

EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO Y OXÍGENO EN LA
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Bacillus megaterium* B2 A
PARTIR DE GLICEROL

VÍCTOR ALEXIS LIZCANO GONZÁLEZ
Ingeniero Químico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2018

EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO Y OXÍGENO EN LA
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Bacillus megaterium* B2 A
PARTIR DE GLICEROL

VÍCTOR ALEXIS LIZCANO GONZÁLEZ

Ingeniero Químico

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
Magister en Ingeniería Química

Director

Humberto Escalante Hernández

Ph.D. en Ingeniería Química

Codirectora

Mabel Juliana Quintero Silva

M.Sc. en Ciencias Básicas Biomédicas

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2018

DEDICATORIA

A mi amada esposa Karen, quien con su apoyo y amor hizo de este viaje una gran aventura, enseñándome que lo importante no es la meta sino con quién compartimos el camino.

A mis padres quienes siempre me impulsan a lograr mis objetivos y me brindan su confianza y oraciones.

A mis segundos padres, Don Alirio y Doña Celia.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, el profesor Humberto Escalante Hernández y la profesora Mabel Quintero Silva por todo el conocimiento transmitido, en especial los consejos que me ayudaron a crecer como investigador y como persona.

A la doctora Carolina Guzmán Luna, quien hace cinco años me dio su amistad y voto de confianza, lo cual me permitió alcanzar esta meta. A la doctora Marianny Combariza por el apoyo y confianza brindados. A Paolo por su amistad, por legarme su investigación y por las enseñanzas impartidas en el laboratorio.

Al doctor Luis Javier y a todos los integrantes del CICTA por tan excelente trato y hacerme sentir como un integrante más del grupo.

A Alexander, Anyely, Carlos, Diana, Fabián, Julieth, Leslie y Mónica por el excelente equipo de trabajo conformado y permitirme participar en su formación como ingenieros.

A COLCIENCIAS y a la Universidad Industrial de Santander por el apoyo económico y logístico, necesario para el desarrollo de esta maestría.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. SELECCIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE PHB A PARTIR DE GLICEROL CRUDO EMPLEANDO <i>B. megaterium</i> B2.....	23
1.1. INTRODUCCIÓN	24
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1.2.1. Microorganismo y medio de cultivo.....	29
1.2.2. Condiciones de cultivo.....	30
1.2.3. Métodos analíticos.....	30
1.2.4. Cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> B2 en medios de sales reportados en la literatura.....	32
1.2.5. Evaluación del efecto de las concentraciones de Na ₂ HPO ₄ y elementos traza en el crecimiento de <i>B. megaterium</i> B2	33
1.2.6. Cinéticas de producción de PHB por <i>Bacillus megaterium</i> B2 a partir de glicerol crudo empleando medios de sales modificados.	34
1.2.7. Adaptación de <i>B. megaterium</i> B2 al medio de sales seleccionado ...	34
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
1.3.1. Cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> B2 en en medios de sales reportados en la literatura.....	35
1.3.2. Evaluación del efecto de las concentraciones de Na ₂ HPO ₄ y elementos traza en el crecimiento de <i>B. megaterium</i> B2	37
1.3.3. Cinéticas de producción de PHB por <i>Bacillus megaterium</i> B2 a partir de glicerol crudo empleando medios de sales modificados	41
1.3.4. Adaptación de <i>B. megaterium</i> B2 al medio de sales seleccionado. ...	45
1.4. CONCLUSIONES	48

2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE N ₂ Y O ₂ EN LA PRODUCCIÓN DE PHB	49
2.1. INTRODUCCIÓN	51
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	55
2.2.1. Microorganismo y medio de cultivo.....	55
2.2.2. Condiciones de cultivo.....	55
2.2.3. Métodos analíticos.....	55
2.2.4. Influencia de la concentración de N ₂ y O ₂ en la concentración máxima de PHB	56
2.2.5. Influencia de la concentración de N ₂ y O ₂ sobre parámetros cinéticos de la producción de PHB a partir de glicerol.	58
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
2.3.1. Influencia de la concentración de N ₂ y O ₂ en la concentración máxima de PHB	59
2.3.2. Influencia de la concentración de N ₂ y O ₂ sobre parámetros cinéticos de la producción de PHB a partir de glicerol.....	66
2.4. CONCLUSIONES	69
3. DESARROLLO DE METODOLOGÍA PARA CULTIVO TIPO FED-BATCH DE <i>Bacillus megaterium</i> B2	70
3.1. INTRODUCCIÓN	72
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	79
3.2.1. Microorganismo y medio de cultivo.....	79
3.2.2. Condiciones de cultivo.....	79
3.2.3. Métodos analíticos.....	80
3.2.4. Cultivo en modo Batch.....	80
3.2.5. Modelado y simulación del proceso	80

3.2.6. Estrategia de cultivo Fed–Batch basada en simulación	85
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
3.3.1. Cultivo en modo Batch.....	89
3.3.2. Modelado y simulación del proceso	90
3.3.3. Estrategia de cultivo Fed – Batch basada en simulación	102
3.4. CONCLUSIONES	110
CONCLUSIONES GENERALES.....	111
BIBLIOGRAFÍA	112

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Ejemplos de medios mínimos de sales empleados para la producción de PHB por <i>B. megaterium</i>	25
Tabla 2. Ejemplo de composición de elementos traza empleados para la producción de PHB por <i>B. megaterium</i>	27
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del glicerol crudo empleado por Moreno <i>et al.</i> , 2015	29
Tabla 4. Diseño experimental propuesto para el estudio de la influencia de la concentración de elementos traza y fosfato ácido de sodio en el crecimiento de <i>B. megaterium</i> B2.....	33
Tabla 5. Comparación de parámetros cinéticos alcanzados en cultivos de <i>B. megaterium</i> B2 con diferentes medios de cultivo.....	44
Tabla 6. Formulación del medio de cultivo propuesto para la producción de PHB empelando <i>Bacillus megaterium</i> B2	45
Tabla 7 Diseño de experimentos para la evaluación de la influencia de la concentración de N ₂ y O ₂	56
Tabla 8. Orden de ejecución del diseño experimental factorial multinivel para el estudio de la influencia de la relación C/N y el OD sobre la producción de PHB ..	57
Tabla 9. Máxima concentración de PHB (g/L) alcanzada en cada experimento ...	63
Tabla 10. Análisis de varianza para la concentración de PHB.....	64
Tabla 11. Producciones de PHB reportadas para diferentes cepas de <i>Bacillus megaterium</i> para cultivos Batch y Fed-Batch	74
Tabla 12. Expresiones para la velocidad específica de crecimiento usadas para diferentes procesos de producción de PHB	76
Tabla 13. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento empleando la Ecuación 16.	91

Tabla 14. Parámetros cinéticos asociados a la velocidad específica de crecimiento	94
Tabla 15. Comparación entre la velocidad específica de crecimiento teórica y experimental	94
Tabla 16. Parámetros cinéticos asociados con la producción de PHB	95
Tabla 17. Estimación inicial de los parámetros cinéticos asociados al consumo de PHB por <i>Bacillus megaterium</i> B2	97
Tabla 18. Parámetros cinéticos de consumo de glicerol no asociado al crecimiento	97
Tabla 19. Parámetros cinéticos de consumo de glicerol asociados al crecimiento	98
Tabla 20. Parámetros cinéticos asociados al consumo de nitrógeno	98
Tabla 21. Estimación preliminar de los parámetros cinéticos asociados al consumo de oxígeno	99
Tabla 22. Parámetros cinéticos estimados para la producción de PHB por <i>Bacillus megaterium</i> B2 a partir de glicerol.....	99
Tabla 23. Coeficiente de correlación R^2 entre los datos experimentales y los simulados para cada variable.....	102

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura del poli-3-hidroxi-butirato	17
Figura 2. Variación de pH en cultivos de <i>Bacillus megaterium</i> B2 empleando los medios M1C, M2P, M2C y M2P.	35
Figura 3. Variación de turbidez en cultivos de <i>Bacillus megaterium</i> B2 empleando los medios M1C, M1P, M2C y M2P	36
Figura 4. Variación de pH en cultivos de <i>Bacillus megaterium</i> B2 empleando los medios M2C y M2P	37
Figura 5. Variación de turbidez en cultivos de <i>Bacillus megaterium</i> B2 empleando los medios M2C y M2P	37
Figura 6. Variación de pH para los experimentos ET ₁ F _{1,19} , ET _{0,1} F ₉ y ET _{0,1} F _{1,19} empleando glicerol puro	38
Figura 7. Variación de turbidez para los experimentos ET ₁ F _{1,19} , ET _{0,1} F ₉ y ET _{0,1} F _{1,19} empleando glicerol puro	38
Figura 8. Variación de pH para los experimentos ET ₁ F _{1,19} , ET _{0,1} F ₉ y ET _{0,1} F _{1,19} empleando glicerol crudo	39
Figura 9. Variación de turbidez para los experimentos ET ₁ F _{1,19} , ET _{0,1} F ₉ y ET _{0,1} F _{1,19} empleando glicerol crudo	39
Figura 10. Perfiles de concentración de glicerol para los medios M2C ET _{0,1} F ₉ , M2C ET _{0,1} F _{1,19} y M1C suplementados con 20 g/L de glicerol crudo.....	41
Figura 11. Perfiles de producción de biomasa para los medios M2C ET _{0,1} F ₉ , M2C ET _{0,1} F _{1,19} y M1C suplementados con 20 g/L de glicerol crudo.....	42
Figura 12. Perfiles de producción de PHB para los medios M2C ET _{0,1} F ₉ , M2C ET _{0,1} F _{1,19} y M1C suplementados con 20 g/L de glicerol crudo.....	42
Figura 13. Curva de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> B2 en caldo nutritivo con 7.6 g/L de glicerol crudo	46

Figura 14. Recuento de células viables para cultivos en el medio de sales propuesto para diferentes concentraciones de glicerol crudo.....	47
Figura 15. Ciclo de la síntesis y degradación de PHB	52
Figura 16. Cinéticas de producción de PHB para la relación C/N 10 y todas las condiciones de OD.....	60
Figura 17. Cinéticas de producción de PHB para la relación C/N 25 y todas las condiciones de OD.....	61
Figura 18. Cinéticas de producción de PHB para la relación C/N 40 y todas las condiciones de OD.....	62
Figura 19. Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de PHB.....	64
Figura 20. Contornos de la superficie de respuesta estimada para la máxima concentración de PHB	65
Figura 21. Diagramas de Pareto estandarizados para los rendimientos a. yp/s , b. yp/x y c. yx/s	66
Figura 22. Diagramas de Pareto estandarizados para a. Productividad volumétrica y b. Porcentaje de acumulación de PHB	68
Figura 23. Cinética de producción de PHB por <i>Bacillus megaterium</i> B2 para una relación C/N = 10 y OD = 3,5 mg/L.	89
Figura 24. Variación en la velocidad específica de crecimiento en función de los sustratos limitantes: a. Glicerol, b. Oxígeno y c. Nitrógeno.....	92
Figura 25. Consumo específico de PHB vs tiempo	96
Figura 26. Comparación entre los datos experimentales y los simulados para la producción de PHB por <i>B. megaterium</i> B2.....	100
Figura 27. Comparación de los datos experimentales y simulados de la velocidad específica de crecimiento.....	101
Figura 28. Simulación del cultivo en modo Fed-Batch con limitación de Nitrógeno	102
Figura 29. Volumen de cultivo y flujo de alimentación para el cultivo Fed-Batch con limitación de nitrógeno	104
Figura 30. Datos experimentales de cultivo Fed-Batch con limitación de nitrógeno	105

Figura 31. Simulación del cultivo en modo Fed-Batch con limitación de Oxígeno	106
Figura 32. Volumen de cultivo y flujo de alimentación para el cultivo Fed-Batch con limitación de oxígeno	107
Figura 33. Datos experimentales de cultivo Fed-Batch con limitación de oxígeno	108

RESUMEN

Título: Efecto de las concentraciones de nitrógeno y oxígeno en la producción de polihidroxi butirato por *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol¹.

Autor: Víctor Alexis Lizcano González²

Palabras clave: Bioplásticos, Bioprocesos, Modelo cinético, PHB, Fermentación.

