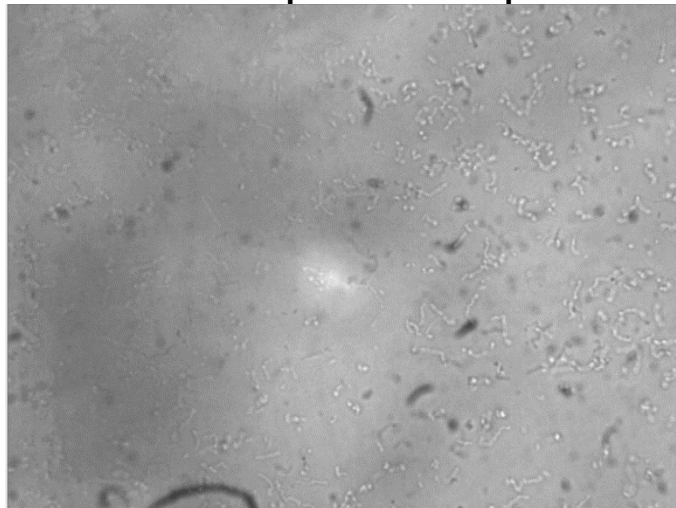


Figura 3.28 40X Reactor Continuo, T34
Lactobacillus plantarum y *Lactobacillus rhamnosus*
Longitud promedio: 6.11 μm ; Ancho promedio: 0.689 μm

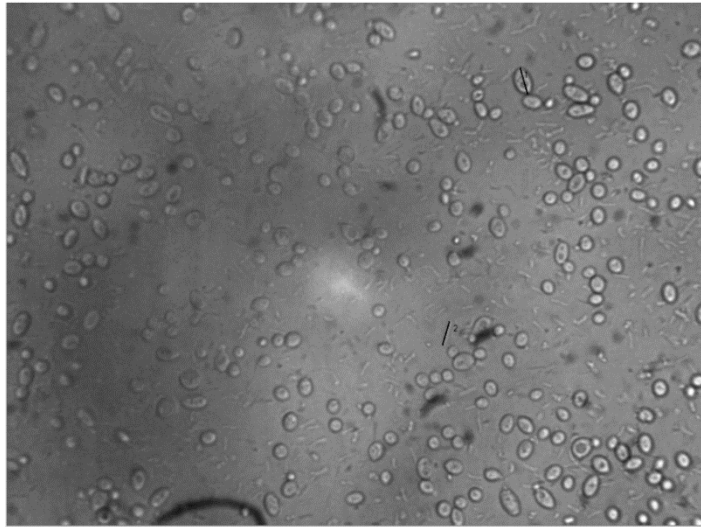


Figura 3.29 40X, Reactor Lote Alimentado, T47
Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus

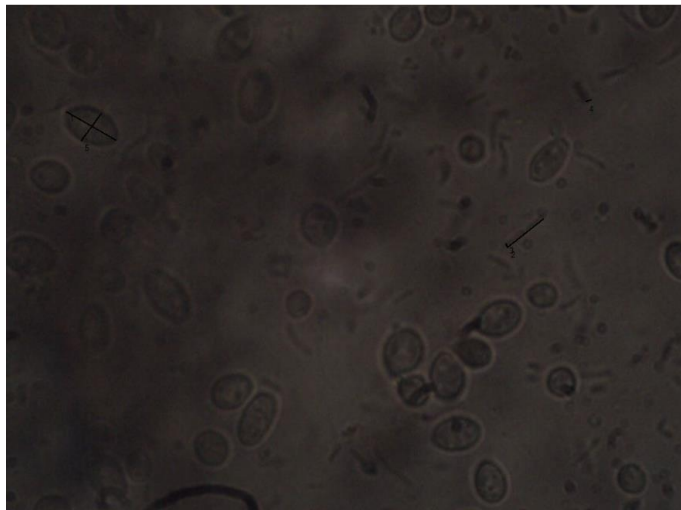


Figura 3.30 100X, Reactor Lote Alimentado, T47
Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus

3.3.5 Modelos matemáticos que describen el proceso de producción de LR, LP y SB en el sistema compuesto por un reactor continuo y un lote alimentado co-cultivo.

3.3.5.1 Reactor continuo con LR y LP

Al ser un reactor continuo se tomó en cuenta la entrada del medio y la salida de los lactobacillus, que era la entrada del reactor alimentado. En ambas ecuaciones para sustrato (Sustrato y glucosa) se consideró el consumo de estos azúcares por parte de los lactobacillus.

Biomasa

$$F_{out} \cdot X_{lac,RC} + \mu_{lac} \cdot X_{lac} \cdot V_{RC} = \frac{dm_{X_{lac}}}{dt}$$

Producto

$$-F_{out} \cdot P_{RC} + \frac{1}{Y_{X_{lac}/P}} \cdot \mu_{lac} \cdot X_{lac} \cdot V_{RC} = \frac{dm_p}{dt}$$

Sustrato

$$F_{in,MBT} \cdot S_{in,MBT,sac} - F_{out} \cdot S_{sac,RC} - \frac{1}{Y_{X_{lac}/S_{sac}}} \cdot \mu_{lac} \cdot X_{lac} \cdot V_{RC} = \frac{dm_{sac}}{dt}$$

$$F_{in,MBT} \cdot S_{in,MBT,glu} - F_{out} \cdot S_{glu,RC} - \frac{1}{Y_{X_{lac}/S_{glu}}} \cdot \mu_{lac} \cdot X_{lac} \cdot V_{RC} = \frac{dm_{glu}}{dt}$$

Volumen Reactor

$$F_{in,MBT} - F_{out} = \frac{dV_{RC}}{dt}$$

3.3.5.2 Reactor lote alimentado con LR, LP y SB

El reactor alimentado tenía dos entradas; medio MBT (del reservorio) y lactobacillus (proveniente del reactor continuo). Se tomó en cuenta el crecimiento de ambos microorganismos en el reactor más lo que se estaba agregando del reactor continuo.

Para el balance de masa del producto se considera la entrada de producto del reactor continuo y lo que está produciendo el lactobacillus en el reactor alimentado.

Los balances de masa de los sustratos consideran la entrada del medio MBT pero también la cantidad de sustrato que está entrando a partir del reactor continuo donde crecen los lactobacillus. Para el balance específico de sacarosa se agrega el gasto de esta especie por la hidrólisis, y por la alimentación los lactobacillus. Por otro lado, el balance de masa de glucosa considera que se está produciendo por la hidrólisis de sacarosa y el gasto por alimentación de todos los cultivos.

Biomasa

$$\mu_{lev} \cdot X_{lev,R} \cdot V_R = \frac{dm_{X,lev}}{dt}$$

$$F_{in} \cdot X_{lac,in} + \mu_{lac} \cdot X_{lac,R} \cdot V_R = \frac{dm_{X,lac}}{dt}$$

Producto

$$F_{in} \cdot P_{in} + \frac{1}{Y_{Xlac/P}} \cdot \mu_{lac} \cdot X_{lac,R} \cdot V_R = \frac{dm_P}{dt}$$

Sustrato

$$F_{in,MBT} \cdot S_{sac,MBT} + F_{in} \cdot S_{sac,in} - \frac{1}{\frac{Y_{Xlac}}{S_{sac}}} \cdot \mu_{lac} \cdot X_{lac} \cdot V_R - Kh \cdot S_{sac,R} \cdot V_R = \frac{dm_{S,sac}}{dt}$$

$$F_{in,MBT} \cdot S_{glu,MBT} + F_{in} \cdot S_{glu,in} - \frac{1}{\frac{Y_{Xlac}}{S_{glu}}} \cdot \mu_{lac} \cdot X_{lac} \cdot V_R - \frac{1}{\frac{Y_{Xlev}}{S_{glu}}} \cdot \mu_{lev} \cdot X_{lev} \cdot V_R + Kh \cdot S_{glu,R} \cdot V_R = \frac{dm_{S,glu}}{dt}$$

Volumen Reactor

$$F_{in} + F_{in,MBT} = \frac{dV_R}{dt}$$

3.4 Comparación del modelo de producción simulado con MATLAB y datos experimentales

Se hicieron simulaciones en Matlab usando los modelos de la sección 3.3.5 para verificar que los datos experimentales se ajustaran a este modelo.

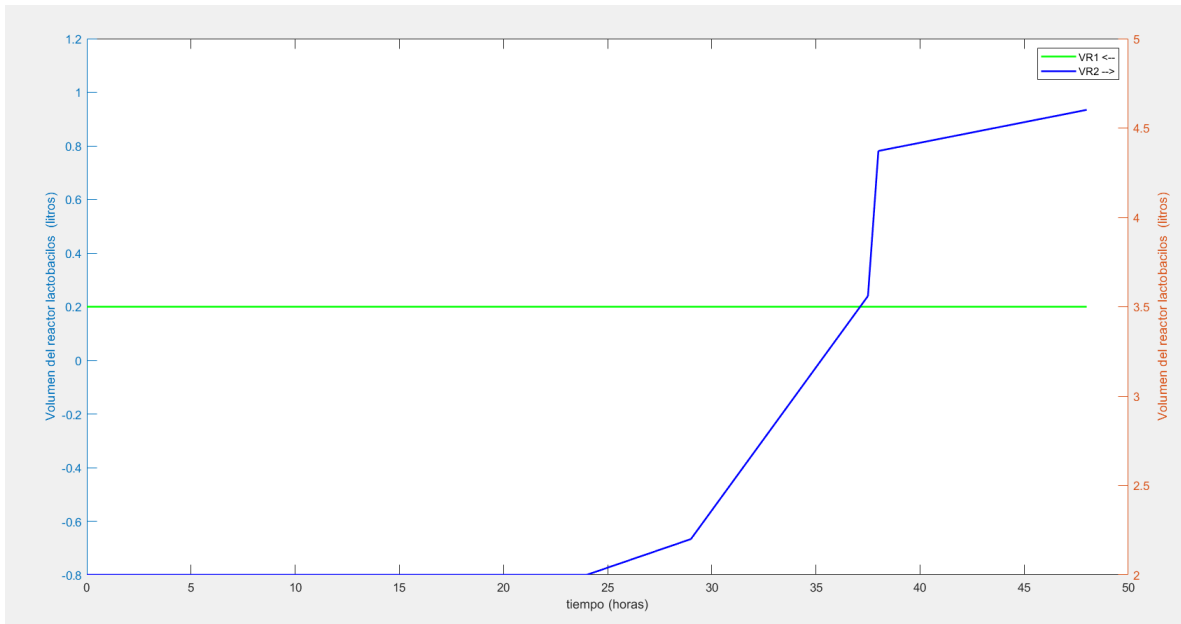


Figura 3.31 Simulación de los volúmenes de reactores, donde VR1 es el volumen del reactor continuo y VR2 el volumen del reactor alimentado.

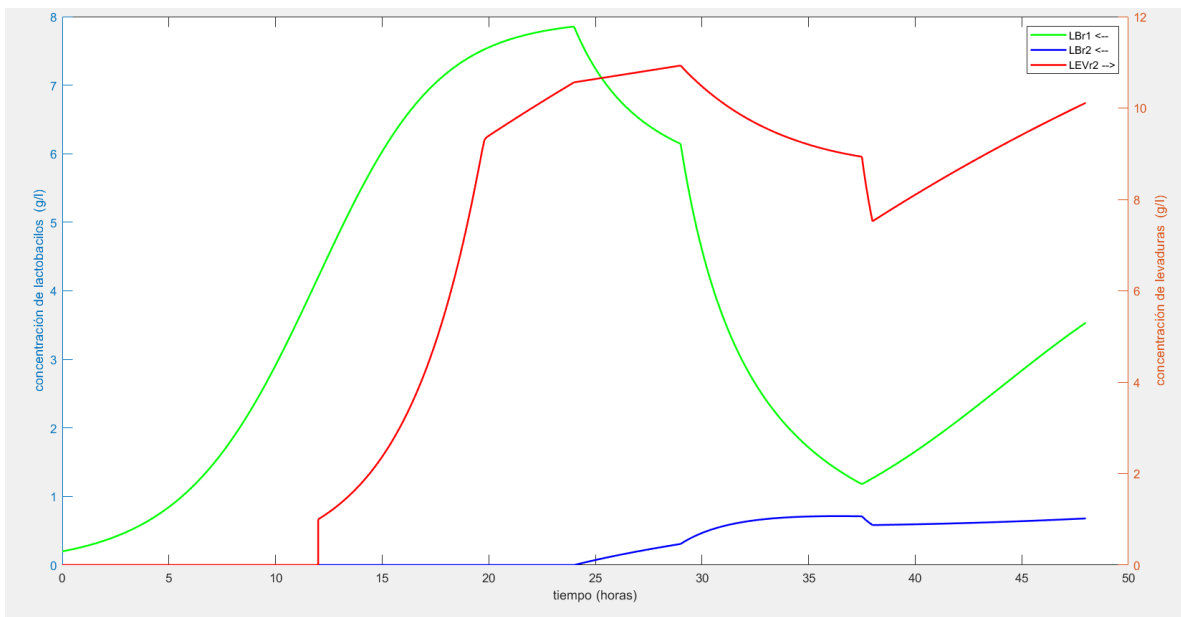


Figura 3.32 Simulación del crecimiento celular, donde LBr1 es la concentración de lactobacillus en el reactor continuo, LBr2 la concentración de lactobacillus en el reactor alimentado y LEVr2 la concentración de levaduras en reactor alimentado.

La biomasa que se observa en el modelo obtenido por Matlab (figura 3.32) no se parece a lo obtenido en laboratorio. Las concentraciones obtenidas experimentalmente fueron mucho más altas para ambos microorganismos en el lote alimentado y para lactobacillus en el reactor continuo.

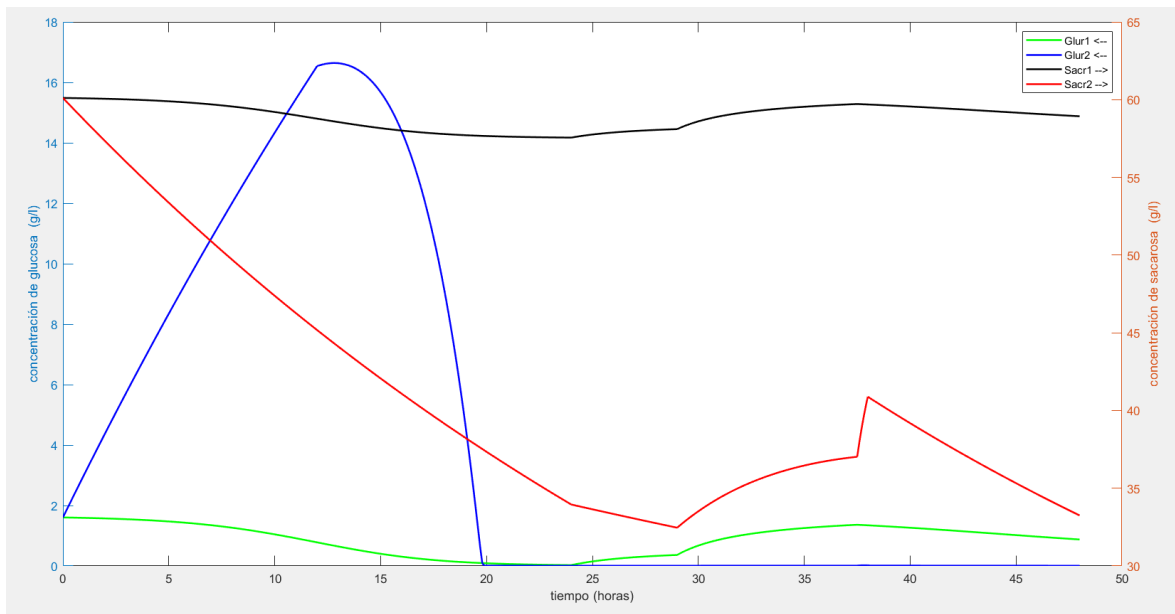


Figura 3.33 Simulación del comportamiento de sustrato en el sistema, donde Glur1 y Sacr1 son las concentraciones de glucosa y sacarosa en el reactor continuo y Glur2 y Sacr2 son las concentraciones de glucosa y sacarosa en el reactor alimentado.

En general los gráficos del modelo no describieron lo que realmente sucedió en la corrida, esto se puede deber a la cantidad de variaciones que se presentaron durante la práctica, como los cambios de flujos, la manguera que se desconectó por la cantidad de fibras que se atoraban en la entrada del reactor, la interrupción de lote alimentado, la desconexión de la bomba de alimentación del reactor continuo, entre otras complicaciones que se presentaron por la misma complejidad del experimento.

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

- Aprendizajes profesionales

Patricia del Carmen Vergara Rodríguez

Durante el desarrollo del PAP se vieron aplicados mayoritariamente los aprendizajes de las materias probabilidad y estadística, bioquímica, cinética química y biológica, reactores químicos, programación, hablando de manera profesional. Debido a que no se tenían desarrolladas las habilidades de microbiología, se pidió la ayuda constante a los asesores, pudiendo, gracias a ellos, haber logrado con los objetivos que involucraban estos conocimientos.

Por primera vez, vi el cómo un proyecto real involucra la aplicación de todas las herramientas que aprendes durante tu formación; de como el sistema de educación ha sido modificado para bien, logrando que cada vez más los profesionales logren trabajar en áreas que no serían típicas para sus profesiones.