Descripción:

El polihidroxi butirato (PHB) es un plástico biodegradable, biocompatible y termoplástico sintetizado por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se evaluaron dos medios de sales empleados para la producción de PHB por cepas de *Bacillus megaterium*. Se observó inhibición del crecimiento y de la formación de PHB debido a concentraciones de elementos traza de 1 mL/L y de fosfato ácido de sodio de 9 g/L, respectivamente. Se propuso un medio basal para la producción de PHB a partir de glicerol crudo. Se realizó un diseño experimental para el estudio del efecto de las concentraciones de nitrógeno y oxígeno sobre el proceso de producción de PHB. Se alcanzó una producción de PHB de 1,6 g/L en la mejor condición de cultivo en un reactor de 7,5 litros con un volumen de trabajo de 4 litros. Este valor corresponde a un incremento del 33% de la producción de PHB con respecto a los valores reportados anteriores para esta cepa. Se desarrolló un modelo matemático que permite describir el crecimiento del microorganismo, el consumo de sustratos, la formación de producto y simular diferentes estrategias de cultivo. Se tuvo en cuenta como sustratos limitantes el oxígeno, el glicerol y el nitrógeno de acuerdo con las ecuaciones Monod y Moser. Para describir la producción de PHB se utilizó la ecuación de Luedeking-Piret y se incluyó un término de consumo de PHB debido al agotamiento de la fuente de carbono. Se ajustaron los parámetros cinéticos para el modelo en modo Batch y se simuló dos estrategias de cultivo Fed-Batch. La mejor estrategia de alimentación en *Fed-batch*, permitió una producción de PHB de 2,79 g/L, siendo la mejor condición tanto experimentalmente como en la simulación.

¹ Trabajo de Grado de Maestría en ingeniería química.

² Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Dr. Humberto Escalante Hernández. Codirectora: M. Sc. Mabel Juliana Quintero Silva.

ABSTRACT

Title: Effect of nitrogen and oxygen concentrations in the production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus megaterium* B2 from glycerol³.

Author: Víctor Alexis Lizcano González⁴

Keywords: Bioplastics, Bioprocesses, Kinetic Model, PHB, Fermentation

Description:

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable, biocompatible and thermoplastic polymer synthesized by Gram-positive and Gram-negative bacteria. Two media used to produce PHB by strains of *Bacillus megaterium* were evaluated. Inhibition of growth and formation of PHB was observed due to trace element and sodium acid phosphate concentrations of 1 mL/L and 9 g/L, respectively. A basal medium was proposed for the production of PHB from crude glycerol. An experimental design was carried out to study the effect of nitrogen and oxygen concentrations on the production of PHB. A PHB production of 1.6 g/L was achieved in the best culture condition in a 7.5 liters reactor with a working volume of 4 liters. This value corresponds to an increase of 33% of the production of PHB according to the values previously reported for this strain. A mathematical model that describes microorganism growth, substrate consumption, product formation and allows to simulate different cultivation strategies was developed. Oxygen, glycerol and nitrogen were considered as limiting substrates according to the Monod and Moser equations. The Luedeking-Piret equation was used to describe PHB production, and a term that describe PHB consumption due to depletion of the carbon source was included. The kinetic parameters were adjusted for the model in Batch mode and two Fed-Batch cultivation strategies were simulated. The best feeding strategy in Fed-batch allowed a PHB production of 2.79 g / L, being the best condition both experimental and in the simulation.

³ Thesis to obtain the master's degree in chemical engineering.

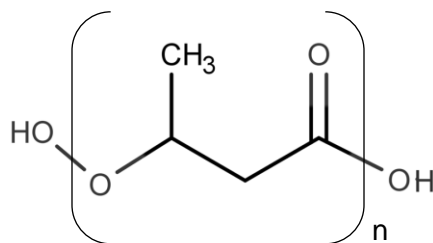
⁴ Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Dr. Humberto Escalante Hernández. Codirectora: M. Sc. Mabel Juliana Quintero Silva.

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de plásticos crece en promedio un 5,8% anual, alcanzando en 2015 una producción de 322 millones de toneladas métricas¹. Como respuesta a los problemas ambientales y económicos generados por el uso excesivo de polímeros derivados del petróleo, se ha planteado el uso de bioplásticos, los cuales han tenido un rápido desarrollo durante los últimos años².

El polihidroxibutirato (PHB) es un poliéster sintetizado y acumulado por una gran variedad de microorganismos. El PHB es un polímero de cadena corta, degradable en condiciones aerobias³ y cuya estructura se muestra en la Figura 1. El PHB, una vez extraído cristaliza para formar un polímero con propiedades similares al polipropileno, convirtiéndolo en un sustituto biodegradable de los termoplásticos. El PHB se ha empleado en aplicaciones como embalaje de productos, productos desechables de higiene personal, biomedicina y en agricultura⁴.

Figura 1. Estructura del poli-3-hidroxibutirato



Fuente: Sindhu *et al.*, 2015

¹ PlasticEurope. Plastics-The Facts 2016: An analysis of European plastics production, demand and waste data. Alemania, Plastics shape the future, 2016.

² CHEN, Guo-Qiang. Introduction of Bacterial Plastics PHA, PLA, PBS, PE, PTT, and PPP. *En: Plastics from Bacteria: Natural functions and Applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, vol. 14, p. 1-16. ISBN: 978-3-642-03287-5.

³ SINDHU, *et al.* Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Crude Glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and Improving Its Thermal Properties. *En: Brazilian Archives of Biology and Technology*. Julio-agosto, 2011, vol. 54, no. 4, p. 783-794.

⁴ GANGURDE, N. S. y SAYYED, R. Z. Poly-β-hydroxybutyrate (PHB): A Biodegradable Polymer of Microbial Origin. *En: THOMAS, Sabu, NINAN, Neethu, MOHAN, Sneha y FRANCIS, Elizabeth. Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends, and IPNs*. Apple Academic Press, 2012, vol. 2, p. 370.

El PHB fue descrito por primera vez en 1925 y se ha convertido en el polihidroxicanoato (PHA) más estudiado y de mayor producción a escala industrial en la actualidad⁵. Actualmente, los esfuerzos en investigación se centran en la búsqueda de materias primas renovables y de bajo costo, selección de nuevas cepas bacterianas y aumento de la producción⁶. El aumento en la producción involucra la optimización de las condiciones de cultivo y las estrategias de alimentación⁷.

El PHB puede ser producido tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas. En la actualidad, la producción industrial de PHB es llevada a cabo principalmente usando cepas Gram negativas como *Cupriavidus necator* y *Alcaligenes latus* (actualmente renombrada como *Azohydromonas lata*⁸), las cuales pueden acumular hasta un 80% p/p de PHB. Sin embargo, las cepas Gram positivas han sido de gran interés para la producción de bioplásticos debido a múltiples ventajas operacionales como la ausencia de lipopolisacáridos y el rápido crecimiento a partir de sustratos de bajo costo⁹.

⁵ FACCIN, Debora Jung Luvizetto, *et al.* Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Marzo, 2013, vol. 48, no. 3, p. 420-425.

⁶ SHAHID, Salma, *et al.* Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Septiembre, 2013, vol. 116, no. 3, p. 302-308.

⁷ PANDIAN, Sureshbabu RamKumar, *et al.* Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. En: Bioresource Technology. Enero, 2010, vol. 101, no. 2, p. 705-711.

⁸ XIE, Cheng-Hui y Yokota, Akira. Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. En: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Noviembre, 2005, vol. 55, no. 6, p. 2419-2425.

⁹ LÓPEZ, Jimmy A., *et al.* Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. En: Biotechnology and Bioprocess Engineering. Abril, 2012, vol. 17, no. 2, p. 250-258.

Entre las diferentes cepas Gram positivas, se destaca *Bacillus megaterium*¹⁰. El género *Bacillus* crece rápidamente a partir de sustratos económicos, y tolera altas temperaturas y presiones osmóticas¹¹. En 2015 se reportó el uso de una cepa nativa de *Bacillus megaterium* (Denominada *Bacillus megaterium* B2) aislada por el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales CEIAM de la Universidad Industrial de Santander, capaz de producir PHB a partir de glicerol crudo¹².

El glicerol crudo es el principal subproducto de la producción del biodiesel, y se genera a una razón de 10% p/p¹³. Siendo Colombia uno de los principales fabricantes de biodiesel en Latinoamérica, en 2016 la producción fue de 447 kilotoneladas¹⁴, lo cual representa aproximadamente 45 mil toneladas de glicerol. A pesar de ser un componente inhibitorio del crecimiento para varios microorganismos¹⁵, el glicerol crudo residuo de la industria del biodiesel (GRIB) se presenta como una materia prima atractiva para la producción de PHB debido a su bajo precio y a la posibilidad de ser empleado como fuente de carbono en cultivos microbianos^{16 17}.

Además de la fuente de carbono a emplear, otro aspecto importante son las condiciones de operación de los procesos microbiológicos. Se han reportado en la

¹⁰ RODRÍGUEZ-CONTRERAS, *et al.* Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology. Enero, 2016, vol. 33, no. 1, p. 73-77.

¹¹ FACCIN, Debora Jung Luvizetto, *et al.* Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Marzo, 2012, vol. 87, no. 3, p. 325-333.

¹² MORENO, Paalo, *et al.* Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology. Diciembre, 2015, vol. 32, no. 6, p. 682-689.

¹³ POSADA, John A., *et al.* Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. En: Process Biochemistry. Enero, 2011, vol. 46, no. 1, p. 310-317.

¹⁴ Federación Nacional de Biocombustibles. Producción y Venta de Biodiesel [en línea]. Disponible en internet: <http://www.fedebiocombustibles.com/estadistica-produccion-titulo-Biodiesel.htm>

¹⁵ SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, Daria. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. En: Electronic Journal of Biotechnology. Marzo, 2015, vol. 18, no. 2, p. 128-133.

¹⁶ DA SILVA, Gervásio Paulo, *et al.* Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Review. En: Biotechnology Advances. Enero-febrero, 2009, vol. 27, no. 1, p. 30-39.

¹⁷ MORENO *et al.* Op. cit.

literatura diversos estudios sobre la optimización de las condiciones de cultivo para la producción de PHB empleando diferentes microorganismos. Las variables más estudiadas son la concentración de sustrato, nitrógeno, oxígeno, fósforo y minerales^{18 19 20}.

Entre las variables estudiadas, resalta el efecto de las concentraciones de nitrógeno y oxígeno, el cual puede explicarse mediante el análisis del ciclo metabólico para la síntesis y degradación de PHB. El Acetil-CoA formado a partir de la fuente de carbono, puede iniciar el ciclo de la respiración celular, la producción de PHB o la producción de acetato. En ausencia de fuente de nitrógeno, el microorganismo productor de PHB no puede sintetizar efectivamente aminoácidos, por lo que se inhibe la producción de biomasa. El exceso de energía generado en la respiración celular es entonces empleado en la producción de PHB. Por otra parte, la limitación de oxígeno dificulta el ciclo de la respiración celular por lo que el microorganismo emplea energía en la producción de PHB como estrategia de almacenamiento de fuente de carbono²¹.

El análisis del metabolismo de la producción de PHB, muestra que al ser *B. megaterium* un microorganismo aerobio hay un efecto combinado entre las concentraciones de oxígeno y nitrógeno en el medio de cultivo, sobre la producción de PHB.

¹⁸ GAHLAWAT, Geeta y SRIVASTAVA, Ashok K. Estimation of Fundamental Kinetic Parameters of Polyhydroxybutyrate Fermentation Process of *Azohydromonas australica* Using Statistical Approach of Media Optimization. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Noviembre, 2012, vol. 168, no. 5, p. 1051-1064.

¹⁹ MOKHTARI-HOSSEINI, Zahra B., *et al.* Statistical media optimization for growth and PHB production from metanol by a methylotrophic bacterium. En: Bioresource Technology. Abril, 2009, vol. 100, no. 8, p. 2436-2443.

²⁰ NIKEL, Pablo I., *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glicerol by a recombinant *Escherichia coli* arcA mutant in fed-batch microaerobic cultures. En: Applied Microbiology and Biotechnology. Enero, 2008, vol. 77, no. 6, p. 1337-1343.

²¹ BABEL, Wolfgang, *et al.* Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Mayo, 2001, vol. 71, p. 125-157.

Complementario a los estudios nutricionales, se han reportado investigaciones sobre la producción de PHB en modo Batch y en modo Fedbatch con diferentes estrategias de alimentación^{22 23 24}. En general, se han logrado mayores productividades empleando cultivos en modo Fedbatch, debido a que este posee ventajas como: producción de altas masas celulares, prolongación controlada de una o más fases del crecimiento microbiano y posibilidad de manejar bajas concentraciones de sustratos que pueden ser inhibitorios al crecimiento microbiano o a la producción del metabolito de interés²⁵. El diseño de estrategias de alimentación para cultivos semi-continuos incluye el estudio de las cinéticas del proceso en modo Batch y el desarrollo de modelos matemáticos que describan el proceso^{26 27}. Con la alimentación periódica de uno o más sustratos, se busca operar en concentraciones no inhibitorias de dichos nutrientes, por lo que una estrategia complementaria para el desarrollo de cultivos Fed-Batch, es el aumento de la tolerancia del microorganismo a las sustancias inhibitorias²⁸.