Al leer bibliografía para comprender más del tema, relacioné algunos de los fenómenos bioquímicos que ocurren en el cuerpo humano y que pueden provocar enfermedades crónico-degenerativas; pero que es lo que comes o lo que haces lo que puede hacer una gran diferencia.

Ana Elisa Carranza Volquarts

Para esta segunda parte del proyecto esperaba adquirir más aprendizaje en distintas técnicas sin embargo fue un proyecto en el cuál apliqué más los aprendizajes que ya tenía. Primero por los adquiridos en el proyecto anterior donde adquirí técnicas concretas del área de microbiología y biotecnología, por otro lado, apliqué conceptos de la materia de reactores al desarrollar y aplicar las fórmulas de balances para las simulaciones. Por otra parte, es interesante analizar la posibilidad de que la mejora en las condiciones de producción de los

microorganismos pueda repercutir en una viabilidad en la producción que, a su vez, permita que sea distribuido en más sectores y en realidad generar un cambio social real que tenga un impacto cuantificable tal vez en algunos años. Me pareció muy interesante trabajar en un proyecto interdisciplinario que, aunque no observábamos directamente el trabajo de las otras carreras, si me permitió ver cómo se desarrollan proyectos en el ámbito de las mismas desde su planeación hasta su ejecución además de permitirme aprender de mis compañeros de biotecnología y alimentos que compartieron sus conocimientos en las técnicas, sus artículos e incluso su material para el fin global del proyecto.

Espero que los aprendizajes no se queden aquí y se puedan abrir más espacios para compartirlos entre la comunidad tanto dentro como fuera de la Universidad y que esto nos permita perderle un poco el miedo a los ingenieros químicos a estudiar aquellas reacciones y procesos que implican seres vivos que, a fin de cuentas, son las tecnologías del futuro.

Ana Martínez Negrete Vera

Durante esta experiencia PAP los aprendizajes profesionales que desarrollé fueron principalmente relacionar los resultados obtenidos en laboratorio con lo reportado en la literatura, para lograr obtener un modelo que simule de manera acertada lo que está sucediendo y así poder optimizar el proceso deseado. Como ingeniero químico siempre es importante buscar la optimización para mejorar rendimientos y minimizar costos, por lo que esta experiencia nos da una idea clara de cómo ponerlo en práctica.

Los conocimientos de materias como reactores y cinética fueron necesarios, así como cierta noción de Matlab. Sin estos conocimientos

Así mismo, fueron muchas horas en laboratorio que me permitieron aprender técnicas valiosas que no las pude haber aprendido en otro proyecto PAP.

Otra habilidad desarrollada importante fue saber darle seguimiento a un proyecto, desde determinar los objetivos generales y específicos hasta realizar todas las actividades individuales que son necesarias para llegar a cumplir con los objetivos en tiempo y en forma.

- **Aprendizajes sociales**

Es el espíritu jesuita el que es testigo del beneficio hacia la sociedad optimizando el proceso de producción de algo que puede prevenir enfermedades crónico-degenerativas. Una buena manera de comenzar un proyecto innovador es identificar el problema latente no satisfecho de un nicho de población, al cual puedas colaborar como profesional.

El seguimiento tiene que ser proponiéndote metas fijas no muy ambiciosas, sabiendo que pueden ocurrir percances que retrasen tus avances; pero siempre viendo de manera positiva lo logrado. Son vitales las juntas con las personas que están involucradas en el proyecto, ocasionando un flujo de información constante.

El proyecto tiene aún mucho por avanzar, pudiendo haber logrado un paso más, desde donde se continuo, para alcanzar la meta de la producción industrial de microorganismos que generen bienestar social y económico.

- **Aprendizajes éticos**

Patricia del Carmen Vergara Rodríguez

Las decisiones tomadas a lo largo del desarrollo del PAP fueron basados en el bienestar común, teniendo que, muchas veces ceder para avanzar; con honestidad, puntualidad y responsabilidad.

La experiencia vivida me invita a ser más ordenada, perspicaz, paciente y poder estar más en un estado de flujo; a saber expresar.

Ana Elisa Carranza Volquarts

Durante este proyecto adquirí incontables conocimientos técnicos que fueron utilizados en la búsqueda de soluciones para problemas sociales, también se analizaron las repercusiones que pueden llegar a tener estos conocimientos que no serían favorables y cómo evitarlas. Por último se establecieron normas de convivencia para el equipo que nos permitieron aprender y aprovechar al máximo de las habilidades y aptitudes de cada uno de los integrantes lo cual me llevó a aprender a trabajar y participar en equipos conformados por mujeres, para mí esta fue una experiencia enormemente enriquecedora que me enseñó a ser más cuidadosa al escuchar, más atenta, más ordenada y más clara en mis formas de referirme y a cuidar, sobre todo, la forma en la cual me relaciono tanto dentro como fuera de los proyectos con mis congéneres.

Ana Martínez Negrete Vera

Las decisiones tomadas a lo largo del proyecto fueron siempre basadas en el respeto, honestidad y responsabilidad que sentíamos por el proyecto. Siempre buscamos reportar los datos reales, por más feos y confusos que estuvieran. De hecho, estos datos nos llevaron a investigar en la literatura una explicación lógica y nos hizo darnos cuenta que nuestros resultados sí tenían sentido físico.

- Aprendizajes en lo personal

Patricia del Carmen Vergara Rodríguez

Considero de manera personal de gran importancia el poder relacionar mi carrera, que es la ingeniería química con un tema de interés, como es la prevención de enfermedades crónico-degenerativas; ya que creo, es importante, tener una motivación latente, algo que te mueva emocionalmente, así como conocimiento del contexto del problema que hay en la sociedad para aterrizar lo

que se sabe en un proyecto como lo es el PAP Microbiota y proponer soluciones o una manera de prevenirlo.

Fui testigo de cómo para que se tengan resultados en un proyecto tiene que existir automotivación, tenacidad, inteligencia emocional y social. Apliqué los conocimientos adquiridos en la materia de inteligencia emocional para poder mejorar la comunicación de mi parte con el grupo: técnica X, Y, Z; por otro lado, el entrar en un estado de flujo, aprendiendo a dejar que las cosas pasen para que no exista frustración por percances que retrasan las metas del proyecto.

A mi punto de vista, los ingenieros somos muy buenos para analizar datos y concluir a partir de ellos, pero somos pésimos comunicando, siendo este uno de los mayores problemas que identifiqué a lo largo el trabajo PAP. Es muy importante el aprender a trabajar con las personas, no solo con máquinas y datos, esta es una de las herramientas que puede marcar una diferencia importante; dejar todas las cosas platicadas por escrito para evitar tergiversar información.

Siguiendo con el tema de mi proyecto de vida, descubrí un interés en la investigación del que no tenía tanto conocimiento en mí; así como reafirmé mi gusto hacia temas biotecnológicos relacionados con salud.

Ana Elisa Carranza Volquarts.

La primera parte de este proyecto me pareció muy interesante ya que adquirí mucho conocimiento y experiencia en un mundo de las ciencias que me parecía muy interesante, sin embargo, me era bastante ajeno. En esta segunda parte el aprendizaje fue más global, además de adquirir más experiencia en el manejo de los equipos y de técnicas bioquímicas, adquirí conocimientos interpersonales que son invaluable para mi experiencia laboral.

Durante los últimos 7 años he trabajado en distintas industrias en las cuales he tenido compañeros, sin embargo, nunca había tenido compañeras de mi edad ni

de mí misma carrera. Este semestre me encontré con la disyuntiva de no saber cómo conducirme ni comunicarme correctamente con mi equipo lo cual me causaba un enorme conflicto tanto personal como referente al proyecto, por ello, y con ayuda de los profesores, tuve que re-aprender a manejarme. Para mí este es el aprendizaje más importante que tuve ya que, a pesar de que tengo claro qué es lo que quiero seguir estudiando y la industria a la cual me dirijo, es imperante que aprenda a comunicarme adecuadamente, que estructure mejor mis horarios y que pueda jerarquizar mis actividades adecuadamente. También aprendí a escuchar de una forma diferente, no solamente los tecnicismos, sino las emociones y el cómo se sienten mis compañeros para hacer un espacio de trabajo más ameno y eficiente. Por último, me llevo una lección sobre cómo conducirme con las demás personas, a ser más cuidadosa en mis formas y empática al dirigirme hacia mi equipo de trabajo.

Ana Martínez Negrete Vera

Lo que me llevo de este proyecto PAP es que el trabajo en equipo no es siempre lo que se espera, a veces puede representar un reto en vez de facilitar la carga de trabajo. Aprendí que: todos los miembros del equipo deben de aportar al proyecto porque todos buscan los mismos objetivos, que es importante mantener un ambiente de confianza para poder hacer y recibir críticas constructivas de una manera respetuosa y poder aprender de ellas, que es necesario ser claro en todo momento para que no se malinterpreten los mensajes, que cada persona es diferente y tiene su propio ritmo y manera de trabajar, hacer el trabajo por los demás perjudica más que ayudar y es mejor no tomarse personal lo que dicen los demás.

Así mismo, el trabajo en equipo nos enseña mucho sobre nosotros, ya que refleja áreas de mejora y dice mucho sobre nuestra capacidad de interactuar con personas que tienen maneras distintas de pensar y trabajar a las nuestras.

Otro factor importante es la automotivación, mientras más motivado te sientas vas a ser más productivo, pero es muy fácil perder motivación si hay algún tope en el camino y es muy difícil volver a recuperar esta motivación.

Este proyecto fue muy demandante en horas de trabajo, no solo en laboratorio, también fue mucho tiempo de investigación y de pruebas con Matlab. No hubiera sido posible que una sola persona hubiera llegado a cumplir con los objetivos propuestos en la misma cantidad de tiempo por lo que el trabajo en equipo fue necesario.

Al final de todo quedo contenta y satisfecha con lo logrado durante este semestre, se superaron todos los retos que se presentaron y no queda más que agradecer la oportunidad que significó ser parte de este proyecto PAP.

5. Conclusiones

Se cumplió el primer objetivo específico, el cual era lograr un ajuste cinético para los microorganismos, sin embargo, el ajuste alcanzado para LR no cumplió con las expectativas, debido a que la formulación del medio para esa corrida no fue el adecuado. Se usaron datos cinéticos de trabajos previos. Esto sirvió de preámbulo para concluir que el medio optimizado era el correcto para provocar una buena producción de biomasa.

Por otro lado, para el SB se llegó a la obtención de un modelo que describe de manera correcta los datos experimentales, en la cual se incluyó el término de la hidrólisis de sacarosa, pudiendo relacionar este fenómeno con lo que se reporta en literatura, la cual habla del fenómeno de producción de la enzima invertasa por parte de la levadura que se encarga de la hidrólisis del carbohidrato sacarosa en unos más simples: glucosa y fructuosa, sirviendo estos como fuente de carbono principal para el crecimiento del microorganismo.

El microorganismo LR no fue capaz de desdoblar la sacarosa, por lo que su crecimiento no fue el óptimo ni emulable.

Se concluye que con el medio MBT como fuente de carbono y nitrógeno, se les proporciona a los microorganismos los nutrientes requeridos para su crecimiento, sin embargo, en que el carbono se encuentre como un carbohidrato más complejo como es la sacarosa provoca un estrés celular que, como en todo ser vivo, obliga a los microorganismos a reproducirse en busca de preservarse.

Se fue testigo de la importancia que tiene trabajar con un medio de cultivo homogéneo y correcto para la comparación de las réplicas, además de las condiciones controladas.

Se cumplió el objetivo de trabajar con un sistema multicultivo de los microorganismos; el cual no fue el óptimo, pero sirve para conocer cómo se comportan en el sistema cuando están interactuando; esto porque hubo bastantes cambios de condiciones

de operación durante la corrida experimental, que, aunque fueron útiles para comparar distintas formas de operación no fueron contundentes.

Por lo previamente investigado se esperaba comensalismo, que es cuando uno de los cultivos obtiene ventajas de la interacción del cultivo contiguo, mientras que este último no se ve afectado, es decir que los *Lactobacillus* se iban a ver beneficiados mientras que la levadura no sufriría cambios; sin embargo, este fenómeno se observa cuando se inoculan al mismo tiempo en el reactor. Lo que se trabajó fue un reactor de tipo lote con SB, el cual llegó a la etapa de crecimiento estacionaria y posteriormente se convirtió a lote alimentado de un reactor continuo con LR y LP, así como alimentación de medio MBT. Se observó que al trabajar así fue como ambos microorganismos se vieron beneficiados, es decir, mutualismo. Los *Lactobacillus* se ven beneficiados por la hidrólisis de sacarosa que realizan los SB por la razón previamente mencionada, y que prefieren alimentarse de carbohidratos más simples.

Al realizar la comparación de los resultados de concentración de biomasa por el medidor de biomasa contra el conteo en la caja se vio que el comportamiento era muy diferente. Esto se puede atribuir a que el medidor de biomasa funciona cuantificando a partir del cálculo del factor propio del microorganismo y una curva de calibración capacitancia de cada mo en las condiciones de crecimiento; sin embargo, al tener a los dos microorganismos creciendo juntos se observaba una interferencia en la medición de capacitancia por las propiedades físicas de cada especie, las cuales no fueron especificadas en la curva. También se debe tomar en cuenta que el conteo en placa mide UFC, mientras que el medidor células viables.

Para trabajos futuros se hace la recomendación de llevar una bitácora puntual de lo que se hace en el laboratorio, como se trabajó este semestre, ya que de esta manera se pueden relacionar los resultados con lo que pasó; de realizar la correcta homologación de las muestras que se toman; de preparar los protocolos con anticipación.

Se debe hacer una corrida de lote alimentado para cada uno de los microorganismos por separado, con las mismas condiciones, para poder hacer la comparación de los comportamientos de su crecimiento en solitario y juntos, pudiendo así confirmar el mutualismo.

Una de las aportaciones más importantes al proyecto son la obtención de los modelos que describen tanto el crecimiento microbiano como el balance de masa de los biorreactores, que con apoyo de *MATLAB*® puede servir para la obtención futura de las trayectorias de alimentación del co-cultivo; posterior escalamiento, control y optimización de energía.

6. Bibliografía

Arnoux, A., Preziosi-Belloy, L., Esteban, G., Teissier, P., & Ghommidh, C. (2005). Lactic Acid Bacteria Biomass Monitoring in Highly Conductive Media by Permittivity Measurements. *Biotechnology Letters*, 27(20), 1551-1557. doi:10.1007/s10529-005-1781-2

Blake-Coleman BC, Calder MR, Carr RJG, Moody SC, Clarke DJ (1984) Direct monitoring of reactor biomass in fermentation control. *Trends Anal. Chem.* 3: 229–235.

Calcinaro, F., Dionisi, S., Marinaro, M., Candeloro, P., Bonato, V., Marzotti, S., ... Dotta, F. (2005). Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*, 48(8), 1565–1575. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1831-2>

Ciureanu M, Levadoux W, Goldstein S (1997) Electrical impedance studies on a culture of a newly discovered strain of *Streptomyces*. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 441–449.

Currel R.C. Van Dam, B. (1997). Industrial production of amino acids by fermentation and chemo-enzymatic methods (pp. 245–246). Elsevier Ltd. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt005BQ4P3/biotechnological-innovations/3-continuous-fermentation>

Fogler, H. S. (2001). *Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas*. (G. Trujano Mendoza, Ed.) (3era Edici). New Jersey: Prentice Hall.

Gobbetti, M., Corsetti, A., & Rossi, J. (1994). The sourdough microflora . Interactions between lactic acid bacteria and yeasts : metabolism of amino acids, 10, 275–279.

Goers, L., Freemont, P., & Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and

technologies : taking synthetic biology to the next level.

Gonçalves, L. M. D., Ramos, A., Almeida, J. S., Xavier, A. M. R. B., & Carrondo, M. J. T. (1997). Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48*(3), 346–350. <https://doi.org/10.1007/s002530051060>

Hedberg, M., Hasslöf, P., Sjöström, I., Twetman, S., & Stecksén-Blicks, C. (2008). Sugar fermentation in probiotic bacteria-an in vitro study. *Oral Microbiology and Immunology*, *23*(6), 482–485. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00457.x>

INEGI. (2012). *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. Obtenido de Indicadores de Bienestar por Entidad Federativa: <http://www.beta.inegi.org.mx/app/bienestar/#grafica>

Marmann, A., Aly, A. H., Lin, W., Wang, B., & Proksch, P. (2014). Chemical Diversity of Microorganisms, 1043–1065. <https://doi.org/10.3390/md12021043>

Marques, W. L., Raghavendran, V., Stambuk, B. U., & Gombert, A. K. (2015). Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: A relationship most sweet. *FEMS Yeast Research*, *16*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov107>

Mekkes, M. C., Weenen, T. C., Brummer, R. J., & Claassen, E. (2014). The development of probiotic treatment in obesity: A review. *Beneficial Microbes*, *5*(1), 19–28. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0069>

Molina, H. S., Pérez, I. A., Alonso, A. A., Martínez, J. P., Castellanos, M. P., Laisequilla, C. F., . . . Alonso, A. A. (2015). Carga económica de la obesidad y sus comorbilidades en pacientes adultos en México. *PharmacoEconomics Spanish Research Articles*, *12*(4), 115-122. doi:10.1007/s40277-015-0045-3

- Mora, R., Peña Partida, J. C., Figueredo, C. G., & Rejón, O. A. R. (2018). *ANÁLISIS Y SIMULACIÓN DE MODELOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO PARA LA OBTENCIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS EN PROBIÓTICOS DE Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus y Saccharomyces boulardii EN RÉGIMEN CONTINUO Y SEMICONTINUO. PAP 2018*. Tlaquepaque.
- Nauman, E. B. (2008). *Biochemical Reaction Engineering. Chemical Reactor Design, Optimization, and Scaleup*.
<https://doi.org/10.1002/9780470282076.ch12>
- Pérez-Cano, H. J. (2014). Establecimiento de una reacción en cadena de la polimerasa para la detección de bacterias y hongos. *Revista Mexicana De Oftalmología*, 88(2), 67-72. doi:10.1016/j.mexoft.2013.12.001
- Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the Best Saccharomyces cerevisiae Growth Condition. *Electronic Physician*, 3592-3597; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5308499/>.
- Sanders, M. E. (2000). Symposium: Probiotic Bacteria: Implications for Human Health Considerations for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health 1. *J. Nutr*, 130(Fuller 1991), 384–390. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.384S>
- Schwan HP (1957) Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv. Bio. Med. Phys.* 5: 147–209.
- Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology*, 35(2), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.009>
- Takors, P. R. (2009). *Biochemical Engineering*.
- Tapias, S. L. (1962). *Manual del electricista* (3ª ed., Vol. II). Barcelona: Serrahima y Urpí.