El uso de un sustrato potencialmente inhibitorio del crecimiento, el efecto combinado de las concentraciones de nitrógeno y oxígeno sobre la producción de PHB y la posibilidad de mejora mediante la aplicación de cultivos Fed-Batch, muestra la necesidad de realizar estudios propios de estos factores sobre la nueva

²² FACCIN, Debora Jung Luvizetto, *et al.* Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Marzo, 2012, vol. 87, no. 3, p. 325-333.

²³ GAHLAWAT, Geeta y SRIVASTAVA, Ashok K. Development of a mathematical model for the growth associated Polyhydroxybutyrate fermentation by *Azohydromonas australica* and its use for the design of fed-batch cultivation strategies. En: Bioresource Technology. Junio, 2013, vol. 137, p. 98-105.

²⁴ PENLOGLOU, Giannis, *et al.* Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: An integrated modelling approach and experimental validation. En: Biotechnology Advances. Enero-febrero, 2012, vol. 30, no. 1, p. 329-337.

²⁵ CLARKE, Kim Gale. Bioprocess Engineering: An Introductory Engineering and Life Science Approach. Woodhead Publishing Limited, 2013, 266 p. ISBN: 978-1-78242-168-9.

²⁶ GAHLAWAT, Geeta y SRIVASTAVA, Ashok K. Model-Based Nutrient Feeding Strategies for the Increased Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Octubre, 2017, vol. 183, no. 2, p. 530-542.

²⁷ MOZUMDER, Md. Salatul Islam, *et al.* Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB). En: Bioresource Technology. Marzo, 2014, vol. 155, p. 272-280.

²⁸ MACAULEY-PATRICK, Sue y FINN, Beverley. Modes of Fermenter Operation. En: MCNEIL, Brian y HARVEY, Linda M. Practical Fermentation Technology. Wiley, 2008, 402 p. ISBN: 978-0-470-01434-9.

cepa nativa. Por lo anterior, el presente trabajo de investigación planteó como objetivo principal: evaluar la producción de polihidroxiбутirato a partir de glicerol empleando *Bacillus megaterium* B2, mediante el estudio de la influencia de las concentraciones de nitrógeno y oxígeno y la aplicación de cultivos tipo Fed-Batch.

Esta memoria escrita de la investigación se ha dividido en tres capítulos, así: en el primero se detallan los resultados obtenidos de la selección del medio de cultivo y la adaptación de *B. megaterium* sp, en el segundo se presentan los resultados del estudio de la influencia del oxígeno disuelto (OD) y concentración de nitrógeno (N₂) sobre la producción y acumulación de PHB y finalmente, en el tercer capítulo se desarrollan el modelo matemático del proceso y estrategias de cultivo en modo Fed-Batch con el fin de incrementar la producción de PHB.

1. SELECCIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE PHB A PARTIR DE GLICEROL CRUDO EMPLEANDO *B. megaterium* B2

Resumen:

En este capítulo se presentan los resultados del primer objetivo de la presente tesis de maestría: Evaluar el efecto de la concentración de glicerol sobre el crecimiento de *Bacillus megaterium* B2. Se presenta la selección y modificación de medios de cultivo reportados en la literatura para la producción de PHB empleando cepas de *Bacillus megaterium* y la influencia que tiene la concentración de glicerol sobre el crecimiento de la cepa.

Para cumplir con el objetivo planteado en este capítulo, se evaluó experimentalmente el crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 en dos medios mínimos de sales. Se observó inhibición del crecimiento y baja formación de PHB debido a concentraciones de elementos traza de 1 mL/L y de Na₂HPO₄ de 9 g/L. Se alcanzó una concentración de 0,9 g/L de PHB tras 30 horas de fermentación con el medio seleccionado.

Una vez definida la composición del medio de cultivo, se evaluó el crecimiento de *B. megaterium* B2 para concentraciones iniciales de glicerol crudo de 7,6 g/L, 10,7 g/L, 13,8 g/L, 16,9 g/L y 20 g/L. Se logró la adaptación del microorganismo al nuevo medio de cultivo con concentraciones iniciales de glicerol crudo de 20 g/L, alcanzándose densidades celulares de 1x10⁸ UFC/mL.

1.1. INTRODUCCIÓN

Los procesos biológicos implican el desarrollo de reacciones químicas complejas que conllevan a la formación de moléculas específicas. Los requerimientos nutricionales de un microorganismo son un factor muy importante para el adecuado crecimiento, mantenimiento celular y formación de producto. Adicional a las fuentes de carbono y nitrógeno, se deben suministrar macro y micronutrientes y en algunos casos vitaminas y antibióticos²⁹.

La presencia de los componentes necesarios para la construcción de dichas moléculas es un factor de vital importancia al momento de estudiar la producción de metabolitos de interés y es la cepa por trabajar quien determinará los requerimientos nutricionales que deben ser suplementados en el medio de cultivo³⁰.

B. megaterium es un microorganismo aerobio, Gram positivo, de cuerpo cilíndrico con un tamaño de entre 1,2 y 1,5 μm de ancho y entre 2,0 y 5,0 μm de largo; en el microscopio se observa de forma individual, en pares o en cadenas y suele formar esporas elipsoidales; sus colonias pueden ser redondas u ovaladas, con un aspecto brillante. *B. megaterium* es una cepa aerobia estricta e incapaz de asimilar nitratos. *B. megaterium* puede ser cultivada en agares nutritivos, agar sangre o medios mínimos de sales, siendo estos últimos los más indicados para la producción de PHB³¹. Aunque la especie es conocida desde hace casi un siglo, el medio de cultivo varía con cada sub especie y no hay una directriz sobre la formulación teórica de un medio basal para *B. megaterium*.

²⁹ CLARKE, Kim Gale. Bioprocess Engineering: An Introductory Engineering and Life Science Approach. Woodhead Publishing Limited, 2013, 266 p. ISBN: 978-1-78242-168-9.

³⁰ MADIGAN, Michael T., *et al.* Biología de los microorganismos. 10 ed. Pearson Education, 2003, 1096 p. ISBN: 9788420536798.

³¹ SCHLEIFER, Karl-Heinz. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. 2 ed. Springer Science & Business Media, 2011, 1450 p. ISBN: 9780387684895.

En la **Tabla 1** se presentan ejemplos de medio mínimos de sales empleados para la producción de PHB con *Bacillus megaterium*, a partir de diferentes fuentes de carbono. Las cantidades agregadas de ciertos componentes fueron recalculadas para reportar los valores en base seca. Todos los medios presentados son medios definidos y se destaca la ausencia en todos los casos de vitaminas y antibióticos lo que muestra la resistencia de la especie.

Tabla 1. Ejemplos de medios mínimos de sales empleados para la producción de PHB por *B. megaterium*

Componente	Unidad	Rodríguez-Contreras et al., 2013	Shahid et al., 2013	Naranjo et al., 2013	Moreno et al., 2015
Glucosa	g/L	10	-	-	-
Glicerol crudo	g/L	-	-	-	7,6
Glicerol puro	g/L	-	5	20	-
Na ₂ HPO ₄	g/L	-	5,71	9	1,19
KH ₂ PO ₄	g/L	5	3,6	1,5	1,5
MgSO ₄	g/L	0,2	0,244	0.01	0,01
NaCl	g/L	0,9	0,015	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	2	3	1	1,5
CaCl ₂	mg/L	15	38	*	7,5
NH ₄ Fe(III) citrato	g/L	0,05	-	-	-
FeSO ₄	mg/L	-	4,9	*	*
Ácido cítrico	g/L	-	-	-	0,01
Elementos Traza**	mL/L	1	1	1	1

*Adicionado en los elementos traza

** La composición varía entre trabajos

Del análisis de la Tabla 1 se puede inferir los macronutrientes esenciales para *B. megaterium*. Los componentes en común en todos los medios son: fosfatos, sulfatos, Na, Mg, K, amonio, Cl, Ca y hierro.

El fósforo es necesario para la formación de ácidos nucleicos y fosfolípidos. El sodio es requerido principalmente por microorganismos marinos como es el caso de la cepa BBST4 empelada por Naranjo et al., 2013. El potasio es necesario en todos los microorganismos, principalmente para la síntesis de proteínas. La función del magnesio está relacionada con la estabilización de las membranas celulares, los ribosomas y los ácidos nucleicos. El azufre es componente estructural de aminoácidos y vitaminas, así como como en la coenzima A³².

El Ca ayuda a estabilizar la pared celular bacteriana y da termo resistencia a las endoesporas. El hierro es fundamental en la respiración celular y para las proteínas implicadas en el transporte de electrones. En bajas concentraciones de Hierro, algunas bacterias pueden producir compuestos sideróforos que facilitan la asimilación de este nutriente³³. La presencia de NH₄Fe(III) citrato y ácido cítrico puede estar relacionada con el transporte de hierro, puesto que el ácido cítrico es un agente quelante³⁴.

Los elementos traza (ET) juegan también un rol importante en los procesos biológicos. En la Tabla 2 se muestra la formulación de los elementos traza empleados en dos medios de sales reportados en la literatura.

En las dos formulaciones de elementos traza mostradas en la Tabla 2 se observa el uso de los mismos oligoelementos a excepción del cobalto y el níquel. La

³² MADIGAN, Michael T., *et al.* Biología de los microorganismos. 10 ed. Pearson Education, 2003, 1096 p. ISBN: 9788420536798.

³³ *Ibíd.*

³⁴ KHAN, Imran, *et al.* Organic chelants-mediated enhanced lead (Pb) uptake and accumulation is associated with higher activity of enzymatic antioxidants in spinach (*Spinacea oleracea* L.). *En: Journal of Hazardous Materials*. Noviembre, 2016, vol. 317, p. 352-361.

función principal de los elementos traza es ser cofactores de enzimas y su uso específico puede variar entre microorganismos³⁵. Es de resaltar que los elementos traza del Medio 2 tienen concentraciones más elevadas en comparación con las del Medio 1.

Tabla 2. Ejemplo de composición de elementos traza empleados para la producción de PHB por *B. megaterium*

Componente	Unidad	Moreno <i>et al.</i> , 2015	Naranjo <i>et al.</i> , 2013
Sulfato de hierro heptahidratado	g/L	20	10
Sulfato de zinc heptahidratado	g/L	0,03	2,25
Sulfato de cobre pentahidratado	g/L	0,01	1
Cloruro de manganeso tetrahidratado	g/L	0,03	-
Sulfato de manganeso tetrahidratado	g/L	-	0,5
Cloruro de cobalto hexahidratado	g/L	0,2	-
Cloruro de calcio dihidratado	g/L	-	2
Ácido bórico	g/L	0,3	0,23
Molibdato de amonio	g/L	0,03	0,2
Sulfato de níquel heptahidratado	g/L	0,03	-
Ácido clorhídrico	mL/L	-	10

Con respecto a la fuente de carbono, esta puede ser suministrada en forma pura o en una mezcla. Se debe analizar la naturaleza de la fuente de carbono y los contaminantes que vienen en la materia prima. El glicerol es conocido por ser un inhibidor del crecimiento para muchos microorganismos, por lo que se debe evitar exponer las cepas bacterianas a concentraciones que las afecten

³⁵ MADIGAN, Michael T., *et al.* Biología de los microorganismos. 10 ed. Pearson Education, 2003, 1096 p. ISBN: 9788420536798.

negativamente³⁶. Sumado a lo anterior, cuando se emplea glicerol crudo se deben conocer los posibles contaminantes presentes en este. El glicerol crudo residuo de la industria del biodiesel (GRIB) se genera durante el proceso de transesterificación de aceites o grasas³⁷. La reacción puede darse en condiciones ácidas o básicas y conlleva a la presencia de impurezas como metanol, jabones, ácidos grasos libres y metales, los cuales pueden ser inhibitorios del crecimiento microbiano³⁸.

La variabilidad de medios de cultivo y condiciones empleadas para la producción de PHB por *Bacillus megaterium*, aún cuando se usa glicerol como fuente de carbono, conlleva a plantear la necesidad de seleccionar y evaluar diferentes medios de cultivo con el fin de garantizar un óptimo crecimiento del microorganismo y producción de PHB.

³⁶ SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, Daria. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. En: Electronic Journal of Biotechnology. Marzo, 2015, vol. 18, no. 2, p. 128-133.

³⁷ MONTEIRO, Marcos Roberto, *et al.* Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. Review. En: Talanta. Diciembre, 2008, vol. 77, no. 2, p. 593-605.

³⁸ SAMUL, Dorota, *et al.* Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. En: Annals of Microbiology. Septiembre, 2014, vol. 64, no. 3, p. 891-898.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Microorganismo y medio de cultivo *Bacillus megaterium* B2 es una cepa nativa aislada por el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM) de la Universidad Industrial de Santander. Se ha reportado previamente la capacidad de B2 de producir PHB a partir de GRIB³⁹.

Se seleccionaron y evaluaron dos medios mínimos de sales para los ensayos de producción de PHB. Los medios se codificaron como M1 (Medio 1) para el empleado por Moreno *et al.*, 2015 y M2 (Medio 2) al empleado por Naranjo *et al.*, 2013. Los medios fueron seleccionados teniendo en cuenta que emplean glicerol como fuente de carbono y se aplicaron con cepas nativas de *Bacillus megaterium*. La formulación de los medios se detalla en las Tabla 1 y Tabla 2. La Tabla 3 muestra la caracterización del glicerol crudo empleado.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del glicerol crudo empleado por Moreno *et al.*, 2015

Parámetro Fisicoquímico	Valor	
pH	6,414 ± 0,124	
Densidad (g/mL)	1,04 ± 0,01	
Glicerol (%p/p)	51,43 ± 0,23	
Humedad (%p/p)	49,26 ± 0,02	
Cenizas (%p/p)	2,85 ± 0,25	
Contenido de nitrógeno (%p/p)	No detectado	
Materia Orgánica No Glicerol	Metanol (%p/p)	3,57 ± 0,05
	Jabones (%p/p)	1,34 ± 0,17

Fuente: Yañez Díaz, 2013

³⁹ MORENO, Paolo, *et al.* Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology. Diciembre, 2015, vol. 32, no. 6, p. 682-689.

El glicerol crudo fue obtenido previamente por el grupo de investigación de una planta colombiana productora de biodiesel a partir de aceite de palma y que emplea un catalizador básico durante la reacción de transesterificación. El glicerol fue neutralizado mediante adición de NH_4OH almacenado en recipientes plásticos a 4 °C. Previo a su uso fue filtrado para remover partículas en suspensión. La concentración de glicerol fue verificada mediante cromatografía líquida de alta eficiencia como se muestra en la sección métodos analíticos. Para la reactivación de la cepa se empleó caldo nutritivo más glicerol. Todos los reactivos empleados fueron grado analítico.

1.2.2. Condiciones de cultivo Todos los cultivos fueron incubados a 34 °C en una incubadora con agitación orbital Unimax 1010 (Heidolph). Para los cultivos líquidos se emplearon Erlenmeyers de 250 mL con 50 mL de medio y una agitación de 200 rpm. Para la reactivación de la cepa, un vial de la cepa criopreservada fue reactivado en caldo nutritivo más glicerol crudo a una concentración de 7,6 g/L durante 14 horas. Para los cultivos líquidos se empleó un inóculo de 4% mientras que para los cultivos en sólido el extendido se hizo mediante la técnica de agotamiento. El tiempo de fermentación máximo para los cultivos líquidos fue de 48 horas mientras que para los sólidos fue de 24 horas.

1.2.3. Métodos analíticos La concentración de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) fue estimada mediante recuento en placa de Petri. Se tomaron alícuotas de 100 μL y se diluyeron en solución peptonada de acuerdo con la siembra a realizar. Se depositaron 100 μL de la dilución deseada en agar recuento y se realizó extendido con asa de Drigalsky. Las cajas se dejaron en incubación por 12 horas y posteriormente se procedió a realizar el recuento de colonias.

El pH de los medios de cultivo fue medido con un pH-metro Lab 850 (Schott Instruments). La medición de turbidez se realizó empleando un espectrofotómetro Multiskan Go™ (Thermo Scientific™). Las mediciones se realizaron a 540 nm, como blanco se empleó caldo de cultivo estéril y en todos los casos las muestras y el blanco se diluyeron 4 veces para garantizar linealidad en las mediciones.

La cuantificación de la biomasa se realizó mediante gravimetría como se describe a continuación: 15 mL de medio fermentado fueron centrifugados en un tubo falcón previamente pesado, a 6000 g por 8 minutos. Se empleó una centrífuga Universal 320R (Hettich). Se separó el sobrenadante y el pellet resultante se llevó a secado en horno a 60°C por 24 h. La masa del pellet seco se calculó por diferencia de peso con respecto al tubo vacío. La concentración de biomasa se obtuvo al restar la concentración de PHB de la concentración de sólidos calculada por peso seco.

El glicerol y el PHB fueron cuantificados mediante HPLC en un equipo UltiMate 3000 UHPLC System (Thermo Scientific™). Para la cuantificación de glicerol, 1,5 mL de sobrenadante fueron filtrados mediante una membrana PVDF de 0,45 µm y llevados a análisis empleando una columna SupelcoGel C610H de intercambio de iones. Se empleó como fase móvil H₂SO₄ 5 mM a un flujo de 0,6 mL/min y una temperatura en la columna de 60 °C. La detección de glicerol se realizó mediante un detector de índice de refracción con temperatura en la celda de 35°C. Para la cuantificación de PHB, 2 mL de medio fermentado fueron centrifugados y el pellet resultante se secó mediante liofilización. Se llevó a digestión en 1 mL de ácido sulfúrico al 97% a 96 °C por 20 minutos, con el fin de obtener ácido crotónico a partir del PHB presente en la muestra. La solución de digestión se diluyó 50 veces y se almacenó en viales de cromatografía. Una muestra patrón de PHB (Sigma Aldrich) fue procesada en paralelo. Se emplearon las mismas condiciones de

análisis que para glicerol y la detección del ácido crotónico se llevó a cabo mediante un detector de UV-VIS a una longitud de onda de 221 nm⁴⁰.

1.2.4. Cultivo de *Bacillus megaterium* B2 en medios de sales reportados en la literatura En primer instancia se evaluó la capacidad de *B. megaterium* B2 para tolerar concentraciones de glicerol de 20 g/L; característica que poseen otras cepas de *Bacillus*⁴¹. Para esto se realizaron cultivos en agar nutritivo suplementado con 20 g/L de glicerol tanto crudo como puro. Las cajas se dejaron en incubación por 24 horas.

Posteriormente se evaluó el crecimiento de B2 en cuatro medios de cultivo diferentes:

- **M1C:** Medio basal 1 preparado con glicerol crudo.
- **M1P:** Medio basal 1 preparado con glicerol puro.
- **M2C:** Medio basal 2 preparado con glicerol crudo.
- **M2P:** Medio basal 2 preparado con glicerol puro.

Las pruebas se realizaron para concentraciones de 7,6 g/L y 20 g/L de glicerol para los medios M2C y M2P y sólo con 20 g/L para M1C y M1P puesto que ya se ha reportado el crecimiento de B2 en los medios M1C y M1P para concentraciones de 7,6 g/L⁴². Los experimentos para 20 g/L de glicerol con los cuatro medios de cultivo se realizaron a 24 horas con mediciones de pH y turbidez a las 0 h, 14 h y 24 h. Posteriormente se realizaron experimentos a 48 horas para los medios M2C y M2P con muestreo para pH y turbidez a las 0 h, 24 h y 48 h. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

⁴⁰ MORENO, Paalo, *et al.* Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glicerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology. Diciembre, 2015, vol. 32, no. 6, p. 682-689.

⁴¹ NARANJO, Javier M., *et al.* Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. En: Bioresource Technology. Abril, 2013, vol. 133, p. 38-44.

⁴² MORENO, Paalo, *et al.* Op. cit.

En esta etapa se evaluó la capacidad de *B. megaterium* B2 de crecer en medios reportados en la literatura con o sin modificaciones en la fuente de carbono empleada.

1.2.5. Evaluación del efecto de las concentraciones de Na_2HPO_4 y elementos traza en el crecimiento de *B. megaterium* B2 Se evaluó la influencia de la concentración de Na_2HPO_4 y ET sobre el crecimiento de B2. El Na_2HPO_4 y los ET fueron seleccionados por ser los componentes de mayor diferencia (a excepción de la fuente de carbono) entre los dos medios (Ver Tabla 1).

Se modificó el medio M2 de acuerdo con lo mostrado en la Tabla 4. Se realizaron cultivos en Erlenmeyer y se monitoreó la turbidez y el pH del cultivo durante 60 horas de fermentación. Los experimentos se realizaron tanto para glicerol crudo como puro, con el fin de identificar una posible influencia de la fuente de carbono. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 4. Diseño experimental propuesto para el estudio de la influencia de la concentración de elementos traza y fosfato ácido de sodio en el crecimiento de *B. megaterium* B2

		Fosfato ácido de Sodio	
		Alto (9 g/L)	Bajo (1,19 g/L)
Elementos Traza	Alto 1 mL/L	ET ₁ F ₉ Formulación original del Medio	ET ₁ F _{1,19} Disminución en el contenido de fosfato ácido de sodio
	Bajo 0,1 mL/L	ET _{0,1} F ₉ Disminución en el contenido de Elementos traza	ET _{0,1} F _{1,19} Disminución tanto de elementos traza como de fosfato ácido de sodio

Se buscaron efectos inhibitorios o que favorecieran el crecimiento de *B. megaterium* B2 originados por los ET o el fosfato ácido de sodio. Se seleccionaron las dos condiciones para las cuales se da el mejor crecimiento de la cepa.

1.2.6. Cinéticas de producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol crudo empleando medios de sales modificados Se construyeron cinéticas de producción de PHB para las condiciones seleccionadas en la etapa anterior y para el medio de M1C 20 g/L con el fin de identificar el medio más favorable para la producción de PHB. Se realizaron cultivos en Erlenmeyer durante 30 horas con medición de la concentración de biomasa, PHB y glicerol crudo. Los experimentos se realizaron por duplicado.

1.2.7. Adaptación de *B. megaterium* B2 al medio de sales seleccionado Se desarrolló una serie de cultivos sucesivos con el fin de mejorar la adaptación de *Bacillus megaterium* B2 al medio de cultivo seleccionado en la sección anterior.

La adaptación inició con la reactivación de un vial criopreservado en caldo nutritivo más glicerol crudo a una concentración de 20 g/L. Posteriormente se realizaron 5 cultivos sucesivos en erlenmeyers de 250 mL con 50 mL de medio. Se emplearon concentraciones de 7,6 g/L, 10,7 g/L, 13,8 g/L, 16,9 g/L y 20 g/L. El criterio de parada de cada cultivo fue el punto medio de la fase de crecimiento exponencial, para lo cual se construyeron las respectivas curvas de crecimiento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL), conforme se avanzó en la adaptación. Una vez alcanzado el tiempo de parada se tomaron 1000 µL de caldo para inocular el siguiente cultivo. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Una vez lograda una adaptación satisfactoria la cepa fue preservada en medio fermentado suplementado con 20 %p/p de glicerol crudo y almacenada a -21°C. El stock de cepas fue renovado cada seis meses para garantizar viabilidad.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1. Cultivo de *Bacillus megaterium* B2 en en medios de sales reportados en la literatura Se observó crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 en todos los sectores de los agares nutritivos tanto para glicerol crudo como para glicerol puro. Se observaron colonias de hasta 1,5 mm de diámetro luego de las 24 horas de cultivo. Como resultado de la prueba en agar nutritivo se concluyó que *Bacillus megaterium* B2 posee la habilidad de crecer en ambientes con concentraciones de glicerol de 20 g/L. La capacidad de tolerar altas concentraciones de sustrato es una característica deseada puesto que una mayor disponibilidad de fuente de carbono permite una mayor duración de los cultivos en modo Batch.

Las Figura 2 y Figura 3 muestran las variaciones de pH y turbidez para los medios M1C, M1P, M2C y M2P con 20 g/L de glicerol durante 24 horas de cultivo.

Figura 2. Variación de pH en cultivos de *Bacillus megaterium* B2 empleando los medios M1C, M2P, M2C y M2P.