T.K. Ghose, R. D. (1979). Rapid Ethanol Fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and Substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and Bioengineering* , Volume 21, Issue 8.

TLee, H. Y., Manivannan, V., & Goodenough, J. B. (1999). Electrochemical capacitors with KCl electrolyte. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences Series IIC Chemistry*, 2, 565–577. [https://doi-org.ezproxy.iteso.mx/10.1016/S1387-1609\(00\)88567-9](https://doi-org.ezproxy.iteso.mx/10.1016/S1387-1609(00)88567-9)

Towler, G., & Sinnott, R. (2013). *Chemical Engineering Design - Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design (2nd Edition)*. Oxford: Butterworth-Heinemann.

Anexos

A.1 Desarrollo experimental

A.1.1 Producción en un reactor tipo lote de los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* en medio optimizado a base de melazas de betabel

A.1.1.1 Preparación del medio de cultivo comercial MRS para el cultivo del microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* y YPD para *Saccharomyces boulardii*

A.1.1.1.1 Materiales y reactivos

- Frasco SCHOTT DURAN® de 250 mL o Matraz Erlenmeyer PYREX® de 250mL (para LR o SB, respectivamente)
- Balanza analítica
- Espátula
- Probeta graduada de vidrio PYREX® de 100mL
- Charola de aluminio
- Agua destilada
- Medio de cultivo comercial MRS (Difco™ 288130)
- Medio de cultivo comercial YPD

A.1.1.1.2 Método experimental

Se pesó la cantidad de medio de cultivo comercial MRS o YPD, necesario para tener una concentración de 55g/L y 50g/L respectivamente (3.025g y 2.75g), en la balanza analítica con ayuda de una charola de aluminio y espátula. Se mezcló el medio de cultivo con un volumen de agua destilada de 55mL, medido con la probeta, dentro del frasco SCHOTT DURAN® o el matraz Erlenmeyer.

A.1.1.2 Obtención de extracto de té verde al 10% p/v

A.1.1.2.1 Materiales y reactivos

- Tubo Falcon™ de 50mL
- Balanza analítica
- Espátula
- Probeta graduada de vidrio PYREX™ de 100mL
- Agua destilada
- Té verde
- Parrilla de calentamiento con agitación
- Recipiente de metal
- Hielo
- Vaso de precipitado PYREX® de 250mL

A.1.1.2.2 Método experimental

Se colocó 50mL de agua destilada en el vaso de precipitado, medidos con la probeta, y se calentó en la parrilla a una temperatura de 120°C. Se pesaron 5g de hoja de té verde en la balanza analítica. Cuando el agua comenzó a hervir se retiró el vaso de precipitado de la parrilla y se hizo la infusión del té durante 3min. Se preparó un baño de hielo en el recipiente de metal y se detuvo la infusión del té. El extracto se almacenó en el tubo Falcon™.

A.1.1.3 Preparación del medio de cultivo optimizado a base de melazas de betabel, sacarosa y extracto de té verde

A.1.1.3.1 Materiales y reactivos

- Frasco SCHOTT DURAN® de 1L
- Frasco SCHOTT DURAN® de 250mL
- Matraz Erlenmeyer PYREX® de 250mL
- Balanza analítica
- Espátula
- Probeta
- Charola de aluminio

- Autoclave
- Agua de la llave
- Melazas de betabel
- Extracto de té verde al 10% p/v
- Sacarosa
- Extracto de levadura

A.1.1.3.2 Método experimental

Para la corrida experimental del crecimiento del microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* se pesaron las cantidades respectivas para cumplir las concentraciones de 40g/L de sacarosa, 10g/L de melazas de betabel y 5.71g/L de extracto de levadura para un volumen de 2L (80g, 20g y 11.42g respectivamente) con ayuda de la balanza analítica, la espátula y la charola de aluminio.

Para la corrida de *Saccharomyces boulardii* se pesaron las cantidades respectivas para cumplir las concentraciones de 40g/L de sacarosa, 100g/L de melazas de betabel (tomando en cuenta que el extracto con el que se cuenta es una disolución al 10% p/v) y 5.71g/L de extracto de levadura para un volumen de 2L (80g, 200g y 11.42g respectivamente).

Se mezclaron la sacarosa, las melazas de betabel y el extracto de levadura con 20mL de extracto de té verde al 10% p/v, cumpliendo una concentración de este de 10mL/L para el volumen de 2L.

Se aforó el volumen de la mezcla a 2L con agua de la llave. Se colocó 55mL del medio de cultivo en el frasco SCHOTT DURAN® o matraz Erlenmeyer (para LR o SB, respectivamente) de 250mL y el resto en el frasco de 1L.

A.1.1.4 Montaje de los reactores tipo lote para las corridas experimentales

A.1.1.4.1 Materiales y reactivos

- Manguera

- Algodón
- Aluminio
- Gasas
- 3 filtros
- Pinzas
- Tubo de vidrio
- Probeta de plástico 1L
- Reactores PYREX® de 1L
- 3 parrillas de calentamiento y agitación
- Rotámetro

A.1.1.4.2 Método experimental

Se prepararon los reactores tipo lote, como se muestra en la figura 2.1 a los cuales se le colocó un tubo de vidrio que permitiera realizar la toma de muestras; una manguera con un filtro; un tapón de algodón y gasa; así como las pinzas correspondientes y envoltura de aluminio para tener condiciones de esterilidad.

Se vaciaron 600mL del medio optimizado de melaza de betabel medidos con la probeta en cada uno de los reactores.

Se hizo el montaje de las 3 parrillas de calentamiento y agitación; ajustando a las mismas a una temperatura de 37°C y 125rpm.

En el caso de la corrida de producción de *Saccharomyces boulardii* el filtro del reactor se conectó a un rotámetro que controlaba el flujo de aire a una velocidad de 1L/min.

A.1.1.5 Esterilización de material de laboratorio

A.1.1.5.1 Materiales y reactivos

- 100 puntas para micropipeta de 0-10µL limpias
- 100 puntas para micropipeta de 10-100µL limpias

- 50 puntas para micropipeta de 0-5mL
- 300 tubos Eppendorf® de 2mL
- Tubos Falcon™ de 50mL
- Reactores con medio de cultivo optimizado de melaza de betabel
- Frasco SCHOTT DURAN® con medio de cultivo comercial MRS
- Matraz Erlenmeyer PYREX® con medio de cultivo comercial YPD y su respectivo tapón de algodón y gasa
- Frasco SCHOTT DURAN® con medio de cultivo optimizado de melaza de betabel
- Cinta testigo para esterilizar
- Autoclave

A.1.1.5.2 Método experimental

Se esterilizó el material de laboratorio como puntas para las micropipetas, tubos Eppendorf® y Falcon™; así como el frasco con el medio de cultivo comercial MRS o YPD, en la autoclave a una temperatura de 121°C durante 15min; siempre teniendo buenas prácticas de laboratorio y haciendo uso de la cinta testigo para indicar el material estéril.

Por otro lado, el medio de cultivo optimizado se esterilizó a una temperatura de 85°C durante 1h.

A.1.1.6 Inoculación de los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* en los medios de cultivo comercial MRS y YPD respectivamente, así como en medio de cultivo optimizado

A.1.1.6.1 Materiales y reactivos

- 55mL de medio de cultivo comercial MRS o YPD estéril a la concentración previamente descrita
- 55mL de medio de cultivo optimizado de melazas de betabel estéril a la concentración previamente descrita

- Micropipeta de 0-5mL
- Puntas para micropipeta de 0-5mL estériles
- Stock de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* o *Saccharomyces boulardii* en glicerol al 20% p/v
- Cabina de flujo laminar
- Disolución de alcohol al 70%
- Algodón
- Incubadora rotatoria

A.1.1.6.2 Método experimental

Se preparó la campana de flujo laminar, para lo cual es necesaria su limpieza con el algodón y la disolución de alcohol; así como el encendido de los rayos UV durante 15min y su calibración.

En el área estéril se tomó 1mL del stock de cultivo del microorganismo a inocular (*Lactobacillus rhamnosus* o *Saccharomyces boulardii*) con ayuda de la micropipeta y las puntas estériles; y se colocó en el medio de cultivo MRS o YPD, respectivamente. Por otro lado, se realizó el mismo procedimiento, pero con el medio de cultivo optimizado.

Se incubó el medio de cultivo inoculado a una temperatura de 37.5°C y 150rpm por 11 horas.

A.1.1.7 Inoculación de los microorganismos en los reactores tipo lote, corrida experimental y obtención de muestras de crecimiento de los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii*

A.1.1.7.1 Materiales y reactivos

- Mechero tipo Bunsen
- Encendedor
- Algodón
- Disolución de alcohol al 70%

- Jeringas PLASTIPAKI™ de 10mL
- 3 reactores con 600mL medio de cultivo optimizado estéril
- Parrillas de calentamiento y agitación
- Inóculos de *Lactobacillus rhamnosus* o *Saccharomyces boulardii* en medio de cultivo MRS o YPD y en medio de cultivo optimizado
- Tubos Eppendorf® de 2mL

A.1.1.7.2 Método experimental

Se limpió el área de trabajo con ayuda del algodón y la disolución de alcohol; se encendió el mechero, que asegura una zona estéril de 30cm. Se realizó el montaje y desmontaje de las pinzas, algodón, gasas y aluminio que aseguraban las condiciones de esterilidad de los reactores; los cuales se montaron en las parrillas previamente programadas a 37°C y 125rpm. Se inoculó 6mL del microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* o *Saccharomyces boulardii* del medio de cultivo optimizado, para así tener un inóculo del 1%, esto se medía directamente con la jeringa. Cabe mencionar que los inóculos se hacían tanto en medio comercial como en medio optimizado ya que se quería asegurar el crecimiento del microorganismo, pero al observar crecimiento en el medio de betabel, se prefería hacer uso de este, para así evitar el tiempo de readaptación del microorganismo si se inoculaba del medio comercial al medio de betabel.

Se tomaron muestras por triplicado de cada uno de los tres reactores en los tubos Eppendorf® durante los siguientes tiempos en horas: 0-6,8-11,25; siempre con buenas prácticas para no romper las condiciones de esterilidad. Tomadas las muestras se etiquetaban con datos de número de reactor (1, 2 o 3), tipo de microorganismo, tiempo de toma y fecha; se detenía la reacción guardándolas en el refrigerador.

A.1.2 Conteo de biomasa producida en el reactor tipo lote para los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* durante la corrida experimental

A.1.2.1 Preparación y esterilización del agar y medio de cultivo MRS para el microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* y YPD para *Saccharomyces boulardii* para siembra en cajas Petri; llenado y rotulación de las cajas

A.1.2.1.1 Materiales y reactivos

- Parrilla de calentamiento y agitación
- Vaso de precipitado PYREX® de 500mL
- Aluminio
- Charola de aluminio
- Espátula
- Medio de cultivo comercial MRS (Difco™ 288130)
- Medio de cultivo comercial YPD
- Cajas Petri de plástico estériles
- Balanza analítica
- Autoclave
- Cabina de flujo laminar
- Frasco SCHOTT DURAN® de 500mL
- Agua destilada
- Mosca de agitación
- Cinta testigo
- Incubadora
- Probeta
- Agua destilada
- Algodón
- Disolución de alcohol al 70%

A.1.2.1.2 Método experimental

Se pesaron con apoyo de la balanza analítica y las charolas de aluminio las cantidades de medio comercial MRS o YPD que cumplieran con las concentraciones de 55 o 50 g/L en las disoluciones para las cajas Petri respectivamente, así como el agar para una concentración de 15g/L. El volumen de cada caja Petri se consideró como de 30mL.

Se incorporó el agar y el medio de cultivo con el agua destilada, para lo cual fue necesario calentar y colocar una mosca de agitación a la mezcla que se encontraba en el vaso de precipitado en la parrilla, teniendo precaución de que no se evaporara el agua agregada.

Teniendo la mezcla lista, se colocó en el frasco SCHOTT DURAN® y se esterilizó en la autoclave a 121°C por un tiempo de 15min, haciendo uso de la cinta testigo.

Se retiró la mezcla de agar y medio de cultivo de la autoclave y cuando este estuvo a una temperatura de aproximadamente 50-60°C se hizo el vaciado del medio en las cajas Petri dentro de la cabina de flujo laminar, limpiada con el procedimiento previamente mencionado. Se tuvo cuidado de que no se observen burbujas o uniformidades. Se colocaron las cajas Petri dentro de la incubadora a una temperatura de 37°C durante 24h.

Una vez solidificado el medio de siembra se continuó con la rotulación de las cajas. Este procedimiento consiste en dividir cuadros de 2x2cm en el área de la placa, tal como se muestra en la figura 2.2; con lo que se obtienen 3 cuadros disponibles para cada dilución, tomando en cuenta diluciones desde -2 a -8. Al reverso de la caja se codificó el microorganismo que se sembraría, así como el reactor y el tiempo correspondiente.

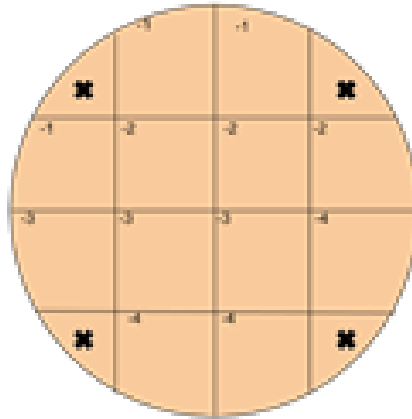


Figura 2.2 Rotulación de cajas Petri para siembra de microorganismo por medio de la técnica de goteo

A.1.2.2 Preparación de disolución salina al 0.85% p/v

A.1.2.2.1 Materiales y reactivos

- 2 frascos SCHOTT DURAN® de 500mL
- NaCl
- Probeta
- Charola de aluminio
- Espátula
- Balanza analítica
- Autoclave
- Agua destilada
- Cinta testigo

A.1.2.2.2 Método experimental

Se prepararon dos frascos de 500mL de disolución salina al 0.85%, para lo cual se pesaron 4.25g de NaCl con ayuda de la balanza analítica. Se midió los 500mL de agua destilada con la probeta y se mezclaron con el cloruro de sodio en los frascos SCHOTT DURAN®.

Se esterilizó la disolución en la autoclave a una temperatura de 121°C durante 15min.

A.1.2.3 Elaboración de las diluciones de las muestras de crecimiento

A.1.2.3.1 Materiales y reactivos

- 100 puntas para micropipeta de 0-10µL estériles
- 100 puntas para micropipeta de 10-100µL estériles
- Micropipeta de 0-10µL
- Micropipeta de 10-100µL
- 11 gradillas de plástico para tubos Eppendorf®
- Muestras de las corridas experimentales de los reactores por lote de *Lactobacillus rhamnosus* o *Saccharomyces boulardii*
- 300 tubos Eppendorf® de 2mL
- Cabina de flujo laminar
- Algodón
- Disolución de alcohol al 70%
- Disolución salina al 0.85% estéril
- Vortex

A.1.2.3.2 Método experimental

Se colocaron las muestras de las corridas experimentales del microorganismo a trabajar, de los tiempos en horas: 0-6,8-11,25 en gradillas de plástico con la rotulación correspondiente para los tres reactores.

Se rotularon las gradillas de plástico para las diluciones de: 1:100 (-2), 1:1000 (-3), 1:10000 (-4), 1:100000 (-5), 1:000000 (-6), 1:0000000 (-7), 1:00000000 (-8) de cada una de las muestras de cada tiempo para los tres reactores.

En la cabina de flujo laminar, preparada previamente, se hicieron las diluciones correspondientes con ayuda de las micropipetas y las puntas en los tubos Eppendorf®, teniendo un volumen constante de 1mL. En el caso de la dilución -2,

se tomó de la muestra original 100µL y el resto del volumen, 900µL, de disolución salina al 0.85% p/v. Posteriormente se tomó 100µL de la dilución -2 para la -3 y el resto del volumen, 900µL, de disolución salina; repitiendo este último paso hasta la -8. Para asegurar la homogeneidad de cada dilución, así como del contenido de la muestra, se hizo uso del Vortex. Cabe mencionar que para cumplir con las buenas prácticas de laboratorio para cada dilución se cambiaba de punta estéril.