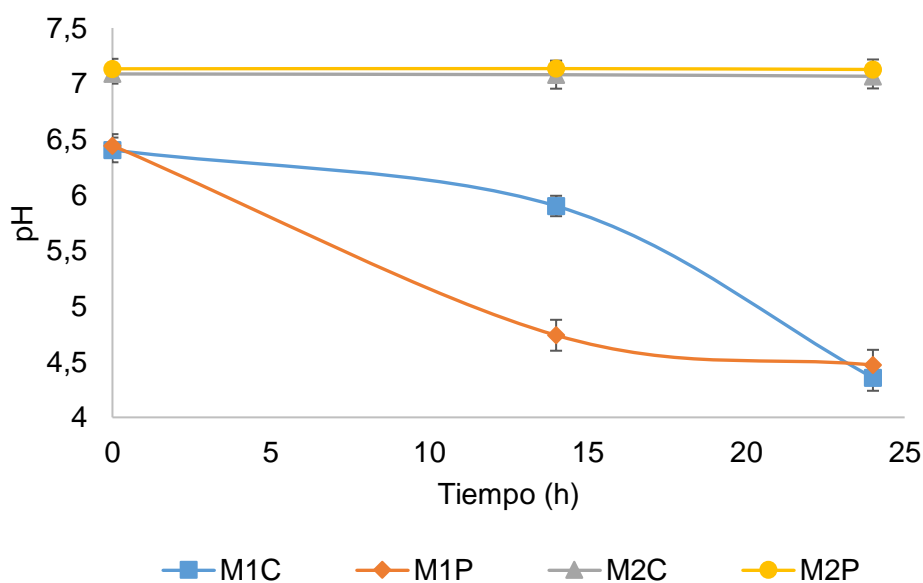
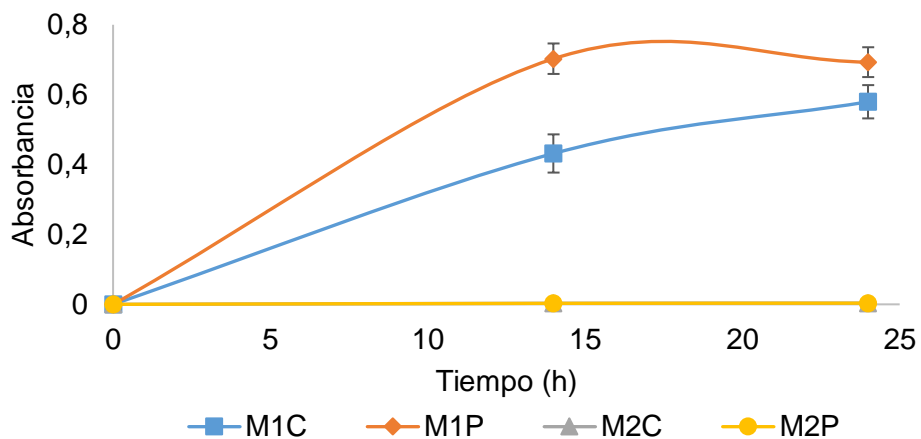


Figura 3. Variación de turbidez en cultivos de *Bacillus megaterium* B2 empleando los medios M1C, M1P, M2C y M2P



Se observó disminución de pH y aumento en la turbidez en los cultivos de los M1C y M1P, lo cual indica actividad metabólica de la cepa. Por otra parte, no se identificó ningún indicio de actividad metabólica para los medios M2C y M2P. Los resultados muestran que uno o varios componentes presentes en los medios M2C y M2P inhiben el crecimiento de B2. Con el fin de confirmar la inhibición del crecimiento y descartar una influencia negativa del glicerol, se extendió el tiempo de fermentación a 48 h y se probaron los medios M2C y M2P con concentraciones de glicerol de 7,6 g/L.

En la Figura 4 y Figura 5 se presentan las variaciones de pH y turbidez para los medios M2C y M2P con 7,6 g/L y 20 g/L de glicerol durante 48 horas de cultivo.

Figura 4. Variación de pH en cultivos de *Bacillus megaterium* B2 empleando los medios M2C y M2P

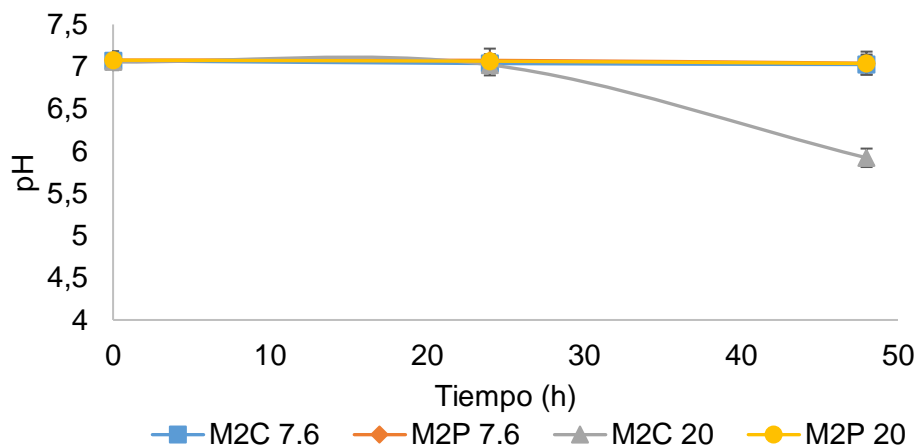
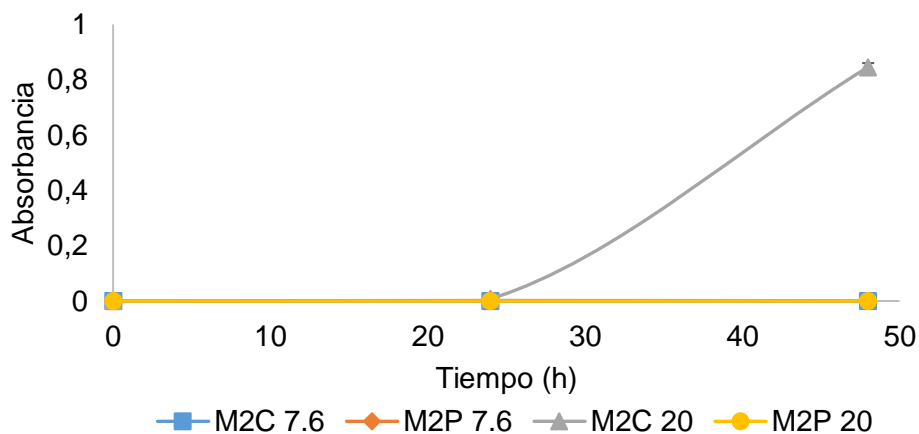


Figura 5. Variación de turbidez en cultivos de *Bacillus megaterium* B2 empleando los medios M2C y M2P



Sólo se observó variación de pH y turbidez en los cultivos con el medio M2C 20. Lo anterior indica que la inhibición del crecimiento no es debida a la concentración de glicerol, si no por uno o varios componentes de los medios M2C y M2P.

1.3.2. Evaluación del efecto de las concentraciones de Na_2HPO_4 y elementos traza en el crecimiento de *B. megaterium* B2 Los experimentos AA no fueron

realizados ya que como mostraron los resultados del numeral anterior, no se evidenció actividad metabólica en esta condición. Los resultados de la variación de pH y turbidez para los experimentos AB, BA y BB con glicerol puro y crudo se muestran en la Figura 6, Figura 7, Figura 8 y Figura 9.

Figura 6. Variación de pH para los experimentos ET₁F_{1,19}, ET_{0,1}F₉ y ET_{0,1}F_{1,19} empleando glicerol puro

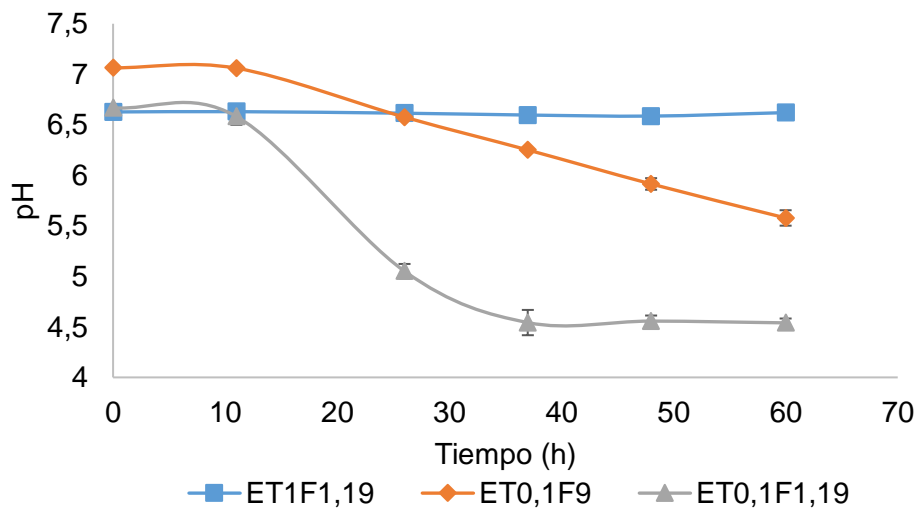


Figura 7. Variación de turbidez para los experimentos ET₁F_{1,19}, ET_{0,1}F₉ y ET_{0,1}F_{1,19} empleando glicerol puro

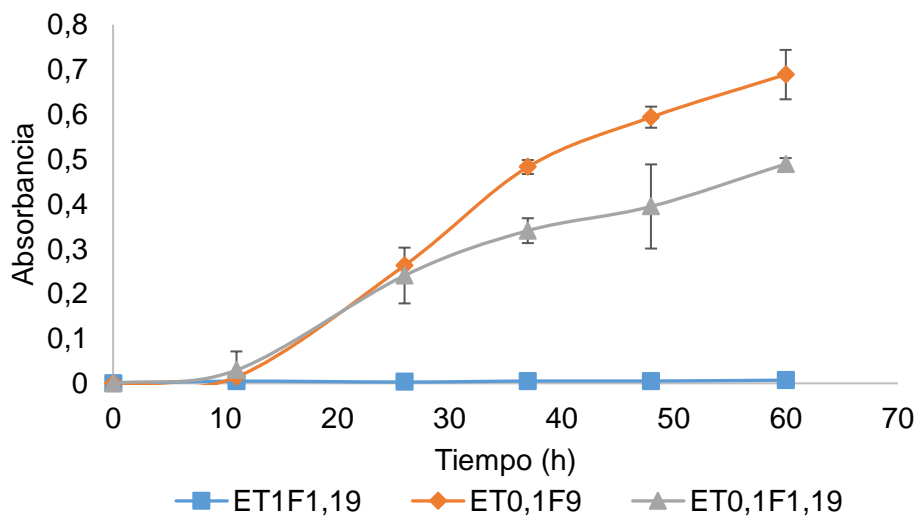


Figura 8. Variación de pH para los experimentos ET₁F_{1,19}, ET_{0,1}F₉ y ET_{0,1}F_{1,19} empleando glicerol crudo

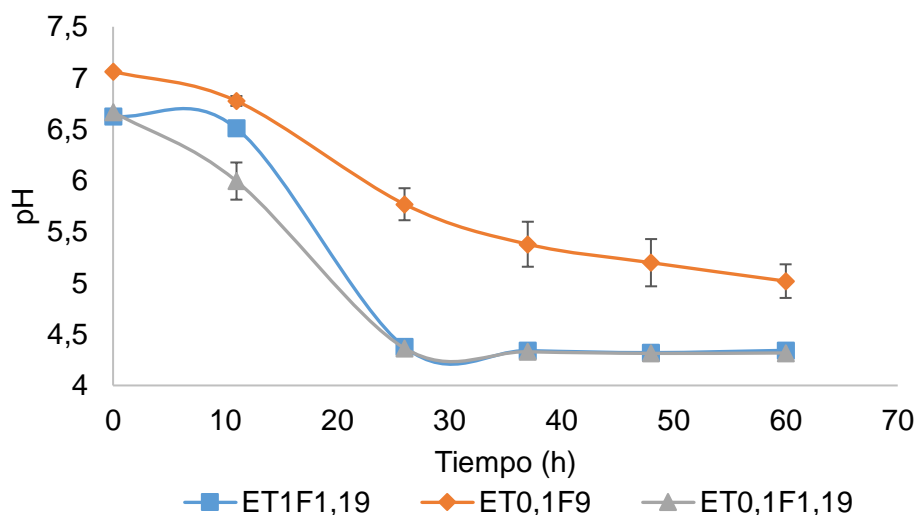
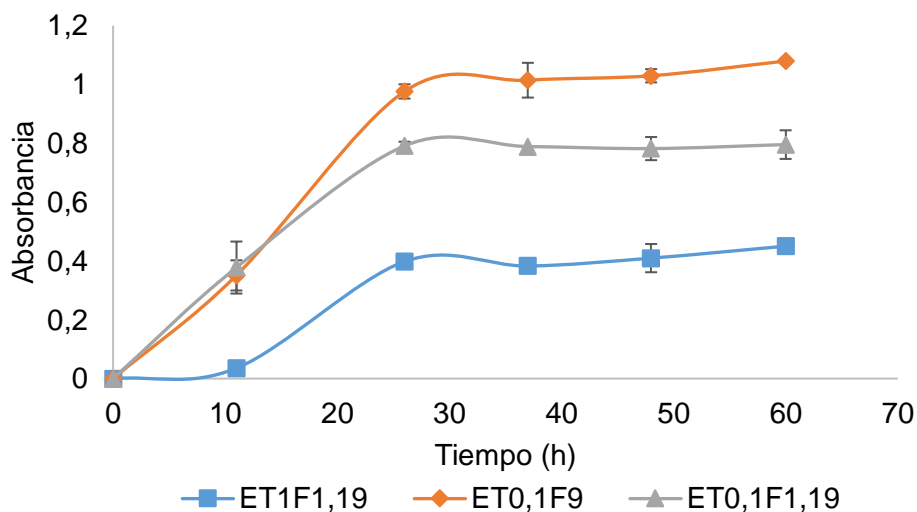