A.1.2.4 Siembra de las disoluciones de los microorganismos con la técnica de microgota y conteo en placa

A.1.2.4.1 Materiales y reactivos

- 100 puntas para micropipeta de 0-10µL estériles
- Micropipeta de 0-10µL
- Cajas Petri rotuladas y secas con medio de cultivo para siembra MRS o YPD
- Diluciones de las muestras de crecimiento
- Cabina de flujo laminar
- Algodón
- Disolución de alcohol al 70%
- Vortex
- Incubadora

A.1.2.4.2 Método experimental

Primeramente, se aseguró que las cajas Petri estaban lo suficientemente secas para poder realizar la siembra por medio de la técnica de microgota. Se trabajó en la cabina de flujo laminar, previamente preparada.

Se tomaron las diluciones de las muestras de los 3 reactores, para todos los tiempos desde factores de dilución de -2 a -8. Para sembrar bastó con hacer uso del Vortex para homogeneizar la dilución del tubo Eppendorf®; tomar 10µL con ayuda de la micropipeta y punta y colocar la gota en el cuadro correspondiente en la placa Petri, esto por triplicado. De igual manera para cada dilución se cambiaba de punta estéril.

Llena la caja, esta se dejó secar para que las gotas no se movieran y ocasionara una siembra mezclada.

Se colocaron las cajas en la incubadora a una temperatura de 37°C. El primer conteo se hizo pasadas 24h de la siembra, y se confirmó a las 48h. Más de 30 colonias se consideraron incontables.

A.1.3 Conteo de carbohidratos presentes en el reactor tipo lote durante la corrida experimental

A.1.3.1 Elaboración de disoluciones para el conteo de carbohidratos: sacarosa, glucosa y lactato

A.1.3.1.1 Materiales y reactivos

- 50 puntas para micropipeta de 0-10µL limpias
- 50 puntas para micropipeta de 10-100µL limpias
- Micropipeta de 0-10µL
- Micropipeta de 10-100µL
- Placa de 96 pozos para analizador bioquímico YSI 2900
- Disolución salina al 0.85% p/v

- Muestras de las corridas experimentales de los reactores por lote de *Lactobacillus rhamnosus* o *Saccharomyces boulardii*

A.1.3.1.2 Método experimental

Se rotuló la placa de los 96 pozos para el analizador bioquímico; tomando en cuenta las muestras de los tiempos en horas de: 0-6,8-11,25; para cada uno de los tres reactores.

Se hizo una disolución 1:10 de cada una de las muestras de cada tiempo para cada reactor; tomando 30µL de la muestra y 270µL de disolución salina; teniendo en total 12 disoluciones para cada reactor (1, 2 y 3); esto con ayuda de las micropipetas y las puntas.

A.1.3.2 Medición en el analizador bioquímico YSI 2900

A.1.3.2.1 Materiales y reactivos

- Diluciones de las muestras de cada reactor en la placa de 96 pozos
- Analizador bioquímico YSI 2900
- Disolución Buffer

A.1.3.2.2 Método experimental

Se comenzó con la calibración del equipo para la medición de carbohidratos: glucosa, sacarosa y lactato; así como el llenado de la disolución Buffer.

Calibrado el equipo, se ingresó la gradilla de 96 pozos con las disoluciones de las muestras y se configuró al equipo para hacer la medición de cada carbohidrato por triplicado, tomando en cuenta el factor de dilución.

Hechas las mediciones, estas se guardaron en una memoria USB para su posterior tratamiento.

A.1.4 Obtención de curva de relación entre las unidades formadoras de colonias (UFC) y la concentración de biomasa en unidades de g/L

A.1.4.1 Preparación y esterilización del medio de cultivo comercial MRS para el cultivo del microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* y YPD para *Saccharomyces boulardii*

Se siguió el procedimiento previamente descrito en la sección A.1.1.1 pero para un volumen de medio de cultivo de 50mL, respetando las concentraciones de MRS o YPD.

A.1.4.2 Esterilización de material de laboratorio

Se siguió el procedimiento descrito en la sección A.1.2.5 para las puntas para micropipeta, tubos Eppendorf® y Falcon™.

A.1.4.2 Preparación y esterilización del agar y medio de cultivo MRS para el microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* y YPD para *Saccharomyces boulardii* para siembra en cajas Petri; llenado y rotulación de las cajas

Se siguió el procedimiento descrito en la sección 2.2.2.1.

A.1.4.3 Inoculación de los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* en los medios de cultivo comercial MRS y YPD respectivamente

Se siguió el procedimiento de la sección 2.2.1.6, tomando en cuenta que el volumen del medio de cultivo MRS y YPD fueron 50mL y que del medio Stock se tomó 500µL del microorganismo LR o SB, respectivamente. El tiempo de inoculación fue de 6 y 8h para LR y SB.

A.1.4.4 Peso constante de vasos

A.1.4.4.1 Materiales y reactivos

- 45 vasos de PP #x
- Estufa
- Balanza microanalítica
- Desecador
- Guantes de latex
- Pinzas de plástico

A.1.4.4.2 Método experimental

Se rotularon los vasos de plástico, de los cuales 21 eran para las muestras de *Lactobacillus rhamnosus*, 21 para las de *Saccharomyces boulardii* y 3 para la disolución salina. Se secaron los vasos en la estufa a una temperatura de 70°C durante 24h.

Pasado el tiempo de 24h, haciendo uso de guantes y pinzas de plástico, se colocaron los vasos en un desecador durante 20min.

Desecados los vasos, se pesaron en la balanza microanalítica y se guardaron en el desecador hasta su posterior uso.

A.1.4.5 Lavado celular de los microorganismos y elaboración de disoluciones

A.1.4.5.1 Materiales y reactivos

- Medio de cultivo con Inoculo de *Lactobacillus rhamnosus*
- Medio de cultivo con inoculo de *Saccharomyces boulardii*
- Tubos Falcon™
- Disolución salina al 0.85% p/v estéril
- Vortex
- Centrífuga
- Cabina de flujo laminar
- Disolución de alcohol al 70%
- Algodón
- Gradilla para tubos Falcon™
- 50 puntas para micropipeta de 0-5mL estériles
- Micropipeta de 0-5mL
- 50 puntas para micropipeta de 0-10µL estériles
- Micropipeta de 0-10µL

A.1.4.5.2 Método experimental

Se rotularon 4 tubos Falcon™ como LR1, LR2, SB1 y SB2. Pasadas las 6 y 8 horas de los cultivos de LR y SB se tomó el volumen de cada inóculo, dividiéndose en dos tubos, de manera que en cada tubo tuviera 2mL.

Para hacer el lavado celular las muestras se centrifugaron a una velocidad de 4000rpm y una temperatura de 4°C por 10min. Después se retiró el sobrenadante de cada tubo y se realizó el primer lavado, que consiste en agregar el mismo volumen que fue retirado (25mL aprox.) de solución salina al 0.85% y homogeneizar

con el Vortex. Se volvió a centrifugar a las mismas condiciones, se repitió el lavado y se volvió a homogeneizar.

Para hacer las diluciones se utilizó la micropipeta de 0-5mL, así como puntas estériles; el volumen de dilución fue de 35mL, usando las cantidades de muestra y disolución salina que se observan en la tabla 2.1 en tubos Falcon™, colocados en una gradilla previamente rotulada. Cabe mencionar que se trabajó a condiciones de esterilidad en la cabina de flujo laminar previamente limpiada.

Tabla 2.1. Diluciones de microorganismo LR o SB en tubos Falcon™

Dilución	Cantidad de disolución de NaCl al 0.85% p/v (mL)	Cantidad de disolución del cultivo de microorganismo (mL)
1:5	28	7
1:10	31.5	3.5
1:30	33.83	1.17
1:70	34.5	0.5
1:100	34.65	0.35

A.1.4.6 Elaboración de diluciones de los microorganismos para siembra en caja Petri

Se siguió el procedimiento descrito en la sección 2.2.2.3; con excepción de que en esta ocasión las diluciones comenzaron desde -1 y terminaron en -6 para todas las diluciones (1:1, 1:5, 1:10, 1:30, 1:70 y 1:100) para cada uno de los microorganismos.

A.1.4.7 Siembra de los microorganismos por medio de la técnica de microgota y conteo en placa

Se siguió el procedimiento descrito en la sección 2.2.2.4 del documento.

A.1.4.8 Disoluciones en vasos a peso constante y secado de los mismos

A.1.4.8.1 Materiales y reactivos

- Vasos de PP a peso constante
- Estufa
- Balanza microanalítica
- Desecador
- Guantes de latex
- Pinzas de plástico
- Diluciones de los microorganismos (1:1, 1:5, 1:10, 1:30, 1:70 y 1:100) en los tubos Falcon™
- 50 puntas para micropipeta de 0-5mL estériles
- Micropipeta de 0-5mL
- Disolución salina al 0.85% p/v

A.1.4.8.2 Método experimental

Se tomaron los vasos de PP del desecador, se agregó 10mL de cada una de las diluciones (1:1, 1:5, 1:10, 1:30, 1:70 y 1:100) y disolución salina por triplicado. Se secaron los vasos en la estufa a 70°C durante 24h. Secos se metieron al desecador por 20min y posteriormente se pesaron en la balanza microanalítica. Todo se manejó con guantes de latex y pinzas de plástico.

A.2 Memoria de datos experimentales- RL

A.2.1 Datos del reactor de lote- LR

A.2.1.1 Medición de carbohidratos

Glucosa							
Reactor 1							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	0.0003	0	0.0874	0	0.0248	0.0375	0.0449
1	0.2237	1	0.0753	1	0.0000	0.0997	0.1138
2	0.0455	2	0.1592	2	0.0133	0.0727	0.0767
3	0.0023	3	0.1257	3	0.0653	0.0644	0.0617
4	0.1379	4	0.1040	4	0.0167	0.0862	0.0625
5	0.4196	5	0.5027	5	0.5277	0.4834	0.0566
6	2.8548	6	3.2522	6	3.3728	3.1599	0.2711
8	2.5664	8	2.8534	8	2.9115	2.7771	0.1848
9	2.3536	9	2.6675	9	2.6849	2.5687	0.1864
10	1.7644	10	2.1462	10	2.3001	2.0702	0.2758
11	0.0431	11	0.2441	11	0.1335	0.1402	0.1007
25	0.5057	25	0.7396	25	0.6415	0.6289	0.1175

Glucosa							
Reactor 2							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	0.1287	0	0.1221	0	0.1540	0.1349	0.0168
1	0.2406	1	0.1471	1	0.0916	0.1598	0.0753
2	0.0381	2	0.0000	2	0.0869	0.0417	0.0436
3	0.0000	3	0.0053	3	0.0000	0.0018	0.0031
4	0.0921	4	0.0098	4	0.0000	0.0340	0.0506
5	0.0000	5	0.0000	5	0.0000	0.0000	0.0000
6	0.0000	6	0.0271	6	0.0000	0.0090	0.0156
8	0.0000	8	0.0000	8	0.0000	0.0000	0.0000
9	0.0000	9	0.0000	9	0.0000	0.0000	0.0000
10	0.0000	10	0.0340	10	0.0000	0.0113	0.0196
11	0.1394	11	0.1280	11	0.2401	0.1692	0.0617
25	0.0000	25	0.0000	25	0.0000	0.0000	0.0000

Glucosa							
Reactor 3							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	0.0781	0	0.0000	0	0.0613	0.0465	0.0411
1	0.0727	1	0.0883	1	0.0000	0.0537	0.0471
2	0.1367	2	0.1326	2	0.0000	0.0898	0.0778
3	0.1415	3	0.1504	3	0.0119	0.1013	0.0775
4	0.2193	4	0.5423	4	1.0037	0.5884	0.3942
5	0.1208	5	0.1452	5	0.3473	0.2044	0.1243
6	0.1151	6	0.3832	6	0.7445	0.4143	0.3159
8	0.1244	8	0.1299	8	0.0643	0.1062	0.0364
9	0.0697	9	0.0726	9	0.0690	0.0704	0.0019
10	0.0000	10	0.0021	10	0.0000	0.0007	0.0012
11	2.0128	11	1.9509	11	2.1146	2.0261	0.0827
25	0.1512	25	0.2645	25	0.2632	0.2263	0.0650

Lactato							
Reactor 1							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	0	0	0.003001064	0	0	0.0010	0.0017
1	0.078360182	1	0.034334321	1	0.035476264	0.0494	0.0251
2	0.006970576	2	0.050961814	2	0.067545684	0.0418	0.0313
3	0.195661977	3	0.188950178	3	0.180443621	0.1884	0.0076
4	0.287593066	4	0.327498267	4	0.29234683	0.3025	0.0218
5	0.320394463	5	0.325512411	5	0.35071881	0.3322	0.0162
6	1.165714441	6	1.293920156	6	1.34919481	1.2696	0.0941
8	1.494456689	8	1.612050792	8	1.653639143	1.5867	0.0826
9	1.690356914	9	1.807387358	9	1.900444966	1.7994	0.1053
10	1.793078435	10	2.082845746	10	2.075737943	1.9839	0.1653
11	1.291991408	11	1.39269534	11	1.447375492	1.3774	0.0788
25	3.536599128	25	3.881784928	25	3.854061119	3.7575	0.1918

Lactato							
Reactor 2							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	0.0739	0	0.0533	0	0.1318	0.0863	0.0407
1	0.0586	1	0.0681	1	0.0430	0.0566	0.0127
2	0.2490	2	0.2249	2	0.2695	0.2478	0.0223
3	0.3727	3	0.3298	3	0.3323	0.3449	0.0241
4	0.4937	4	0.5384	4	0.5352	0.5225	0.0249
5	0.5394	5	0.5559	5	0.5836	0.5597	0.0224
6	0.5323	6	0.5759	6	0.4919	0.5333	0.0420
8	0.5269	8	0.5652	8	0.5366	0.5429	0.0199
9	0.5180	9	0.5064	9	0.4892	0.5045	0.0145
10	0.5873	10	0.5953	10	0.5944	0.5923	0.0044
11	1.3605	11	1.3646	11	1.4151	1.3801	0.0304
25	0.3144	25	0.2786	25	0.3300	0.3077	0.0264

Lactato							
Reactor 3							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	0.0000	0	0.0000	0	0.0000	0.0000	0.0000
1	0.0317	1	0.0525	1	0.0576	0.0473	0.0137
2	0.0335	2	0.0561	2	0.0465	0.0454	0.0114
3	0.0715	3	0.0678	3	0.0000	0.0464	0.0403
4	0.1562	4	0.0906	4	0.0244	0.0904	0.0659
5	0.3526	5	0.2716	5	0.1702	0.2648	0.0914
6	0.3423	6	0.3075	6	0.2161	0.2886	0.0652
8	1.4081	8	1.4345	8	1.4255	1.4227	0.0135
9	1.3918	9	1.4072	9	1.4616	1.4202	0.0367
10	1.2979	10	1.3716	10	1.4621	1.3772	0.0822
11	2.1024	11	2.1095	11	2.1672	2.1263	0.0355
25	1.0512	25	1.1359	25	1.1754	1.1208	0.0634

Sacarosa							
Reactor 1							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	38.0676	0	42.1000	0	43.7995	41.3223	2.9440
1	39.3721	1	42.0471	1	44.0049	41.8081	2.3256
2	40.2436	2	44.3664	2	44.8170	43.1423	2.5204
3	39.8811	3	44.4051	3	46.4744	43.5869	3.3720
4	41.1502	4	46.1041	4	47.7824	45.0122	3.4483
5	46.3726	5	47.2258	5	48.3843	47.3276	1.0097
6	44.3210	6	44.6315	6	47.1467	45.3664	1.5495
8	44.0040	8	45.0250	8	47.7224	45.5838	1.9211
9	43.2038	9	44.1823	9	47.7796	45.0553	2.4096
10	40.8085	10	41.8092	10	43.6113	42.0763	1.4204
11	41.3504	11	41.0164	11	42.6613	41.6760	0.8695
25	38.7271	25	39.5330	25	41.2590	39.8397	1.2935

Sacarosa							
Reactor 2							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	43.5693	0	43.7758	0	45.3915	44.2456	0.9978
1	40.8144	1	40.4942	1	42.8515	41.3867	1.2786
2	43.5021	2	43.9835	2	45.3547	44.2801	0.9613
3	44.9165	3	43.6793	3	45.1414	44.5791	0.7873
4	42.4088	4	42.5468	4	43.6520	42.8692	0.6814
5	42.8083	5	42.2395	5	43.8056	42.9511	0.7927
6	47.4320	6	46.6766	6	46.8713	46.9933	0.3922
8	42.6183	8	41.7961	8	42.9588	42.4577	0.5978
9	40.5568	9	41.9749	9	42.4605	41.6641	0.9892
10	44.7255	10	47.4806	10	47.9254	46.7105	1.7334
11	39.4920	11	41.1580	11	42.3324	40.9941	1.4272
25	40.6989	25	43.8390	25	45.3415	43.2932	2.3690