Figura 9. Variación de turbidez para los experimentos ET₁F_{1,19}, ET_{0,1}F₉ y ET_{0,1}F_{1,19} empleando glicerol crudo



Para los experimentos en los cuales se empleó glicerol puro como fuente de carbono, sólo se observó actividad metabólica para las condiciones de baja concentración de elementos traza. Para los experimentos en los cuales se empleó glicerol crudo como fuente de carbono, se observó actividad para las tres

condiciones probadas, sin embargo, las mayores actividades se observaron para la condición de baja concentración de elementos traza. Los valores medidos de absorbancia y pH indican una inhibición del crecimiento de *B. megaterium* B2 debido a concentraciones elevadas de elementos traza. Esta inhibición puede estar relacionada con los efectos tóxicos de los metales pesados presentes en los elementos traza, los cuales en altas concentraciones pueden desnaturalizar proteínas⁴³.

Con respecto a la concentración de fosfato ácido de sodio, se alcanzaron mayores valores de absorbancia para la condición ET_{0,1}F₉ que para la condición ET_{0,1}F_{1,19} en los dos sustratos. El efecto positivo de una alta concentración de fosfato ácido de sodio sobre la turbidez puede ser explicado por el efecto buffer de esta sustancia en el medio de cultivo, evitándose inhibición por pH ya que para los dos sustratos en la condición ET_{0,1}F₉ el pH disminuyó de forma atenuada durante todo el tiempo de fermentación. Para la cepa DSM 32 se observó el cese del crecimiento del microorganismo debido a valores bajos de pH⁴⁴ y para las cepas BBST4 y BA-019 se reportó el pH óptimo de trabajo en 7⁴⁵ ⁴⁶. En los experimentos en donde se alcanzó una estabilización del valor de pH, el valor mínimo alcanzado osciló en el rango de 4,5 a 4,3 lo que indica inhibición por pH en este rango. Con el fin de evitar inhibición por pH en cultivos sin control de este, es deseable emplear cantidades altas de fosfato ácido de sodio. Se identificaron por lo tanto las condiciones ET_{0,1}F₉ y ET_{0,1}F_{1,19} como las más favorables para el crecimiento de B2 empleando el medio M2 tanto con glicerol crudo como glicerol puro.

⁴³ GADD, Geoffrey y GRIFFITHS, Alan. Microorganisms and Heavy Metal Toxicity. En: Microbial Ecology. Diciembre, 1997, vol. 4, no. 4, p. 303–317.

⁴⁴ FACCIN, Debora Jung Luvizetto, *et al.* Optimization of C : N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Junio, 2009, vol. 84, no. 12, p. 1756-1761.

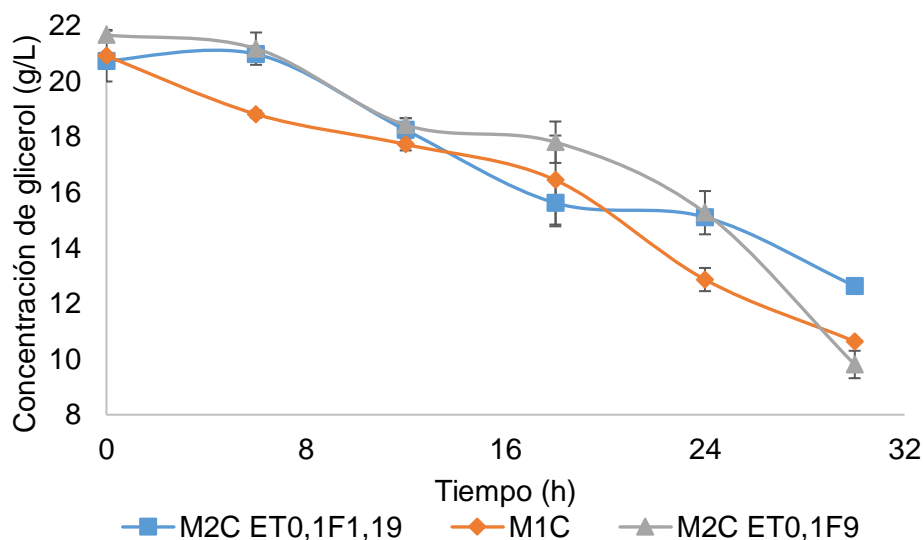
⁴⁵ LÓPEZ, Jimmy A., *et al.* Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. En: Biotechnology and Bioprocess Engineering. Abril, 2012, vol. 17, no. 2, p. 250-258.

⁴⁶ KULPREECHA, Songsri, *et al.* Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Marzo, 2009, vol. 107, no. 3, p. 240-245.

Adicionalmente, se resalta que *Bacillus megaterium* B2 alcanzó mayor turbidez cuando se empleó glicerol crudo como fuente de carbono. Se resalta la capacidad natural de *B. megaterium* B2 de crecer en glicerol crudo ya que el uso de glicerol purificado incrementa los costos del proceso productivo⁴⁷. En los ensayos posteriores se empleó glicerol crudo como fuente de carbono.

1.3.3. Cinéticas de producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol crudo empleando medios de sales modificados En la Figura 10, Figura 11 y Figura 12 se muestran los perfiles de concentración de glicerol, biomasa y PHB para los medios de cultivo M2C ET_{0,1}F₉, M2C ET_{0,1}F_{1,19} y M1C suplementados con 20 g/L de glicerol crudo.

Figura 10. Perfiles de concentración de glicerol para los medios M2C ET_{0,1}F₉, M2C ET_{0,1}F_{1,19} y M1C suplementados con 20 g/L de glicerol crudo



⁴⁷ POSADA, John A., *et al.* Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. En: Process Biochemistry. Enero, 2011, vol. 46, no. 1, p. 310-317.

Figura 11. Perfiles de producción de biomasa para los medios M2C ET_{0,1}F₉, M2C ET_{0,1}F_{1,19} y M1C suplementados con 20 g/L de glicerol crudo

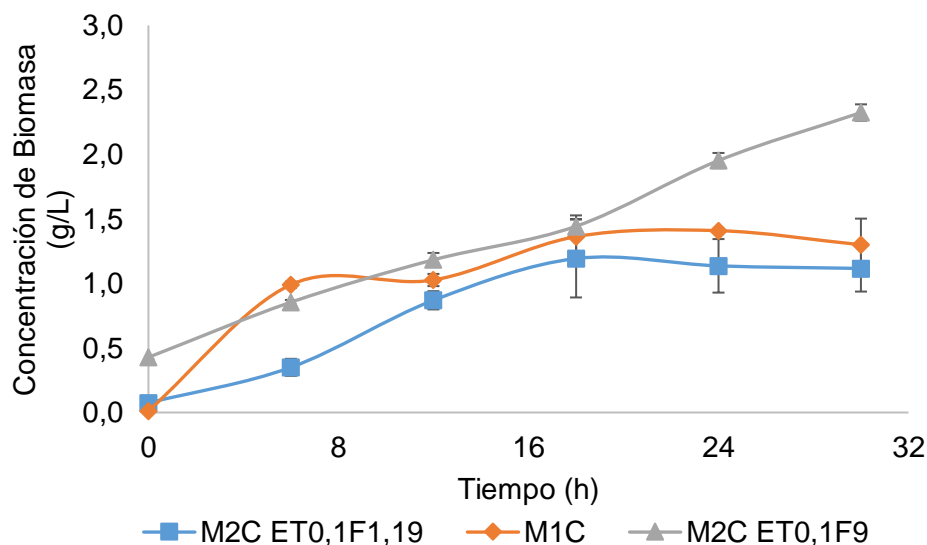
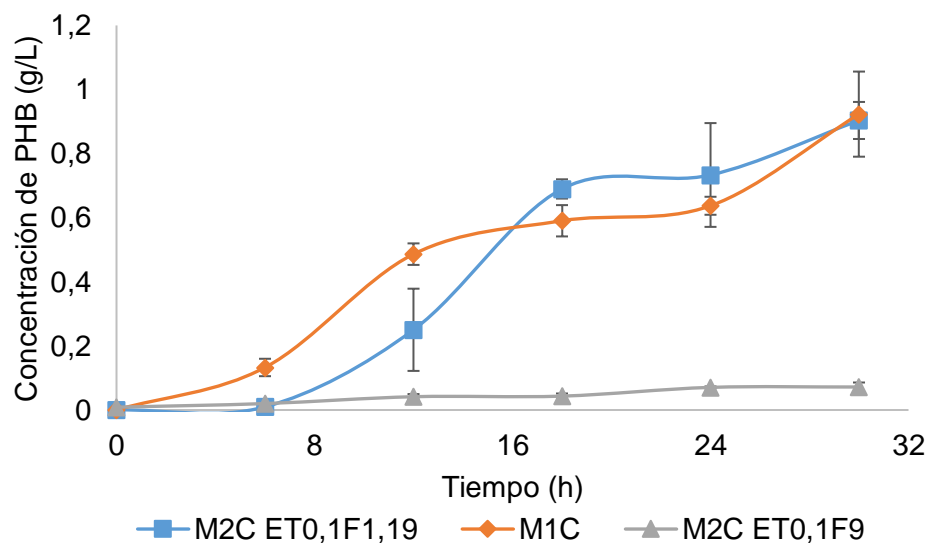


Figura 12. Perfiles de producción de PHB para los medios M2C ET_{0,1}F₉, M2C ET_{0,1}F_{1,19} y M1C suplementados con 20 g/L de glicerol crudo



Se observaron comportamientos similares en las tres variables medidas para los medios M2C ET_{0,1}F_{1,19} y M1C. Aunque el consumo de glicerol fue similar para los tres medios de cultivo, se presentó una diferencia notable en la producción de biomasa y PHB del medio M2C ET_{0,1}F₉ con respecto a los otros dos. Lo anterior

indica diferencias marcadas en el metabolismo de *B. megaterium* B2 debido a cambios en el medio de cultivo. Al comparar los perfiles de biomasa y PHB para los medios M2C ET_{0,1}F_{1,19} y M2C ET_{0,1}F₉ se concluyó que un exceso de Na₂HPO₄ favorece la producción de biomasa, pero dicho efecto es negativo para la producción de PHB. La necesidad de limitación de PO₄⁻ para el incremento de la producción de PHB está acorde con lo reportado en la literatura en donde para la cepa *B. megaterium* ATCC 33085, el porcentaje másico de polímero en las células secas pasó de 8,8% a 18,7% al disminuir la concentración inicial de KH₂PO₄ de 0,2 g/L a 2 mg/L⁴⁸.

La Tabla 5 muestra una comparación de los parámetros cinéticos alcanzados con los medios M2C ET_{0,1}F₉, M2C ET_{0,1}F_{1,19} y M1C y con valores reportados previamente para *B. megaterium* B2⁴⁹.

Para los cuatro medios de cultivo se alcanzaron consumos de glicerol muy variados, siendo el máximo 11,8 g/L para M2C ET_{0,1}F₉. Así mismo, se observó un aumento en el consumo de glicerol para los medios M2C ET_{0,1}F_{1,19} (8,1 g/L) y M1C (10,3 g/L) con respecto a lo reportado previamente para B2. La máxima concentración de PHB alcanzada para los medios M2C ET_{0,1}F_{1,19} (0,9 g/L) y M1C (0,92 g/L) son significativamente mayores que lo reportado para otras cepas de *Bacillus megaterium* a partir de glicerol, como por ejemplo BBST4 que alcanzó una concentración en cultivos en medio basal de 0,53 g/L⁵⁰. Adicionalmente, las concentraciones alcanzadas representan un aumento del 26% con respecto a lo reportado previamente para B2 (0,72 g/L). Dicho aumento indica, entre otras

⁴⁸ DE LA RUBIA, T., *et al.* Growth of *Bacillus megaterium* in phosphate-limited médium. En: Folia microbiológica. Febrero, 1985, vol. 31, p. 98-105.

⁴⁹ MORENO, Paalo, *et al.* Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glicerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology. Diciembre, 2015, vol. 32, no. 6, p. 682-689.

⁵⁰ PORRAS, Mauricio A., *et al.* Bioconversion of glycerol to poly(HB-co-HV) copolymer in an inexpensive medium by a *Bacillus megaterium* strain isolated from marine sediments. En: Journal of Environmental Chemical Engineering. Febrero, 2017, vol. 5, no. 46, p 1-9.

cosas, que una concentración inicial mayor de glicerol favorece la producción del polímero.

Tabla 5. Comparación de parámetros cinéticos alcanzados en cultivos de *B. megaterium* B2 con diferentes medios de cultivo.

Parámetro	Moreno <i>et al.</i> , 2015	Presente estudio		
		M2C ET _{0,1} F ₉	M2C ET _{0,1} F _{1,19}	M1C
Glicerol Consumido (g/L)	4	11,8	8,1	10,3
Máxima concentración de PHB (g/L)	0,72	0,07	0,9	0,92
Máxima concentración de biomasa (g/L)	1,2	2,32	1,4	1,68
$y_{P/S}$ (g/g)	0,18	0,006	0,11	0,09
$y_{x/S}$ (g/g)	0,3	0,2	0,17	0,16
q_P (g/gh)	0,026	2,3E ⁻³	0,030	0,031
% Acumulación de PHB	37,5	2,9	39,2	35,4
Tiempo del experimento (h)	28	30	30	30

$y_{P/S}$: Rendimiento producto sustrato

$y_{x/S}$: Rendimiento biomasa sustrato

q_P : Productividad volumétrica de PHB

Un comportamiento similar fue observado para *Bacillus megaterium* R11 en donde la concentración alcanzada de PHB aumentó 6,9 veces cuando la concentración inicial de fuente de carbono se incrementó 6,7 veces; aunque un mayor aumento de la fuente de carbono generó una disminución en la producción de PHB⁵¹. Adicionalmente, para los medios M2C ET_{0,1}F_{1,19} y M1C se lograron mayores productividades volumétricas de polímero que lo reportado para *B. megaterium*

⁵¹ ZHANG, Youhong, *et al.* Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *En: Bioresource Technology*. Noviembre, 2013, vol. 147, p. 307-314.

B2. Aunque la máxima producción de PHB se alcanzó para el medio M1C, esta diferencia no es significativa con respecto a la producción alcanzada con el medio M2C ET_{0,1}F_{1,19}, el cual alcanzó mayores valores para los parámetros $y_{P/S}$ y porcentaje de acumulación. Por lo anterior se seleccionó el medio M2C ET_{0,1}F_{1,19} para los ensayos posteriores de producción de PHB. La formulación del medio de cultivo se presenta en la Tabla 6.

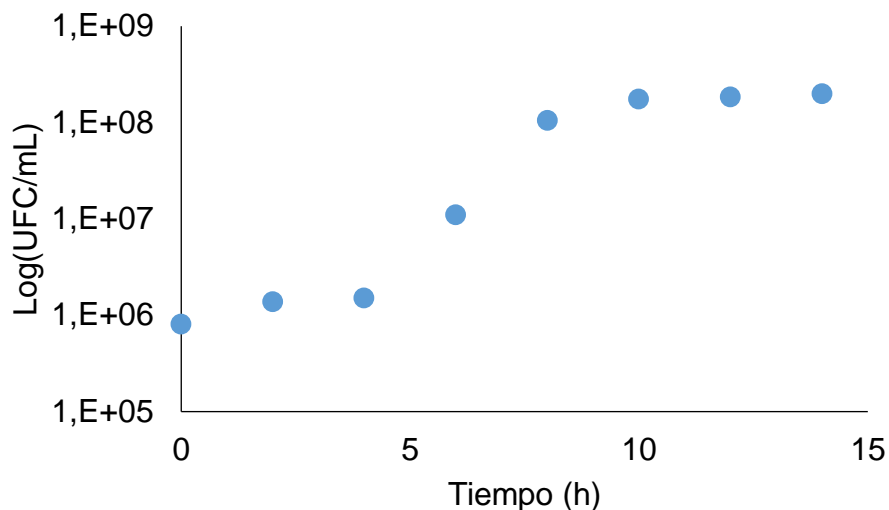
Tabla 6. Formulación del medio de cultivo propuesto para la producción de PHB empelando *Bacillus megaterium* B2

Componente	Unidad	Cantidad
Glicerol crudo	g/L	20
Na ₂ HPO ₄	g/L	1,19
KH ₂ PO ₄	g/L	1,5
MgSO ₄	g/L	0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	1
Elementos Traza*	mL/L	0,1

* La formulación se presenta en la Tabla 2

1.3.4. Adaptación de *B. megaterium* B2 al medio de sales seleccionado Se construyó una curva de crecimiento de la cepa en caldo nutritivo con 7.6 g/L de glicerol crudo (CN 7.6 GC) con el fin de determinar la duración de la fase de latencia, fase exponencial y fase estacionaria. Los ensayos se realizaron por duplicado en Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de volumen de trabajo. Los resultados de la curva de crecimiento bajo estas condiciones se muestran en la Figura 13.

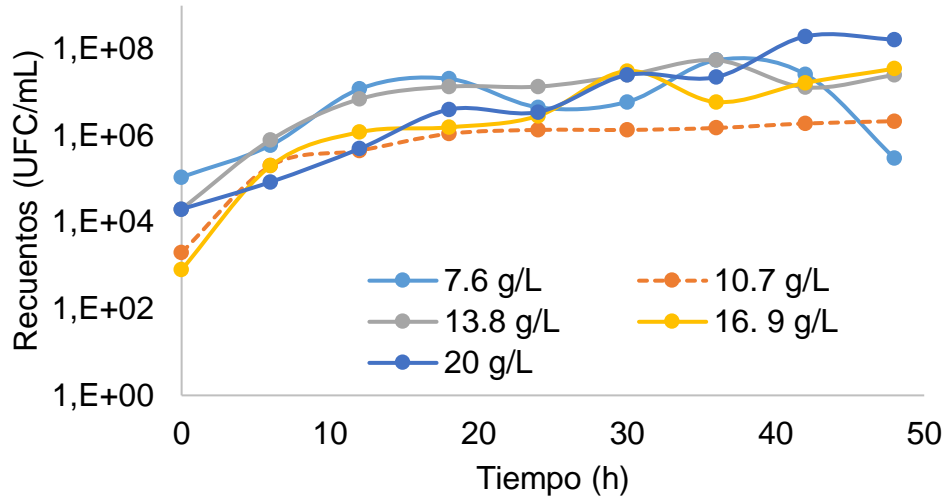
Figura 13. Curva de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 en caldo nutritivo con 7.6 g/L de glicerol crudo



Se observó una fase de latencia de 4 horas, una fase de crecimiento exponencial desde la hora 4 hasta la hora 8 de cultivo y una fase estacionaria desde la hora 8 hasta la hora 14 de la fermentación. La hora 6 de cultivo corresponde al punto medio de la fase de crecimiento exponencial y por lo que se consideró esta hora como el punto en el que la cepa está más activa metabólicamente. Se seleccionó la hora seis del cultivo como el punto de parada para inocular fermentaciones posteriores.

Una vez determinado el punto medio de la fase exponencial para el medio de reactivación, se procedió a realizar los cultivos sucesivos en el medio de sales propuesto. La Figura 14 muestra el recuento de células viables para cultivos con diferentes concentraciones de glicerol crudo empleando el medio de sales propuesto.

Figura 14. Recuento de células viables para cultivos en el medio de sales propuesto para diferentes concentraciones de glicerol crudo



Se observó un incremento en el número de células viables para cada concentración de glicerol, con respecto al número de células en el tiempo cero. Para la mayoría de los casos, el incremento fue de hasta tres unidades en la escala logarítmica. Para todas las concentraciones el punto medio de la fase exponencial se alcanzó a las 6 horas, excepto para la concentración de 20 g/L, en la cual fue alcanzado a las 12 horas. Adicionalmente se observó que la mayor concentración de UFC fue alcanzada para la concentración de 20 g/L de glicerol; lo que mostró una adaptación satisfactoria del microorganismo a esta concentración de glicerol crudo con el medio de cultivo seleccionado. La cepa adaptada fue criopreservada y se empleó en los ensayos posteriores de producción de PHB.

1.4. CONCLUSIONES

Se demostró que *Bacillus megaterium* B2 no presenta inhibición de crecimiento debido a concentraciones de glicerol crudo de 20 g/L alcanzándose concentraciones de hasta $1,0 \cdot 10^8$ UFC/mL en medios de sales.

Se identificó que los elementos traza pueden ser inhibitorios del crecimiento microbiano por lo que su formulación es de vital importancia al momento de seleccionar y modificar medios de cultivo.

Altas concentraciones de fosfato ácido de sodio tienen un efecto negativo sobre la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2, por lo que se recomienda realizar estudios que determinen con exactitud la influencia de este componente.

Se propuso un nuevo medio de sales modificado para la producción de PHB a partir de glicerol crudo empleando *Bacillus megaterium* B2.

2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE N₂ Y O₂ EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Resumen:

Las cinéticas microbianas se ven influenciadas por diversas variables químicas y físicas. Factores nutricionales, operacionales y de fenómenos de transporte generan variaciones en el metabolismo de los microorganismos⁵², por lo que estos deben ser evaluados en cada bioproceso. Las variables más estudiadas en la producción de PHB por diferentes microorganismos son la concentración de sustrato, minerales, fósforo, nitrógeno y oxígeno^{53 54 55}, siendo las dos últimas las de mayor importancia debido a la sinergia que se presenta en microorganismos aerobios. En este capítulo se presentan los resultados para el segundo objetivo del trabajo de maestría: Estudiar el proceso de producción de PHB a partir de glicerol empleando *B. megaterium* B2 bajo condiciones de exceso y limitación de nitrógeno y oxígeno. Se realizó un diseño factorial 3² teniendo como variables independientes la concentración de oxígeno disuelto (OD) en el medio y la relación carbono-nitrógeno (C/N). Los experimentos fueron realizados en un biorreactor con volumen de trabajo de 4 litros, control de pH en 7 y temperatura en 34 °C. La concentración de oxígeno se controló mediante variación automática de las revoluciones del agitador. Así mismo se varió manualmente el flujo de aire cuando fue requerido. La máxima concentración de PHB (1,6 g/L) se alcanzó para la condición de OD = 3,5 mg/L y C/N = 40 mostrando un comportamiento atípico con

⁵² DUTTA, Rajiv. Fundamentals of Biochemical Engineering. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2008, 292 p. ISBN: 978-3-540-77900-1.

⁵³ GAHLAWAT, Geeta y SRIVASTAVA, Ashok K. Estimation of Fundamental Kinetic Parameters of Polyhydroxybutyrate Fermentation Process of *Azohydromonas australica* Using Statistical Approach of Media Optimization. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Noviembre, 2012, vol. 168, no. 5, p. 1051-1064.

⁵⁴ MOKHTARI-HOSSEINI, Zahra B., *et al.* Statistical media optimization for growth and PHB production from metanol by a methylotrophic bacterium. En: Bioresource Technology. Abril, 2009, vol. 100, no. 8, p. 2436-2443.

⁵⁵ NIKEL, Pablo I., *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glicerol by a recombinant *Escherichia coli* arcA mutant in fed-batch microaerobic cultures. En: Applied Microbiology and Biotechnology. Enero, 2008, vol. 77, no. 6, p. 1337-1343.

respecto a otras cepas de *B. megaterium*. Adicionalmente se analizó la influencia de las variables sobre parámetros cinéticos como $y_{p/s}$, $y_{p/x}$ y $y_{x/s}$, encontrándose una relación entre estos y las variables de entrada.

2.1. INTRODUCCIÓN

Experimentalmente se ha observado que la producción de PHB por cepas de *Bacillus megaterium* se ve favorecida por la limitación de nutrientes o la baja disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo, manteniendo un exceso de fuente de carbono. Aunque dichas condiciones favorecen la producción del biopolímero, una limitación temprana de nutrientes puede generar esporulación o limitación del crecimiento microbiano^{56 57 58}.