Sacarosa								
Reactor 3								
Réplica 1		Réplica 2			Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)		
0	40.4748	0	42.0136	0	42.3522	41.6135	1.0006	
1	48.7177	1	50.2164	1	49.3362	49.4234	0.7532	
2	42.3742	2	43.5532	2	43.9763	43.3012	0.8302	
3	40.4764	3	42.1386	3	43.1383	41.9177	1.3446	
4	41.4658	4	43.7572	4	43.1674	42.7968	1.1898	
5	39.6447	5	41.0307	5	40.3506	40.3420	0.6931	
6	41.0419	6	42.8547	6	43.1902	42.3622	1.1557	
8	38.6910	8	40.6751	8	42.2233	40.5298	1.7706	
9	38.7895	9	40.3081	9	42.0937	40.3971	1.6539	
10	39.6674	10	41.2986	10	42.4195	41.1285	1.3839	
11	41.5229	11	43.2194	11	44.4873	43.0765	1.4873	
25	42.4100	25	43.7981	25	45.7083	43.9721	1.6561	

A.2.1.2 Curva de calibración UFC- g/L para biomasa

LR														
Cuento de placa						Peso seco								
Dilución	-1	-2	-3	-4	-5	-6	Concentración (UFC/mL)	Desviación estándar	Muestra	Peso seco (g)	Peso con células (g)	Peso células (g)	Concentración promedio (g/L)	Desviación estándar
1:1	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	3	3.33E+08	1.53E+08	A1	0.9966	1.1024	0.1058	10.4845	1.36E-03
	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	2	A2			1.0499	1.1568	0.1070			
	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	5	A3			0.9940	1.0982	0.1043			
1:5	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	4	1	4.67E+07	3.06E+07	B1	0.9981	1.0920	0.0939	9.2279	9.11E-04
	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	2	0			B2	0.9889	1.0823	0.0934		
	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	8	0			B3	0.9855	1.0776	0.0921		
1:10	Incontables	Incontables	Incontables	21	0	0	2.03E+07	1.15E+06	C1	0.9922	1.0851	0.0929	9.1312	8.74E-04
	Incontables	Incontables	Incontables	19	0	0			C2	0.9872	1.0784	0.0912		
	Incontables	Incontables	Incontables	21	0	0			C3	0.9874	1.0797	0.0923		
1:30	Incontables	Incontables	Incontables	6	0	0	6.00E+05	4.00E+05	D1	1.0188	1.1097	0.0909	8.9969	5.78E-04
	Incontables	Incontables	Incontables	10	0	0			D2	1.0343	1.1245	0.0902		
	Incontables	Incontables	Incontables	2	0	0			D3	0.9890	1.0804	0.0913		
1:70	Incontables	Incontables	Incontables	16	2	1	1.53E+06	4.04E+05	E1	0.9686	1.0590	0.0905	8.9615	3.51E-04
	Incontables	Incontables	Incontables	19	0	0			E2	1.0518	1.1426	0.0908		
	Incontables	Incontables	Incontables	11	3	1			E3	1.0440	1.1340	0.0901		
1:100	9	31	8	0	0	0	8.67E+03	1.53E+03	F1	0.9779	1.0687	0.0908	8.8589	1.27E-03
	10	10	2	2	2	0			F2	0.9839	1.0731	0.0892		
	7	35	1	1	1	0			F3	1.0733	1.1616	0.0883		

Disolución salina 0.85% p/v				
Dilución	Peso seco (g)	Peso con disol. salina (g)	Peso disol. salina (g)	Concentración promedio (g/L)
NaCl 1	1.031	1.1014	0.0705	0.0828
NaCl 2	0.9570	1.0459	0.0889	
NaCl 3	0.9897	1.0786	0.0889	

LR			
Dilución	Concentración (UFC/mL)	Concentración promedio (g/L)	Desviación estándar
1:100	8.67E+03	8.86E+00	1.53E+03
1:70	1.53E+06	8.96E+00	4.04E+05
1:50	6.00E+05	9.00E+00	4.00E+05
1:10	2.03E+07	9.13E+00	1.15E+06
1:5	4.67E+07	9.23E+00	3.06E+07
Datos graficados			
Dilución	Concentración (UFC/mL)	Concentración promedio (g/L)	Desviación estándar
1:100	8.67E+03	5.12E-02	1.53E+03
1:70	1.53E+06	1.54E-01	4.04E+05
1:50	6.00E+05	1.89E-01	4.00E+05
1:10	2.03E+07	3.24E-01	1.15E+06
1:5	4.67E+07	4.20E-01	3.06E+07
1:1	3.33E+08	1.68E+00	1.53E+08

A.2.1.3 Datos de biomasa

Reactor 1										
Muestra	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	Concentración (UFC/mL)	Desviación estándar
T0	Incontable	5							7.67E+05	3.06E+05
	Incontable	7								
	Incontable	11								
T1	Incontable	10	3						1.20E+06	1.73E+05
	Incontable	13	2							
	Incontable	13	1							
T2	Incontable	8	1	3					1.67E+07	2.65E+05
	Incontable	4	0	1						
	Incontable	9	0	1						
T3	Incontable	41	2	3					2.00E+07	5.77E+04
	Incontable	40	5	1						
	Incontable	41	4	2						
T4	Incontable	58	9	2					1.00E+07	1.00E+07
	Incontable	Incontable	9	1						
	Incontable	Incontable	8	0						
T5	Incontable	30	6	1					2.33E+07	1.53E+07
	Incontable	36	8	4						
	Incontable	28	6	2						
T6	Incontable	Incontable	Incontable	1					1.33E+07	5.77E+06
	Incontable	Incontable	22	1						
	Incontable	Incontable	22	2						
T8	Incontable	Incontable	Incontable	7					5.67E+07	1.15E+07
	Incontable	Incontable	Incontable	5						
	Incontable	Incontable	Incontable	5						
T9	Incontable	Incontable	31	3					4.00E+07	1.73E+07
	Incontable	Incontable	33	6						
	Incontable	Incontable	27	3	0					
T10	Incontable	Incontable	Incontable	7					3.67E+07	3.51E+07
	Incontable	Incontable	Incontable	4						
	Incontable	Incontable	Incontable	0						
T11	Incontable	Incontable	Incontable	10					1.40E+08	4.00E+07
	Incontable	Incontable	Incontable	14						
	Incontable	Incontable	Incontable	18						
T25	Incontable	Incontable	Incontable	16	4				2.00E+08	2.00E+07
	Incontable	Incontable	Incontable	16	2					
	Incontable	Incontable	Incontable	29	0					

Reactor 2										
Muestra	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	Concentración (UFC/mL)	Desviación estándar
T0	Incontable	7	0						6.00E+05	1.73E+05
	Incontable	7	0							
	Incontable	4	1							
T1	40	5	0						3.00E+05	2.00E+05
	45	1	1							
	34	3	0							
T2	Incontable	22	0	0					2.00E+06	1.73E+06
	Incontable	21	3	1						
	Incontable	16	3	0						
T3	Incontable	23	0	1					2.60E+06	3.61E+05
	Incontable	25	0	0						
	Incontable	30	3	0						
T4	Incontable	59	0						6.67E+05	1.15E+06
	Incontable	34	2							
	Incontable	72	0							
T5	Incontable	87	16	9					1.03E+07	4.93E+06
	Incontable	102	7	0						
	Incontable	54	8	1						
T6	Incontable	Incontable	5	30	3				5.00E+06	0.00E+00
	Incontable	Incontable	5	35	3					
	Incontable	Incontable	5	44	0					
T8	Incontable	Incontable	Incontable	7					2.55E+07	2.12E+06
	Incontable	Incontable	24	3						
	Incontable	Incontable	27	0						
T9	Incontable	13	0	2					1.70E+05	3.46E+05
	Incontable	19	1	1						
	Incontable	19	0	0						
T10	Incontable	Incontable	35	4					4.33E+07	2.52E+06
	Incontable	Incontable	48	7						
	Incontable	Incontable	27	2						
T11	Incontable	Incontable	19	0					2.30E+07	4.00E+06
	Incontable	Incontable	27	6						
	Incontable	Incontable	23	5						
T25	Incontable	Incontable	1	0	0	1			1.00E+06	1.00E+06
	Incontable	Incontable	2	5	1	0				
	Incontable	Incontable	0	1	2	0				

Reactor 3										
Muestra	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	Concentración (UFC/mL)	Desviación estándar
T0	38	0							3.03E+05	7.09E+04
	29	0								
	24	2								
T1	61	8							6.67E+05	6.03E+04
	73	3								
	66	3								
T2	82	0							8.77E+05	5.13E+04
	89	9								
	92	2								
T3	65	11							8.67E+05	2.52E+05
	57	6								
	73	9								
T4	Incontable	6							7.33E+05	1.53E+00
	78	9								
	79	7								
T5	95	24							2.53E+06	4.16E+05
	70	22								
	70	30								
T6	74	29							2.70E+06	4.36E+05
	55	22								
	Incontable	30								
T8	Incontable	17	23						1.50E+07	7.00E+06
	Incontable	27	12							
	Incontable	49	10							
T9	Incontable	Incontable	16	3	0				2.00E+07	1.73E+07
	Incontable	Incontable	51	0	1					
	Incontable	Incontable	41	3	0	3				
T10	Incontable	41	4	4					3.00E+07	1.73E+07
	Incontable	67	18	1						
	Incontable	39	21	4						
T11	Incontable	26							3.40E+06	1.14E+06
	Incontable	29								
	Incontable	47	50							
T25	Incontable	Incontable	2	0					1.33E+06	1.15E+06
	Incontable	Incontable	0	0						
	Incontable	Incontable	2	1						

Tiempo	Concentración (UFC/mL)			Concentración (g/mL)		
	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3
0	7.67E+05	6.00E+05	3.03E+05	0.1538	0.1530	0.1515
1	1.20E+06	3.00E+05	6.67E+05	0.1560	0.1515	0.1533
2	1.67E+07	2.00E+06	8.77E+05	0.2333	0.1600	0.1544
3	2.00E+07	2.60E+06	8.67E+05	0.2500	0.1630	0.1543
4	1.00E+07	6.67E+05	7.33E+05	0.2000	0.1533	0.1537
5	2.33E+07	1.03E+07	2.53E+06	0.2667	0.2017	0.1627
6	1.33E+07	5.00E+06	2.70E+06	0.2167	0.1750	0.1635
8	5.67E+07	2.55E+07	1.50E+07	0.4333	0.2775	0.2250
9	4.00E+07	1.70E+05	2.00E+07	0.3500	0.1509	0.2500
10	3.67E+07	4.33E+07	3.00E+07	0.3333	0.3667	0.3000
11	1.40E+08	2.30E+07	3.40E+06	0.8500	0.2650	0.1670
25	2.00E+08	1.00E+06	1.33E+06	1.1500	0.1550	0.1567
Desviación estándar						
Tiempo	Concentración (UFC/mL)			Concentración (g/mL)		
	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3
0	3.06E+05	1.73E+05	7.09E+04	0.1515	0.1509	0.1504
1	1.73E+05	2.00E+05	6.03E+04	0.1509	0.1510	0.1503
2	2.65E+05	1.73E+06	5.13E+04	0.1513	0.1587	0.1503
3	5.77E+04	3.61E+05	2.52E+05	0.1503	0.1518	0.1513
4	1.00E+07	1.15E+06	1.53E+00	0.2000	0.1558	0.1500
5	1.53E+07	4.93E+06	4.16E+05	0.2264	0.1747	0.1521
6	5.77E+06	0.00E+00	4.36E+05	0.1789	0.1500	0.1522
8	1.15E+07	2.12E+06	7.00E+06	0.2077	0.1606	0.1850
9	1.73E+07	3.46E+05	1.73E+07	0.2366	0.1517	0.2366
10	3.51E+07	2.52E+06	1.73E+07	0.3256	0.1626	0.2366
11	4.00E+07	4.00E+06	1.14E+06	0.3500	0.1700	0.1557
25	2.00E+07	1.00E+06	1.15E+06	0.2500	0.1550	0.1558

A.2.2 Datos del reactor de lote- SB

A.2.2.1 Medición de carbohidratos

Glucosa							
Reactor 1							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	1.1700	0	1.3066	0	1.4890	1.3219	0.1600
1	1.3481	1	1.6610	1	1.7657	1.5916	0.2173
2	1.1490	2	1.5858	2	1.6500	1.4616	0.2726
3	1.1527	3	1.4290	3	1.7448	1.4422	0.2963
4	1.2761	4	1.4324	4	1.6410	1.4498	0.1831
5	2.7672	5	3.1710	5	3.4432	3.1271	0.3402
6	4.2760	6	5.1352	6	5.7171	5.0427	0.7250
8	7.1242	8	7.9904	8	8.8386	7.9844	0.8572
9	9.6109	9	10.6360	9	11.2686	10.5052	0.8366
10	5.7231	10	6.1012	10	6.3905	6.0716	0.3347
11	6.4621	11	7.1070	11	7.4784	7.0158	0.5142
25	0.0000	25	0.0000	25	0.0000	0.0000	0.0000

Glucosa							
Reactor 2							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	1.6084	0	1.6631	0	1.6002	1.6239	0.0342
1	1.2581	1	1.4750	1	1.3467	1.3599	0.1090
2	1.0717	2	1.3650	2	1.2240	1.2202	0.1467
3	0.8388	3	1.0393	3	1.2140	1.0307	0.1878
4	1.1050	4	1.4913	4	1.4872	1.3612	0.2219
5	2.6330	5	3.1271	5	3.3595	3.0399	0.3710
6	3.4192	6	4.3117	6	4.5072	4.0794	0.5800
8	8.4424	8	9.3766	8	10.8383	9.5524	1.2076
9	7.8761	9	9.1826	9	9.1823	8.7470	0.7542
10	5.1075	10	5.4911	10	5.9039	5.5008	0.3983
11	2.6817	11	2.7588	11	2.8383	2.7596	0.0783
25	0.0000	25	0.0000	25	0.0000	0.0000	0.0000

Glucosa							
Reactor 3							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	1.8440	0	1.7490	0	1.9741	1.8557	0.1130
1	1.3037	1	1.4885	1	1.4499	1.4140	0.0975
2	1.4042	2	1.5411	2	1.5998	1.5150	0.1004
3	1.0654	3	1.1914	3	1.3492	1.2020	0.1422
4	1.4479	4	1.7578	4	1.9481	1.7179	0.2524
5	4.6552	5	5.1884	5	5.7499	5.1978	0.5474
6	4.0907	6	4.7217	6	5.2456	4.6860	0.5782
8	8.9013	8	10.3377	8	11.0117	10.0836	1.0779
9	10.3820	9	10.7506	9	11.7139	10.9488	0.6877
10	7.3902	10	3.5263	10	1.0523	3.9896	3.1942
11	2.4755	11	2.1780	11	1.9026	2.1853	0.2865
25	0.0000	25	0.0000	25	0.0000	0.0000	0.0000

Lactato							
Reactor 1							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	0.0238	0	0.0446	0	0.0191	0.0292	0.0136
1	0.0563	1	0.0722	1	0.0557	0.0614	0.0094
2	0.0000	2	0.0815	2	0.0600	0.0472	0.0422
3	0.0137	3	0.0007	3	0.0602	0.0249	0.0313
4	0.0302	4	0.0361	4	0.0270	0.0311	0.0046
5	0.0008	5	0.0529	5	0.0512	0.0350	0.0296
6	0.0113	6	0.0017	6	0.0652	0.0261	0.0342
8	0.0046	8	0.0369	8	0.0000	0.0139	0.0201
9	0.0474	9	0.0574	9	0.0194	0.0414	0.0197
10	0.0081	10	0.0267	10	0.0204	0.0184	0.0095
11	0.0013	11	0.0504	11	0.0402	0.0307	0.0259
25	0.0193	25	0.0031	25	0.0000	0.0075	0.0104

Lactato							
Reactor 2							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	0.0286	0	0.0997	0	0.0567	0.0617	0.0358
1	0.0528	1	0.0692	1	0.0115	0.0445	0.0297
2	0.0455	2	0.0588	2	0.0082	0.0375	0.0262
3	0.0253	3	0.0125	3	0.0508	0.0295	0.0195
4	0.0206	4	0.0558	4	0.0401	0.0388	0.0176
5	0.0208	5	0.0558	5	0.0212	0.0326	0.0201
6	0.0181	6	0.0531	6	0.0032	0.0248	0.0257
8	0.0422	8	0.0498	8	0.0119	0.0346	0.0200
9	0.0465	9	0.0690	9	0.0486	0.0547	0.0124
10	0.0083	10	0.0105	10	0.0314	0.0167	0.0127
11	0.0000	11	0.0000	11	0.0065	0.0022	0.0037
25	0.0000	25	0.0111	25	0.0291	0.0134	0.0147

Lactato							
Reactor 3							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	0.0758	0	0.0322	0	0.0813	0.0631	0.0269
1	0.0501	1	0.0222	1	0.0347	0.0357	0.0140
2	0.0602	2	0.0657	2	0.0484	0.0581	0.0088
3	0.0321	3	0.0286	3	0.0356	0.0321	0.0035
4	0.0233	4	0.0439	4	0.0561	0.0411	0.0166
5	0.0461	5	0.0560	5	0.0652	0.0558	0.0096
6	0.0610	6	0.0689	6	0.0531	0.0610	0.0079
8	0.0659	8	0.0514	8	0.0031	0.0402	0.0329
9	0.0582	9	0.0514	9	0.0731	0.0609	0.0111
10	0.0000	10	0.0013	10	0.0308	0.0107	0.0174
11	0.0282	11	0.0230	11	0.0100	0.0204	0.0094
25	0.0501	25	0.0439	25	0.0521	0.0487	0.0043

Sacarosa							
Reactor 1							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	56.9050	0	59.0045	0	64.4224	60.1107	3.8788
1	55.0474	1	57.6514	1	61.2122	57.9703	3.0948
2	58.9733	2	61.1989	2	65.5061	61.8928	3.3212
3	48.8817	3	53.6241	3	56.5258	53.0105	3.8588
4	48.8157	4	52.9277	4	56.9401	52.8945	4.0623
5	59.5504	5	60.1070	5	64.3337	61.3304	2.6158
6	46.6133	6	53.3727	6	54.6073	51.5311	4.3034
8	44.5687	8	48.0844	8	52.2928	48.3153	3.8672
9	36.1458	9	38.8074	9	42.5805	39.1779	3.2333
10	19.4230	10	19.9109	10	17.1051	18.8130	1.4991
11	21.8128	11	22.8941	11	25.0077	23.2382	1.6250
25	0.0000	25	0.0000	25	0.0000	0.0000	0.0000

Sacarosa							
Reactor 2							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	67.1930	0	69.7098	0	65.7019	67.5349	2.0257
1	53.1616	1	56.5409	1	59.1786	56.2937	3.0161
2	50.9871	2	53.1423	2	56.4116	53.5136	2.7312
3	48.6881	3	52.7663	3	55.0165	52.1570	3.2079
4	49.6589	4	51.6036	4	53.7774	51.6800	2.0603
5	49.9710	5	53.0794	5	55.1232	52.7245	2.5944
6	45.3168	6	48.5416	6	51.6761	48.5115	3.1798
8	46.4608	8	48.8617	8	52.9787	49.4337	3.2964
9	34.4405	9	33.9771	9	35.1572	34.5249	0.5945
10	17.7313	10	18.7340	10	19.5655	18.6769	0.9184
11	8.6671	11	9.1418	11	9.6591	9.1560	0.4961
25	0.0000	25	0.0000	25	0.0000	0.0000	0.0000

Sacarosa							
Reactor 3							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Toma	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
0	83.2516	0	79.0695	0	80.1317	80.8176	2.1738
1	54.0645	1	56.4386	1	59.8679	56.7903	2.9176
2	59.6609	2	59.1669	2	59.6183	59.4820	0.2738
3	50.0801	3	53.7173	3	56.9045	53.5673	3.4147
4	56.3479	4	59.7008	4	61.4549	59.1679	2.5949
5	77.2443	5	76.1769	5	78.9637	77.4617	1.4061
6	54.0980	6	57.3448	6	60.5666	57.3365	3.2343
8	50.4803	8	53.4824	8	55.2746	53.0791	2.4224
9	51.7872	9	49.8659	9	50.1119	50.5884	1.0455
10	26.6488	10	11.6887	10	1.3923	13.2433	12.6998
11	8.2041	11	7.4536	11	6.1995	7.2857	1.0128
25	0.0000	25	0.0000	25	0.0000	0.0000	0.0000

A.2.2.2 Curva de calibración UFC- g/L para biomasa

SB												
Conteo de placa						Peso seco						
Dilución	-2	-3	-4	-5	Concentración (UFC/mL)	Desviación estándar	Muestra	Peso seco (g)	Peso con células (g)	Peso células (g)	Concentración promedio (g/L)	Desviación estándar
1:1			8	1	8.67E+06	5.77E+05	A1	1.0644	1.1564	0.0921	1.2490	7.55E-04
			9	2			A2	1.0217	1.1146	0.0929		
			9	4			A3	0.9855	1.0769	0.0915		
1:5			4	1	3.00E+06	1.73E+06	B1	1.0725	1.1631	0.0907	0.9103	2.85E-03
			4	0			B2	1.0437	1.1338	0.0901		
			1	0			B3	1.0508	1.1363	0.0855		
1:10			6	0	1.00E+06	4.00E+05	C1	1.0474	1.1364	0.0890	0.8350	1.14E-03
			10	1			C2	0.9839	1.0722	0.0883		
			1	0			C3	0.9788	1.0656	0.0867		
1:30			6	1	3.33E+05	2.52E+05	D1	0.9923	1.0812	0.0889	0.8980	6.82E-04
			3	0			D2	1.0089	1.0981	0.0892		
			1	0			D3	1.0017	1.0896	0.0879		
1:70			1	0	1.00E+05	1.00E+05	E1	1.0336	1.1239	0.0902	0.7657	3.88E-03
			2	0			E2	0.9835	1.0723	0.0888		
			0	1			E3	0.9607	1.0436	0.0829		
1:100			11	3	1.60E+05	4.58E+04	F1	0.9806	1.0711	0.0905	0.9717	1.26E-03
			20	4			F2	0.9809	1.0705	0.0897		
			17	0			F3	0.9844	1.0724	0.0880		

Disolución salina 0.85% p/v				
Dilución	Peso seco (g)	Peso con disol. salina (g)	Peso disol. salina (g)	Concentración promedio (g/L)
NaCl 1	1.0309	1.0488	0.0179	7.97E+00
NaCl 2	0.9570	1.0473	0.0904	
NaCl 3	0.9897	1.0587	0.0690	

SB			
Dilución	Concentración (UFC/mL)	Concentración promedio (g/L)	Desviación estándar
1:100	1.60E+05	9.72E-01	4.58E+04
1:70	1.00E+05	7.66E-01	1.00E+05
1:50	3.33E+05	8.98E-01	2.52E+05
1:10	1.00E+06	8.35E-01	4.00E+05
1:5	3.00E+06	9.10E-01	1.73E+06
1:1	8.67E+06	1.25E+00	5.77E+05
Datos graficados			
Dilución	Concentración (UFC/mL)	Concentración promedio (g/L)	Desviación estándar
1:70	1.00E+05	7.66E-01	1.00E+05
1:10	1.00E+06	8.35E-01	4.00E+05
1:5	3.00E+06	9.10E-01	1.73E+06
1:1	8.67E+06	1.25E+00	5.77E+05

A.2.2.3 Datos de biomasa

Reactor 1							Concentración (UFC/mL)	Desviación estándar
Muestra	-3	-4	-5	-6	-7			
T0	2	0	0	0	0	0	1.33E+05	1.15E+05
	2	0	0	0	0	0		
	0	0	0	0	0	0		
T1	Incontable	3	0	0	0	0	3.67E+06	1.15E+06
	Incontable	5	1	0	0	0		
	Incontable	3	0	0	0	0		
T2	Incontable	5	0	0	0	0	2.00E+06	2.65E+06
	Incontable	1	1	0	0	0		
	Incontable	0	0	0	0	0		
T3	Incontable	3	0	0	0	0	6.00E+06	4.36E+06
	Incontable	11	1	1	0	0		
	Incontable	4	0	0	0	0		
T4	Incontable	4	0	0	0	0	6.33E+06	3.21E+06
	Incontable	5	1	0	0	0		
	Incontable	10	5	0	0	0		
T5	Incontable	14	1	0	0	0	1.00E+07	3.46E+06
	Incontable	8	3	0	0	0		
	Incontable	8	0	0	0	0		
T6	Incontable	8	1	0	0	0	8.33E+06	5.77E+05
	Incontable	8	4	0	0	0		
	Incontable	9	1	14	0	0		
T8	Incontable	Incontable	6	14	2	0	6.33E+07	2.52E+07
	Incontable	Incontable	4	Incontable	0	0		
	Incontable	Incontable	9	Incontable	1	0		
T9	Incontable	Incontable	11	0	0	0	8.67E+07	2.52E+07
	Incontable	Incontable	9	0	0	0		
	Incontable	Incontable	6	0	0	0		
T10	Incontable	Incontable	16	2	0	0	1.80E+08	6.24E+07
	Incontable	Incontable	25	1	0	0		
	Incontable	Incontable	13	4	0	0		
T11	Incontable	Incontable	18	4	0	0	1.87E+08	4.04E+07
	Incontable	Incontable	23	6	0	0		
	Incontable	Incontable	15	3	0	0		
T25	Incontable	Incontable	Incontable	3	0	0	3.00E+08	1.00E+08
	Incontable	Incontable	Incontable	2	0	0		
	Incontable	Incontable	Incontable	4	0	0		

SB

Reactor 2							
Muestra	-3	-4	-5	-6	-7	Concentración (UFC/mL)	Desviación estándar
T0	1	0	0	0	0	5.33E+05	5.86E+05
	12	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
T1	15	0	0	0	0	1.10E+06	4.00E+05
	7	0	0	0	0		
	11	2	0	0	0		
T2	14	0	0	0	0	1.27E+06	8.08E+05
	4	0	0	0	0		
	20	1	1	0	0		
T3	8	0	0	0	0	1.17E+06	3.21E+05
	14	0	0	0	0		
	13	2	0	0	0		
T4	18	4	1	0	0	1.83E+06	1.53E+05
	20	1	0	0	0		
	17	0	0	0	0		
T5	Incontable	4	3	1	0	6.00E+06	2.00E+06
	Incontable	6	1	0	0		
	Incontable	8	0	0	0		
T6	Incontable	20	1	0	0	2.30E+07	5.20E+06
	Incontable	29	0	0	0		
	Incontable	20	1	1	0		
T8	Incontable	5	1	0	0	5.00E+07	1.00E+07
	Incontable	6	1	0	0		
	Incontable	4	1	0	0		
T9	Incontable	11	1	0	0	9.00E+07	2.00E+07
	Incontable	9	1	0	0		
	Incontable	7	0	0	0		
T10	Incontable	27	1	0	0	2.17E+08	4.62E+07
	Incontable	19	4	0	0		
	Incontable	19	1	0	0		
T11	Incontable	34	4	0	0	3.33E+08	5.03E+07
	Incontable	28	6	1	0		
	Incontable	38	4	0	0		
T25	Incontable	27	5	0	0	3.33E+08	3.06E+07
	Incontable	21	2	0	0		
	Incontable	25	3	0	0		

Reactor 3							
Muestra	-3	-4	-5	-6	-7	Concentración (UFC/mL)	Desviación estándar
T0	0	0	0	0	0	0.00E+00	0.00E+00
	0	0	0	0	0		
	0	0	0	0	0		
T1	10	2	0	0	0	1.43E+06	6.66E+05
	11	2	0	0	0		
	22	6	0	0	0		
T2	28	4	0	0	0	2.30E+06	7.00E+05
	26	3	0	0	0		
	15	3	0	0	0		
T3	30	1	1	0	0	2.97E+06	4.51E+05
	25	3	0	0	0		
	34	2	0	0	0		
T4	36	7	1	0	0	4.00E+06	6.08E+05
	37	1	1	0	0		
	47	8	0	0	0		
T5	67	10	0	0	0	6.85E+06	4.16E+06
	70	4	1	0	0		
	Incontable	12	0	0	0		
T6	37	2	0	0	0	5.17E+06	2.04E+06
	43	8	0	1	0		
	75	9	2	0	0		
T8		46	0	0	0	3.67E+07	1.14E+07
		24	0	0	0		
		40	2	0	0		
T9		Incontable	23	1	0	1.83E+08	6.43E+07
		Incontable	11	1	0		
		Incontable	21	0	0		
T10		Incontable	13	4	0	3.00E+08	3.79E+07
		Incontable	12	2	0		
		Incontable	6	3	0		
T11		Incontable	31	4	0	3.33E+08	4.93E+07
		Incontable	23	4	0		
		Incontable	22	2	2		
T25		Incontable	39	15	1	3.90E+08	0.00E+00
		Incontable	Incontable	8	0		
		Incontable	Incontable	17	3		

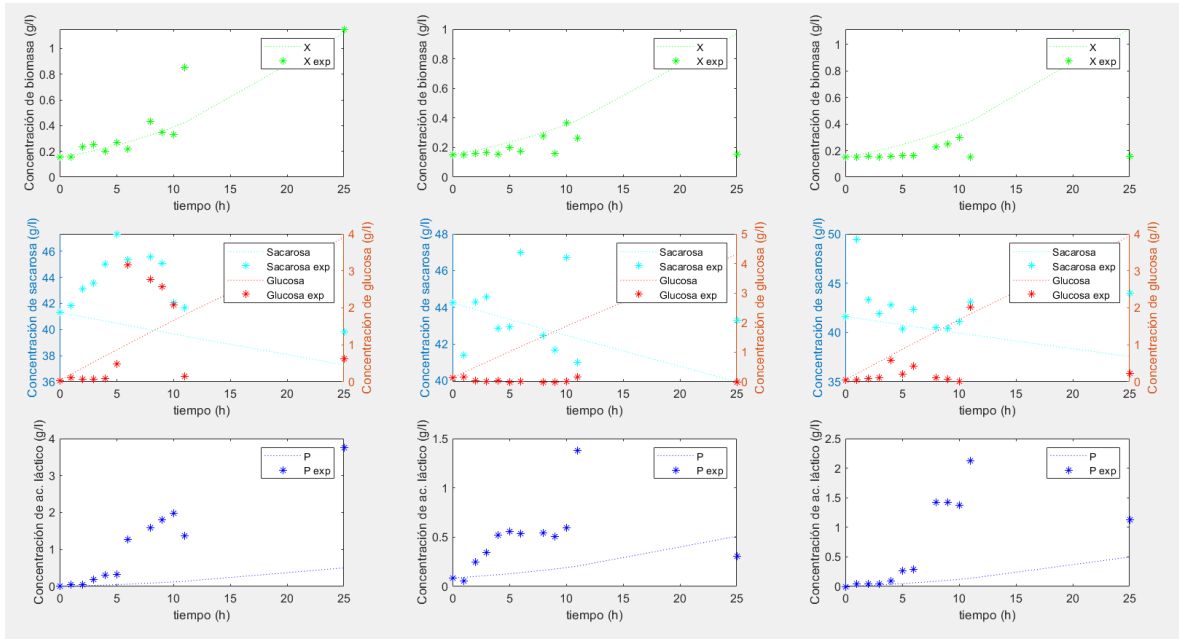
Tiempo	Concentración (UFC/mL)			Concentración (g/mL)		
	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3
0	1.33E+05	5.33E+05	0.00E+00	0.5067	0.5267	0.5000
1	3.67E+06	1.10E+06	1.43E+06	0.6833	0.5550	0.5717
2	2.00E+06	1.27E+06	2.30E+06	0.6000	0.5633	0.6150
3	6.00E+06	1.17E+06	2.97E+06	0.8000	0.5583	0.6483
4	6.33E+06	1.83E+06	4.00E+06	0.8167	0.5917	0.7000
5	1.00E+07	6.00E+06	6.85E+06	1.0000	0.8000	0.8425
6	8.33E+06	2.30E+07	5.17E+06	0.9167	1.6500	0.7583
8	6.33E+07	5.00E+07	3.67E+07	3.6667	3.0000	2.3333
9	8.67E+07	9.00E+07	1.83E+08	4.8333	5.0000	9.6667
10	1.80E+08	2.17E+08	3.00E+08	9.5000	11.3333	15.5000
11	1.87E+08	3.33E+08	3.33E+08	9.8333	17.1667	17.1667
25	3.00E+08	3.33E+08	3.90E+08	15.5000	17.1667	20.0000

Desviación estándar						
Tiempo	Concentración (UFC/mL)			Concentración (g/mL)		
	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3
0	1.15E+05	5.86E+05	0.00E+00	0.5058	0.5293	0.5000
1	1.15E+06	4.00E+05	6.66E+05	0.5577	0.5200	0.5333
2	2.65E+06	8.08E+05	7.00E+05	0.6323	0.5404	0.5350
3	4.36E+06	3.21E+05	4.51E+05	0.7179	0.5161	0.5225
4	3.21E+06	1.53E+05	6.08E+05	0.6607	0.5076	0.5304
5	3.46E+06	2.00E+06	4.16E+06	0.6732	0.6000	0.7082
6	5.77E+05	5.20E+06	2.04E+06	0.5289	0.7598	0.6021
8	2.52E+07	1.00E+07	1.14E+07	1.7583	1.0000	1.0686
9	2.52E+07	2.00E+07	6.43E+07	1.7583	1.5000	3.7146
10	6.24E+07	4.62E+07	3.79E+07	3.6225	2.8094	2.3930
11	4.04E+07	5.03E+07	4.93E+07	2.5207	3.0166	2.9664
25	1.00E+08	3.06E+07	0.00E+00	5.5000	2.0275	0.5000

A.3 Memoria de correlaciones calculadas para la caracterización del crecimiento de los microorganismos LR y SB con el Software *MATLAB*[®]

A.3.1 Datos del reactor de lote- LR

A.3.1.1 Modelo de Han and Levenspiel



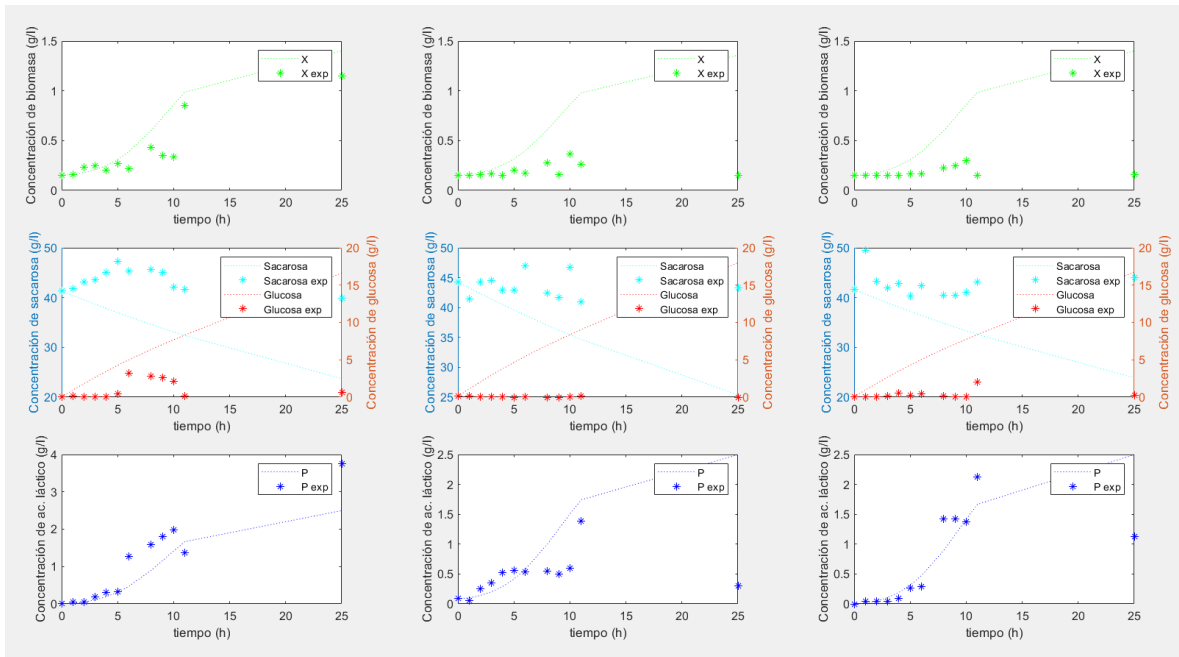
$$\mu = k \cdot \mu_{max} \cdot (1 - P/P_{max})^n \cdot (S_1 / ((1 - P/P_{max})^n \cdot K_{s1} + S_1)) \cdot (1 - \exp(-S_1/S_{min1}));$$

```
mumax = 0.1940
Ks1 = 0.0070
Ks2 = 1.0000
Yxs1 = 5.9427
Yxp = 1.9320
Pmax = 3.2595
Yxs2 =
Km =
Smin1 = 0.0146
Smin2 =
k = 0.5175
m = 3.7746
n = 2.2197
r = 2.5206
kh = 0.0041
```

A.3.1.2 Modelo de Monod

```
mumax = 0.4432
Ks1 = 0.0100
Ks2 = 1.0000
Yxs1 = 1.2259
Yxp = 0.5000
Pmax = 2.5000
Yxs2 =
Km =
Smin1 = 4.9988
Smin2 =
kh = 0.0222
```

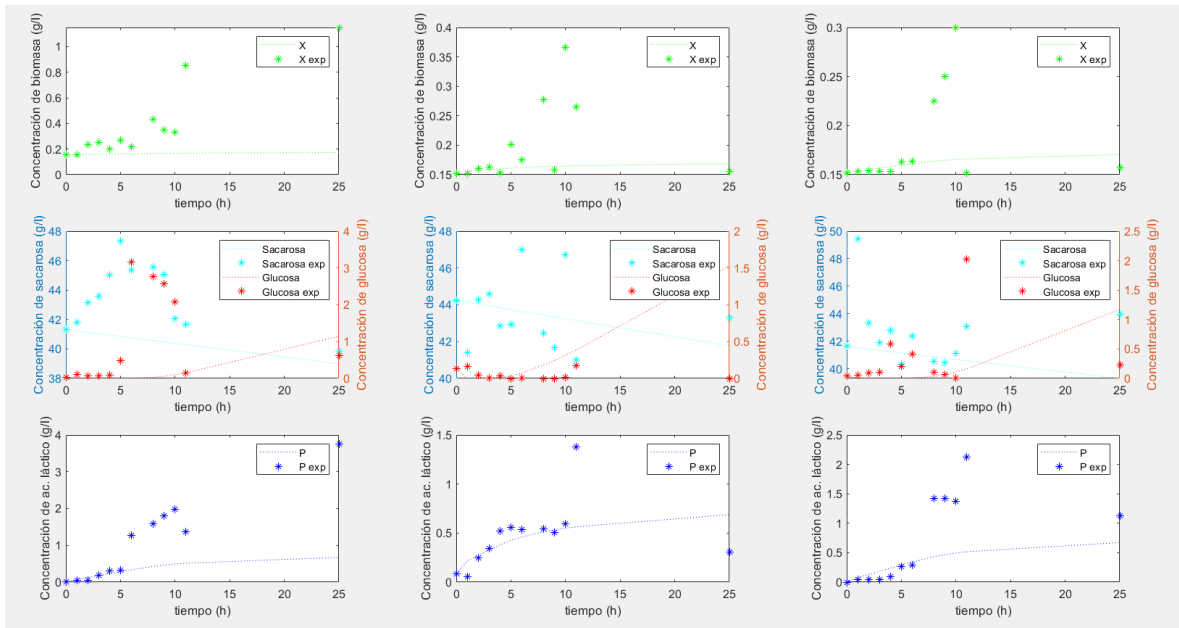
```
mu=mumax*(S1/(Ks1+S1))*(1-P/Pmax)*(1-exp(-S1/Smin1));
```



Variables	ErrorPromedio	DesvError	Correl	MSR
biomasa	-0.2639	0.1104	0.5261	0.1750
glucosa	-5.0701	0.7317	0.1423	44.6131
sacarosa	6.5617	1.2376	0.1839	67.1092
ac.láctico	-0.0210	0.3354	0.7182	0.3524

A.3.1.3 Modelo de Aiba

$$\mu = \mu_{max} * (S1 / (Ks1 + S1)) * \exp(-P * Pmax) * (1 - \exp(-S1 / Smin1));$$



mumax = 0.4432

Ks1 = 0.0100

Ks2 = 1.0000

Yxs1 = 1.2259

Yxp = 0.5000

Pmax = 2.5000

Yxs2 =

Km =

Smin1 = 4.9988

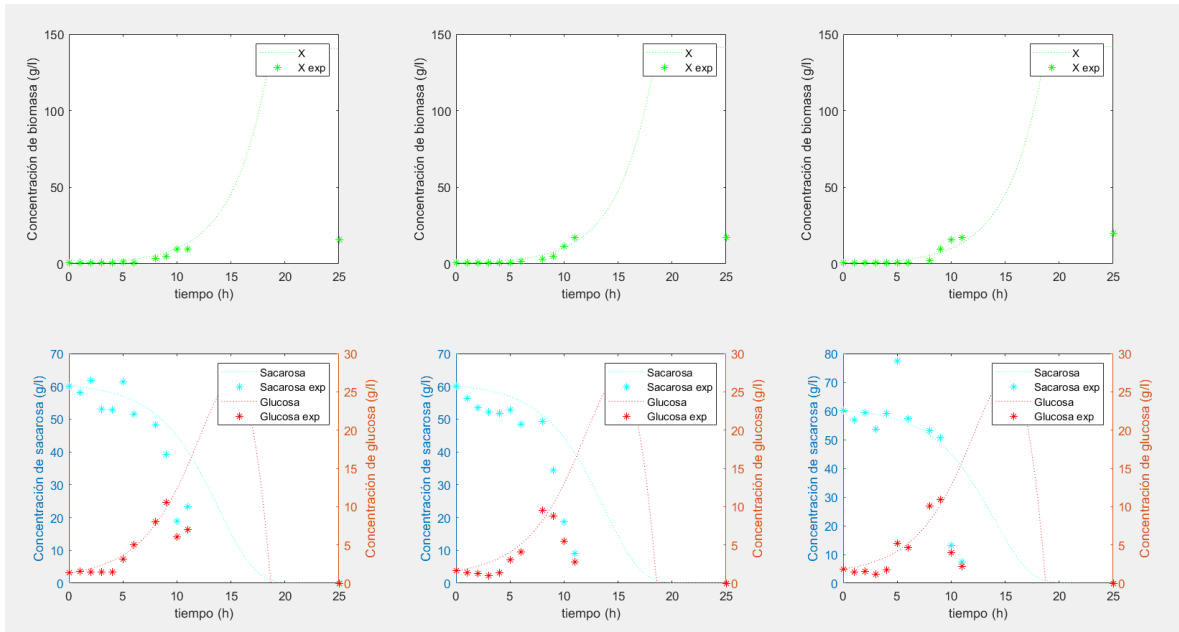
Smin2 =

kh = 0.0222

Variables	ErrorPromedio	DesvError	Correl	MSR
biomasa	0.0927	0.1106	0.5727	0.0466
glucosa	0.2943	0.5495	-0.0841	0.9934
sacarosa	1.4755	1.4177	0.1565	7.9359
ac.láctico	0.3873	0.3430	0.6786	0.6358

A.3.2 Datos del reactor de lote- SB

A.3.2.1 Modelo de Han and Levenspiel



%Correlaciones que me dan con estos valores:

%Biomasa- 0.7857

%Glucosa-0.2808

%Sacarosa-0.8787

$\mu_{max} = 0.2864$

$K_{s1} = 0.0093$

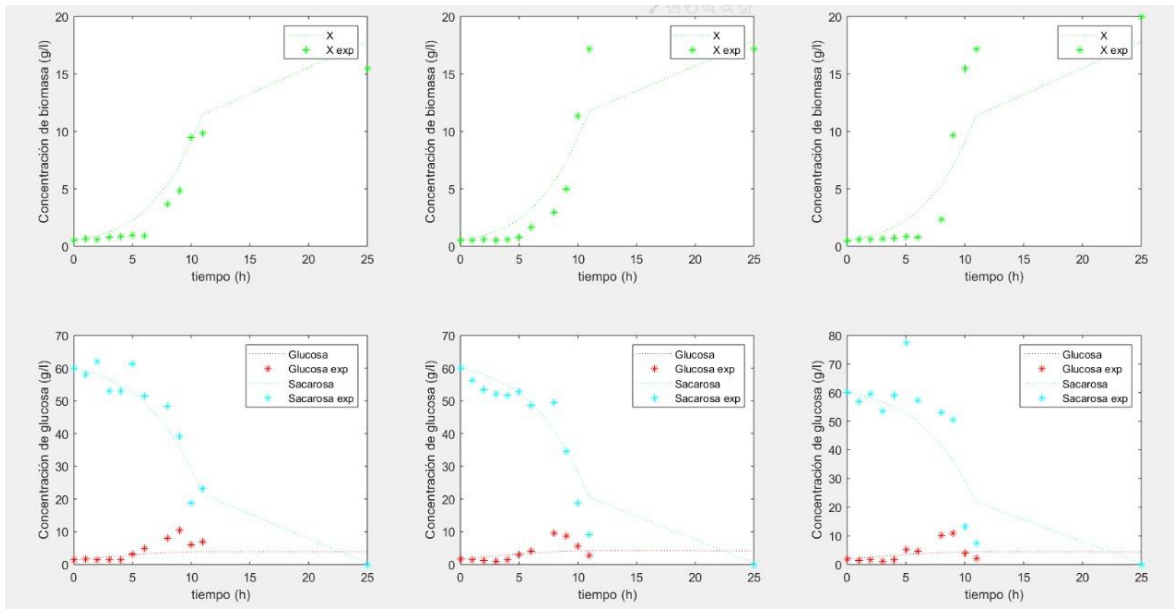
$Y_{xs1} = 2.2813$

$S_{min1} = 0.2370$

$k_h = 0.0091$

$k = 1.0508$

A.3.2.2 Modelo de Aiba



$$\mu = \mu_{max} * (S1 / (Ks1 + S1)) * (S2 / (Ks2 + S2)) * (1 - \exp(-S1 / Kl1)) * (1 - \exp(-S2 / Kl2))$$

```

dX=mu*X;
dS1=1/Yxs1*mu*X-Kh*S2;%-Km*X;
%dP=1/Yxp*mu*X;
dS2=1/Yxs2*mu*X+Kh*S2;%-Km*X;

```

```

mumax = 0.3418
Ks1 = 0.0012
Yxs1 = 19.9903
Yxs2 = 0.3083
Ks2 = 6.9538
Km = 0.2500
Kl1 = 0.1501
Kl2 = 13.6385
Kh = 0.0060

```

Variables	ErrorPromedio	DesvError	Correl	MSR
biomasa	-0.2238	0.8855	0.9402	4.9952
glucosa	0.4489	0.4582	0.5094	8.2025
sacarosa	0.1662	2.3766	0.9330	58.8955

A.4 Memoria de datos experimentales- RC y RLA

A.2.1 Datos de la curva estándar de sacarosa con el micrométodo de ácido sulfúrico- UV

Curva estándar de sacarosa Micrométodo Ácido sulfúrico-UV								
Stock de sacarosa =		0.1 g/L						
Pocillo	Sacarosa (g/L)	uL stock	uL H ₂ O	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Desviación estándar
0	0	0	25	0.488	0.501	0.475	0.488	0.013
1	0.02	5	20	0.554	0.583	0.6111	0.095	0.016
2	0.04	10	15	0.651	0.675	0.637	0.166	0.006
3	0.06	15	10	0.722	0.728	0.772	0.253	0.014
4	0.08	20	5	0.799	0.828	0.873	0.345	0.024
5	0.1	25	0	0.923	0.906	1.033	0.466	0.056

A.2.2 Datos del reactor continuo- RC: LR y LP

A.2.2.1 Medición de carbohidratos

Glucosa Reactor C								
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar	
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)		
0	0.2597	0	0.4808	0	0.5677	0.4361	0.1588	
3	0.0000	3	0.0000	3	0.0000	0.0000	0.0000	
4	0.0371	4	0.0000	4	0.0787	0.0386	0.0394	
25	0.0094	25	0.0261	25	0.0000	0.0119	0.0132	
28	0.0026	28	0.0000	28	0.0718	0.0248	0.0407	
31	0.4988	31	0.7345	31	0.8252	0.6862	0.1685	
34	0.1723	34	0.1327	34	0.0006	0.1018	0.0899	
37	0.0000	37	0.1234	37	0.0000	0.0411	0.0713	
47	0.1994	47	0.1713	47	0.1679	0.1795	0.0173	
50	0.1634	50	0.1845	50	0.3496	0.2325	0.1020	
52	7.3000	52	7.6507	52	7.8283	7.5930	0.2688	

Lactato Reactor C								
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar	
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)		
0	2.1511	0	2.485957628	0	3.0450	2.5607	0.4516	
3	2.6263	3	2.6996	3	2.8626	2.7295	0.1210	
4	2.3530	4	2.4007	4	2.5323	2.4287	0.0928	
25	0.7492	25	0.7664	25	0.6449	0.7202	0.0658	
28	0.6533	28	0.6790	28	0.6174	0.6499	0.0310	
31	1.4251	31	1.4571	31	1.5322	1.4715	0.0550	
34	1.7365	34	1.7935	34	1.8624	1.7975	0.0630	
37	1.9921	37	2.0455	37	2.1144	2.0507	0.0613	
47	0.8688	47	0.8908	47	0.9501	0.9032	0.0421	
50	0.9880	50	1.0157	50	1.0560	1.0199	0.0342	
52	3.8383	52	4.4520	52	5.1721	4.4875	0.6676	

Sacarosa						
Reactor C						
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)
0	25.0283	0	25.0675	0	27.1825	25.7594
3	29.4022	3	30.6223	3	29.6465	29.8904
4	28.0648	4	29.3795	4	31.1690	29.5378
25	33.1131	25	34.1839	25	35.4407	34.2459
28	30.0618	28	30.6871	28	32.4453	31.0647
31	30.6603	31	32.9847	31	34.4075	32.6842
34	31.0196	34	33.3802	34	34.0905	32.8301
37	30.5312	37	33.6460	37	34.2162	32.7978
47	26.9521	47	28.4520	47	29.3192	28.2411
50	30.8933	50	32.9845	50	35.0996	32.9925
52	31.9048	52	34.2880	52	35.7305	33.9744

Microtécnica ácido sulfúrico-UV		
Sacarosa		
Reactor LA		
Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (g/L)
0	0.4850	22.2338
3	0.6560	30.1135
4	0.5480	25.1368
25	0.5690	26.1045
28	0.8500	39.0530
31	0.5620	25.7820
34	0.7660	35.1823
37	0.5930	27.2104
47	0.8470	38.9148
50	0.9430	43.3384
52	0.8760	40.2511

A.2.2.2 Medición de biomasa

Reactor C- LR y LP								
Muestra	-2	-3	-4	-5	-6	-7	Concentración (UFC/mL)	Desviación estándar
T0				18	2		1.70E+08	1.7321
				18	2			
				15	0			
T3				16	1	1	1.47E+08	2.3094
				12	0	0		
				16		0		
T4				15	1	0	1.60E+08	1.0000
				16	5	0		
				17	2	0		
T13				13	1	0	1.30E+08	1.0000
				14	2	0		
				12	1	0		
T16				22	6	1	2.43E+08	3.2146
				23	4	0		
				28	5	0		
T19				11	0	0	1.23E+08	4.1633
				17	1	0		
				9	0	0		
T22				16	2	0	1.60E+08	2.0000
				18	3	0		
				14	3	0		
T25				25	3	0	2.43E+08	0.5774
				24	2	0		
				24	0	0		
T36					2	0	4.00E+08	2.0000
					4	0		
					6	0		
T39				22	2	1	2.33E+08	0.5774
				20	2	1		
				19	3	0		
T41					6	0	6.00E+08	1.0000
					5	0		
					7	1		

Reactor C					
Tiempo (h)	Concentración (UFC/ml)	Concentración (g/L)	Desviación estándar		
0	1.70E+08	1.0000	1.7321	1.73E+07	0.2366
3	1.47E+08	0.8833	2.3094	2.31E+07	0.2655
4	1.60E+08	0.9500	1.0000	1.00E+07	0.2000
25	1.30E+08	0.8000	1.0000	1.00E+07	0.2000
28	2.43E+08	1.3667	3.2146	3.21E+07	0.3107
31	1.23E+08	0.7667	4.1633	4.16E+07	0.3582
34	1.60E+08	0.9500	2.0000	2.00E+07	0.2500
37	2.43E+08	1.3667	0.5774	5.77E+06	0.1789
47	4.00E+08	2.1500	2.0000	2.00E+08	1.1500
50	2.33E+08	1.3167	0.5774	5.77E+07	0.4387
52	6.00E+08	3.1500	1.0000	1.00E+08	0.6500

A.2.2 Datos del reactor continuo- RLA: SB, LR y LP

A.2.2.1 Medición de carbohidratos

Glucosa							
Reactor LA							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
24	0.0000	24	0.0000	24	0.0000	0.0000	0.0000
25	0.0000	25	0.0000	25	0.0226	0.0075	0.0130
26	0.0000	26	0.0000	26	0.0210	0.0070	0.0121
27	0.0473	27	0.0000	27	0.0146	0.0206	0.0242
28	0.0000	28	0.0000	28	0.0000	0.0000	0.0000
30	0.0000	30	0.0000	30	0.1637	0.0546	0.0945
31	0.1159	31	0.0720	31	0.0473	0.0784	0.0348
32	0.0000	32	0.0212	32	0.0236	0.0149	0.0130
33	0.1000	33	0.0938	33	0.0065	0.0668	0.0522
34	0.1281	34	0.0000	34	0.0000	0.0427	0.0739
35	0.0000	35	0.1145	35	0.1174	0.0773	0.0670
36	0.0000	36	0.0000	36	0.0000	0.0000	0.0000
37	0.0000	37	0.0000	37	0.0144	0.0048	0.0083
37.5	0.0000	38	0.0000	38	0.0000	0.0000	0.0000
47	0.0000	47	0.0000	47	0.1067	0.0356	0.0616
48	0.0000	48	0.0000	48	0.0136	0.0045	0.0079
49	0.0000	49	0.0194	49	0.0000	0.0065	0.0112
50	0.1274	50	0.0000	50	0.0777	0.0683	0.0642
51	0.0000	51	0.0000	51	0.0000	0.0000	0.0000
52	0.0000	52	0.0000	52	0.0369	0.0123	0.0213

Lactato							
Reactor LA							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
24	0.0000	24	0.0000	24	0.0056	0.0019	0.0032
25	0.0000	25	0.0000	25	0.0062	0.0021	0.0036
26	0.0000	26	0.0000	26	0.0051	0.0017	0.0029
27	0.0482	27	0.0270	27	0.0292	0.0348	0.0116
28	0.0399	28	0.0286	28	0.0221	0.0302	0.0090
30	0.1176	30	0.0975	30	0.1070	0.1074	0.0101
31	0.2695	31	0.2595	31	0.2415	0.2568	0.0142
32	0.1967	32	0.1823	32	0.1524	0.1771	0.0226
33	0.2398	33	0.2163	33	0.2125	0.2229	0.0148
34	0.4185	34	0.3986	34	0.3658	0.3943	0.0266
35	0.6035	35	0.6193	35	0.5921	0.6050	0.0137
36	0.5294	36	0.5241	36	0.5018	0.5184	0.0146
37	1.2742	37	1.3654	37	1.3778	1.3391	0.0566
37.5	0.5542	37.5	0.5551	37.5	0.5599	0.5564	0.0031
47	1.1524	47	1.1570	47	1.2040	1.1711	0.0285
48	0.4662	48	0.4645	48	0.4739	0.4682	0.0050
49	0.6234	49	0.6223	49	0.5860	0.6105	0.0212
50	0.6775	50	0.6737	50	0.6524	0.6679	0.0135
51	1.3825	51	1.3702	51	1.3435	1.3654	0.0199
52	1.1676	52	1.1281	52	1.1403	1.1453	0.0202

Sacarosa							
Reactor LA							
Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Promedio réplicas	Desviación estándar
Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
24	0.0000	24	0.0000	24	0.0000	0.0000	0.0000
25	0.0000	25	0.0000	25	0.0000	0.0000	0.0000
26	0.0100	26	0.0000	26	0.0000	0.0033	0.0058
27	0.0000	27	0.0000	27	0.0000	0.0000	0.0000
28	0.0000	28	0.0000	28	0.0000	0.0000	0.0000
30	0.0222	30	0.0000	30	0.0000	0.0074	0.0128
31	0.0000	31	0.0250	31	0.0210	0.0153	0.0134
32	0.0495	32	0.1315	32	0.1094	0.0968	0.0424
33	0.0143	33	0.1289	33	0.0778	0.0737	0.0574
34	0.0245	34	0.1934	34	0.0429	0.0869	0.0927
35	0.0521	35	0.0000	35	0.0195	0.0239	0.0263
36	0.0000	36	0.0000	36	0.0000	0.0000	0.0000
37	0.0000	37	0.0000	37	0.0002	0.0001	0.0001
37.5	0.0003	37.5	0.0361	37.5	0.0000	0.0121	0.0207
47	0.0625	47	0.0709	47	0.0000	0.0445	0.0387
48	0.0000	48	0.0000	48	0.0514	0.0171	0.0297
49	0.0000	49	0.0000	49	0.0000	0.0000	0.0000
50	0.0000	50	0.0000	50	0.0000	0.0000	0.0000
51	0.0000	51	0.0000	51	0.0000	0.0000	0.0000
52	0.0000	52	0.0000	52	0.0000	0.0000	0.0000

Microtécnica ácido sulfúrico-UV		
Sacarosa		
Reactor LA		
Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (g/L)
24	0.5570	0.0256
25	0.4980	0.0228
26	0.5420	0.0249
27	0.5000	0.0229
28	0.4770	0.0219
30	0.5740	0.0263
31	0.5430	0.0249
32	0.5350	0.0245
33	0.5040	0.0231
34	0.5140	0.0236
35	0.6130	0.0281
36	0.6100	0.0280
37	0.6060	0.0278
37.5	0.4890	0.0224
47	0.6250	0.0287
48	0.5580	0.0256
49	0.5450	0.0250
50	0.5100	0.0234
51	0.5830	0.0267
52	0.5140	0.0236

A.2.2.2 Medición de biomasa

Reactor LA- SB							
Muestra	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Concentración (UFC/mL)
T0			12	1			1.67E+08
			17	2			
			14	2			
T1	incontables	incontables	22	5			3.67E+08
	incontables	incontables	26	3			
	incontables	incontables	26	3			
T2	incontables	incontables	incontables	12			6.33E+08
	incontables	incontables	incontables	3			
	incontables	incontables	incontables	4			
T3	incontables	incontables	incontables	6			5.67E+08
	incontables	incontables	incontables	5			
	incontables	incontables	incontables	6			
T4	incontables	incontables	incontables	8			7.00E+08
	incontables	incontables	incontables	4			
	incontables	incontables	incontables	9			
T0'	incontables	incontables	16	2	1		1.67E+08
	incontables	incontables	14	1	2		
	incontables	incontables	12	2	0		
T1'	incontables	incontables	27	5	3		2.77E+08
	incontables	incontables	30	1	0		
	incontables	incontables	26	1	0		
T2'	incontables	incontables	incontables	4	0		3.33E+08
	incontables	incontables	incontables	4	1		
	incontables	incontables	incontables	2	0		
T3'	incontables	incontables	incontables	3	0		4.00E+08
	incontables	incontables	incontables	4	0		
	incontables	incontables	incontables	5	0		
T4'	incontables	incontables	incontables	12	0	0	1.13E+09
	incontables	incontables	incontables	12	2	0	
	incontables	incontables	incontables	10	0	0	
T5'	incontables	incontables	incontables	7	0	0	5.00E+08
	incontables	incontables	incontables	7	0	0	
	incontables	incontables	incontables	1	2	1	
T6'	incontables	incontables	incontables	9	0	1	9.67E+08
	incontables	incontables	incontables	10	0	0	
	incontables	incontables	incontables	10	2	0	
T7'	incontables	incontables	incontables	5	2	0	5.33E+08
	incontables	incontables	incontables	5	1	0	
	incontables	incontables	incontables	6	1	0	
T7.5'	incontables	incontables	incontables	6	0	0	8.00E+08
	incontables	incontables	incontables	10	1	0	
	incontables	incontables	incontables	8	0	0	
T9'	incontables	incontables	incontables	28	1	0	1.00E+09
	incontables	incontables	incontables	25	1	2	
	incontables	incontables	incontables	20	1	0	
T10'	incontables	incontables	incontables	12	1	1	1.37E+09
	incontables	incontables	incontables	19	0	0	
	incontables	incontables	incontables	10	2	0	
T11'	incontables	incontables	incontables	15	1	1	1.63E+09
	incontables	incontables	incontables	15	2	0	
	incontables	incontables	incontables	19	1	0	
T12'	incontables	incontables	incontables	15	1	0	1.67E+09
	incontables	incontables	incontables	19	0	0	
	incontables	incontables	incontables	16	2	0	
T13'	incontables	incontables	incontables	10	0	2	9.67E+08
	incontables	incontables	incontables	10	1	0	
	incontables	incontables	incontables	9	0	0	
T14'	incontables	incontables	incontables	22	3	0	2.07E+09
	incontables	incontables	incontables	19	3	1	
	incontables	incontables	incontables	21	2	0	

Reactor LA- LR y LP							
Muestra	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Concentración (UFC/mL)
T1	incontables	incontables	10	6			1.00E+08
	incontables	incontables	9	1			
	incontables	incontables	11	1			
T2	incontables	incontables	23	5			2.47E+08
	incontables	incontables	26	5			
	incontables	incontables	25	-			
T3	incontables	incontables	38	7			4.33E+08
	incontables	incontables	41	4			
	incontables	incontables	37	2			
T4	incontables	incontables	incontables	7			4.33E+08
	incontables	incontables	incontables	3			
	incontables	incontables	incontables	3			
T0'	incontables	incontables	19	3	0		2.67E+08
	incontables	incontables	20	2	0		
	incontables	incontables	14	3	1		
T1'	incontables	incontables	6	4	0		2.33E+08
	incontables	incontables	7	1	0		
	incontables	incontables	0	2	0		
T2'	incontables	incontables	incontables	2	0		2.67E+08
	incontables	incontables	incontables	3	0		
	incontables	incontables	incontables	3	0		
T3'	incontables	incontables	28	4	0		4.67E+08
	incontables	incontables	30	5	0		
	incontables	incontables	33	5	0		
T4'	incontables	incontables	12	1	2	0	5.33E+08
	incontables	incontables	10	8	0	0	
	incontables	incontables	11	7	1	0	
T5'	incontables	incontables	incontables	2	0	0	2.67E+08
	incontables	incontables	incontables	3	0	0	
	incontables	incontables	incontables	3	0	0	
T6'	incontables	incontables	incontables	8	1	0	7.00E+08
	incontables	incontables	incontables	6	1	0	
	incontables	incontables	incontables	7	0	0	
T7'	incontables	incontables	incontables	5	0		4.33E+08
	incontables	incontables	incontables	4	0		
	incontables	incontables	incontables	4	0		
T7.5'	incontables	incontables	incontables	5	0	0	6.67E+08
	incontables	incontables	incontables	7	0	0	
	incontables	incontables	incontables	8	1	0	
T9'	incontables	incontables	incontables	16	1	0	6.67E+08
	incontables	incontables	incontables	21	0	0	
	incontables	incontables	incontables	18	1	0	
T10'	incontables	incontables	incontables	9	2	0	7.00E+08
	incontables	incontables	incontables	5	0	0	
	incontables	incontables	incontables	7	3	0	
T11'	incontables	incontables	incontables	9	0	0	9.00E+08
	incontables	incontables	incontables	8	1	0	
	incontables	incontables	incontables	10	1	0	
T12'	incontables	incontables	incontables	14	3	0	1.53E+09
	incontables	incontables	incontables	15	3	0	
	incontables	incontables	incontables	17	0	0	
T13'	incontables	incontables	incontables	11	0	0	9.67E+08
	incontables	incontables	incontables	11	1	0	
	incontables	incontables	incontables	7	3	0	
T14'	incontables	incontables	incontables	26	2	0	1.67E+09
	incontables	incontables	incontables	26	2	1	
	incontables	incontables	incontables	20	1	0	

Reactor LA										
Tiempo (h)	Concentración (UFC/mL)		Concentración (g/L)		Desviación estándar (SB)			Desviación estándar (LR y LP)		
	SB	LR y LP	SB	LR y LP	Conteo	UFC/mL	g/L	Conteo	UFC/mL	g/L
24	1.67E+08		8.8333		0.5774	5.77E+06	0.7887			
25	3.67E+08	1.00E+08	18.8333	0.6500	1.1547	1.15E+07	1.0774	1.0000	1.00E+07	0.2000
26	6.33E+08	2.47E+08	32.1667	1.3833	4.9329	4.93E+08	25.1644	1.5275	1.53E+07	0.2264
27	5.67E+08	3.67E+08	28.8333	1.9833	0.5774	5.77E+07	3.3868	1.5275	1.53E+08	0.9138
28	7.00E+08	4.33E+08	35.5000	2.3167	2.6458	2.65E+08	13.7288	2.3094	2.31E+08	1.3047
30	1.67E+08	2.67E+08	8.8333	1.4833	0.5774	5.77E+07	3.3868	0.5774	5.77E+07	0.4387
31	2.77E+08	2.33E+08	14.3333	1.3167	2.0817	2.08E+07	1.5408	1.5275	1.53E+08	0.9138
32	3.33E+08	2.67E+08	17.1667	1.4833	1.1547	1.15E+08	6.2735	0.5774	5.77E+07	0.4387
33	4.00E+08	4.67E+08	20.5000	2.4833	1.0000	1.00E+08	5.5000	0.5774	5.77E+07	0.4387
34	1.13E+09	5.33E+08	57.1667	2.8167	1.1547	1.15E+08	6.2735	1.0000	1.00E+08	0.6500
35	5.00E+08	2.67E+08	25.5000	1.4833	3.4641	3.46E+08	17.8205	0.5774	5.77E+07	0.4387
36	9.67E+08	7.00E+08	48.8333	3.6500	0.5774	5.77E+07	3.3868	1.0000	1.00E+08	0.6500
37	5.33E+08	4.33E+08	27.1667	2.3167	0.5774	5.77E+07	3.3868	0.5774	5.77E+07	0.4387
37.5	8.00E+08	6.67E+08	40.5000	3.4833	2.0000	2.00E+08	10.5000	1.5275	1.53E+08	0.9138
47	1.00E+09	6.67E+08	50.5000	3.4833	0.0000	0.00E+00	0.5000	0.5774	5.77E+08	3.0368
48	1.37E+09	7.00E+08	68.8333	3.6500	4.7258	4.73E+08	24.1291	2.0000	2.00E+08	1.1500
49	1.63E+09	9.00E+08	82.1667	4.6500	2.3094	2.31E+08	12.0470	1.0000	1.00E+08	0.6500
50	1.67E+09	1.53E+09	83.8333	7.8167	2.0817	2.08E+08	10.9083	1.5275	1.53E+08	0.9138
51	9.67E+08	9.67E+08	48.8333	4.9833	0.5774	5.77E+07	3.3868	2.3094	2.31E+08	1.3047
52	2.07E+09	1.67E+09	103.8333	8.4833	1.5275	1.53E+08	8.1376	0.5774	5.77E+08	3.0368

Detector biomasa (SB)						
Tiempo (h)	Capacitancia (pF/cm)	Concentración teórica (cell/ml)	Concentración real (cell/ml)	Concentración teórica (g/L)	Concentración real (g/L)	
24	8.16	4.69E+10	4.72E+10	234.8724	2.36E+02	
25	7.76	4.46E+10	4.50E+10	223.3664	2.25E+02	
26	7.76	4.46E+10	4.50E+10	223.3664	2.25E+02	
27	7.57	4.36E+10	4.39E+10	217.90105	2.20E+02	
30	7.21	4.15E+10	4.19E+10	207.54565	2.09E+02	
31	7.11	4.09E+10	4.13E+10	204.66915	2.06E+02	
33	6.07	3.49E+10	3.52E+10	174.75355	1.76E+02	
34	5.53	3.18E+10	3.21E+10	159.22045	1.61E+02	
35	5.05	2.91E+10	2.93E+09	145.41325	1.48E+01	
36	4.34	2.50E+10	2.52E+10	124.9901	1.26E+02	
37	3.91	2.25E+10	2.27E+10	112.62115	1.14E+02	
37.5	3.71	2.13E+10	2.15E+10	106.86815	1.08E+02	
47	2.39	1.37E+10	1.40E+10	68.89835	7.02E+01	
48	2.26	1.30E+10	1.31E+10	65.1589	6.56E+01	
49	1.95	1.12E+10	1.14E+10	56.24175	5.73E+01	
50	1.66	9.55E+09	9.69E+09	47.8999	4.86E+01	
51	1.45	8.34E+09	8.44E+09	41.85925	4.24E+01	