Dos aspectos de especial importancia son la limitación de nitrógeno y de oxígeno cuyos efectos pueden explicarse mediante el análisis del ciclo metabólico para la síntesis y degradación de PHB (Ver Figura 15).

En la Figura 15 se aprecia el Acetil-CoA como metabolito clave, el cual puede iniciar el ciclo de la respiración celular, la producción de PHB o la producción de acetato: En ausencia de fuente de nitrógeno, el microorganismo productor de PHB no puede sintetizar efectivamente aminoácidos, por lo que se inhibe la producción de biomasa. El exceso de energía generado en la respiración celular es entonces empleado en la producción de PHB.

⁵⁶ OMAR, S., *et al.* Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. En: Biotechnology Letters. Julio, 2001, vol. 23, no. 14, p. 1119-1123.

⁵⁷ FACCIN, Debora Jung Luvizetto, *et al.* Optimization of C : N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Junio, 2009, vol. 84, no. 12, p. 1756-1761.

⁵⁸ LÓPEZ, Jimmy A., *et al.* Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. En: Biotechnology and Bioprocess Engineering. Abril, 2012, vol. 17, no. 2, p. 250-258.

disponibilidad de oxígeno con el fin de maximizar la concentración de PHB⁶¹ ⁶². La limitación de la fuente de nitrógeno fue también explorada para la cepa BA-019 encontrándose que una relación C/N inicial de 25 en exceso de oxígeno, favorece la producción de PHB y observándose limitaciones en el crecimiento para relaciones C/N más altas⁶³.

De forma similar, la producción de PHB se ve fuertemente influenciada por la disponibilidad de oxígeno disuelto (OD) en el medio de cultivo durante la fermentación⁶⁴ ⁶⁵. En contraste con otros microorganismos, como *Cupriavidus necator*, el cual, acumula en promedio 50% de PHB manteniendo un nivel mínimo del OD de 30%⁶⁶ ⁶⁷, estudios indican que limitar la disponibilidad de oxígeno en el medio de fermentación (OD de 10%) es conveniente para favorecer la acumulación del PHB en *Bacillus megaterium*. Se ha observado experimentalmente que las células de *Bacillus megaterium* acumulan PHB debido al estrés creado por la limitación del oxígeno en el medio⁶⁸.

⁶¹ FACCIN, Debora Jung Luvizetto, *et al.* Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Marzo, 2013, vol. 48, no. 3, p. 420-425.

⁶² MORENO, Paolo, *et al.* Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology. Diciembre, 2015, vol. 32, no. 6, p. 682-689.

⁶³ KULPREECHA, Songsri, *et al.* Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Marzo, 2009, vol. 107, no. 3, p. 240-245.

⁶⁴ CASTILLO, Tania, *et al.* Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. En: Process Biochemistry. Julio, 2013, vol. 48, no. 7, p. 995-1003.

⁶⁵ MORALEJO-GÁRATE, Helena, *et al.* Impact of oxygen limitation on glycerol-based biopolymer production by bacterial enrichments. En: Water Research. Marzo, 2013, vol. 47, no. 3, p. 1209-1217.

⁶⁶ KHANNA, Shilpi, SRIVASTAVA, Ashok K. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. En: Process Biochemistry. Mayo, 2005, vol. 40, no. 6, p. 2173-2182.

⁶⁷ PATWARDHAN, Pallavi y SRIVASTAVA, Ashok K. Fed-batch cultivation of *Wautersia eutropha*. En: Bioresource Technology. Abril, 2008, vol. 99, no. 6, p. 1787-1792.

⁶⁸ PANDIAN, Sureshbabu RamKumar, *et al.* Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. En: Bioresource Technology. Enero, 2010, vol. 101, no. 2, p. 705-711.

La acumulación intracelular de PHB se ve también afectada por la disponibilidad de oxígeno. Se reportó para *B. megaterium* DSMZ 90 que la acumulación disminuye de 52% (OD: 1-3%) a 18% (OD: 10%)⁶⁹. Así mismo, para *Bacillus megaterium* DSM 32T se reportó que fijando un valor inicial para el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}) de $k_{La} = 0.006 \text{ s}^{-1}$ se logra la mejor producción de PHB a partir de sacarosa, siendo este un valor intermedio entre los evaluados experimentalmente⁷⁰.

Aunque el coeficiente de transferencia de masa es un factor importante en el proceso de escalado de un proceso microbiológico, no es constante durante la fermentación⁷¹, por lo que en algunos casos se prefiere fijar una concentración de oxígeno disuelto en el medio.

Debido a las variadas condiciones empleadas para la producción de PHB con diferentes cepas de *Bacillus megaterium*, con respecto a la disponibilidad de nitrógeno y oxígeno en cultivos Batch, es necesario realizar un estudio específico para la cepa nativa B2, con el fin de esclarecer la influencia de estas variables sobre el proceso realizado con esta cepa.

⁶⁹ SABRA, W. y ABOU-SEID, D.M. Improving Feeding Strategies for Maximizing Polyhydroxybutyrate Yield by *Bacillus megaterium*. En: Research Journal of Microbiology. Mayo, 2008, vol. 3, no. 5, p. 308-318.

⁷⁰ FACCIN, Debora Jung Luvizetto, *et al.* Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Marzo, 2013, vol. 48, no. 3, p. 420-425.

⁷¹ GARCIA-OCHOA, Felix y GOMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. Review. En: Biotechnology Advances. Marzo-Abril, 2009, vol. 27, no. 2, p. 153-176.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Microorganismo y medio de cultivo Se empleó la cepa *Bacillus megaterium* B2 crio preservada posterior a la adaptación descrita ...en la sección 1.3.4... El medio de cultivo empleado fue el medio de sales modificado como se describe ...en la sección 1.3.3... y cuya formulación se muestra en la Tabla 6. La concentración de sulfato de amonio se varió de acuerdo con los experimentos a realizar.

2.2.2. Condiciones de cultivo Los experimentos fueron realizados en un biorreactor BioFlo Celligen 115 (New Brunswick) con un volumen total de 7,5 litros y un volumen de operación de 4 litros. Se empleó un porcentaje de inóculo del 5%. La temperatura y el pH se controlaron en 34 °C y 7 respectivamente. El control de pH se realizó mediante la adición de solución de KOH 2 M. El oxígeno disuelto fue controlado y se fijó el valor mínimo permitido en el medio de cultivo. Todos los experimentos iniciaron con 100% de saturación de O₂ en el medio de fermentación, un flujo de aire de 1 L/min y 200 rpm de agitación. Se permitió la variación automática de las revoluciones dentro del rango de 200 rpm a 600 rpm con el fin de homogeneizar el OD. El flujo de aire se varió manualmente cuando fue requerido. Las fermentaciones se realizaron por duplicado durante 48 horas con una toma de muestra cada 4 horas para la medición de glicerol, PHB, biomasa y nitrógeno.

2.2.3. Métodos analíticos Las mediciones de concentración biomasa, PHB, glicerol y nitrógeno se realizaron siguiendo los procedimientos descritos ...en la sección 1.2.3...

La concentración de oxígeno disuelto fue medida mediante un sensor polarográfico InPro 6800 conectado en línea al biorreactor. La estimación de la concentración se realizó mediante calibración previa del sensor, determinándose la máxima concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo estéril en 7 mg O₂/L.

2.2.4. Influencia de la concentración de N₂ y O₂ en la concentración máxima de PHB Se realizó un diseño experimental factorial multinivel para estudiar el efecto de la concentración de nitrógeno y de la concentración mínima de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, en la producción de PHB. El efecto de la concentración de nitrógeno se estudió en función de la relación carbono nitrógeno.

Los intervalos de las variables se seleccionaron de acuerdo con los valores máximos y mínimos reportados en la literatura para cepas de *Bacillus megaterium*. El diseño experimental para la evaluación de la influencia de la concentración de N₂ y O₂ se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7 Diseño de experimentos para la evaluación de la influencia de la concentración de N₂ y O₂

Factores		Relación Carbono / Nitrógeno [g C/ gN]		
		Niveles	10	25
Concentración mínima de Oxígeno disuelto [mg/L]	0,35	-1,-1	0,-1	1,-1
	1,75	-1,0	0,0	1,0
	3,5	-1,1	0,1	1,1

El orden en el cual se desarrolló el diseño de experimentos con el fin de garantizar aleatoriedad se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Orden de ejecución del diseño experimental factorial multinivel para el estudio de la influencia de la relación C/N y el OD sobre la producción de PHB

Montaje	Bloque	C/N	OD Mínimo
1	1	-1,0	1,0
2	1	0,0	-1,0
3	1	0,0	0,0
4	1	-1,0	0,0
5	1	0,0	1,0
6	1	1,0	0,0
7	1	-1,0	-1,0
8	1	1,0	1,0
9	1	1,0	-1,0
10	2	-1,0	1,0
11	2	0,0	-1,0
12	2	0,0	0,0
13	2	-1,0	0,0
14	2	0,0	1,0
15	2	1,0	0,0
16	2	-1,0	-1,0
17	2	1,0	1,0
18	2	1,0	-1,0

Como variable de respuesta se tomó la máxima concentración alcanzada de PHB durante la fermentación. Se seleccionó esta variable debido a que se busca la máxima producción de polímero. No se seleccionaron variables como el rendimiento producto sustrato, el cual mide la eficiencia de la fuente de carbono o la productividad volumétrica la cual mide la velocidad de formación del producto de interés, debido a que el glicerol es un sustrato económico y a que aún no se tiene

un estimado de los costos operacionales del proceso. Adicionalmente, se realizó un análisis descriptivo de las curvas de producción de biomasa y PHB y de consumo de glicerol y nitrógeno con el fin de determinar relación con las variables C/N y OD. El análisis estadístico de los resultados del diseño de experimentos fue realizado mediante ANOVA, con ayuda del software Statgraphics Centurion XVI versión de prueba (Statgraphics).

2.2.5. Influencia de la concentración de N₂ y O₂ sobre parámetros cinéticos de la producción de PHB a partir de glicerol

Se estimaron los valores de rendimientos instantáneos ($y_{p/s}$, $y_{p/x}$ y $y_{x/s}$), productividad volumétrica q_P y porcentaje de acumulación de PHB en el punto de máxima concentración de PHB para cada condición evaluada. Los rendimientos instantáneos se definen como:

$$y_{p/s} = \frac{g \text{ PHB producido}}{g \text{ glicerol consumido}}$$

$$y_{p/x} = \frac{g \text{ PHB producido}}{g \text{ biomasa producida}}$$

$$y_{x/s} = \frac{g \text{ biomasa producida}}{g \text{ glicerol consumido}}$$

La productividad volumétrica y el porcentaje de acumulación de PHB fueron estimados según las siguientes ecuaciones:

$$q_P = \frac{g \text{ PHB producido}}{\text{Volumen de medio} \times \text{Hora}}$$

$$\% \text{ Acumulación} = \frac{g \text{ PHB producido}}{g \text{ PHB producido} + g \text{ biomasa producida}} \times 100$$

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Influencia de la concentración de N₂ y O₂ en la concentración máxima de PHB Las cinéticas de consumo de nitrógeno, glicerol y producción de biomasa y de PHB bajo las 9 condiciones probadas se muestran en las Figura 16, Figura 17 y Figura 18.

Tanto el oxígeno como el nitrógeno pueden ser sustratos limitantes del proceso, lo cual se concluyó del análisis de las cinéticas de consumo de glicerol. En general, una mayor disponibilidad de nitrógeno se ve reflejada en un mayor consumo de sustrato. Para la condición C/N = 10 se tuvo consumo total de sustrato en las tres condiciones de oxígeno (Ver Figura 16), mientras que para C/N = 25 sólo en dos (Ver Figura 17) y para C/N = 40 sólo en una condición (Ver Figura 18). Este comportamiento puede explicarse desde el punto de vista metabólico ya que el N₂ es empelado en la formación de biomasa. Por otra parte, el comportamiento del oxígeno como sustrato limitante depende de la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Para la condición con exceso de nitrógeno (C/N = 10) se observa que a medida que se incrementa la disponibilidad de oxígeno se da un consumo más rápido de glicerol, por lo que el oxígeno fue el limitante del proceso (Ver Figura 16). Sin embargo, para las condiciones C/N = 25 y C/N = 40, dicha relación no es directa y aunque se observan velocidades altas de consumo de glicerol, no se alcanza el consumo completo de este sustrato para todas las condiciones debido principalmente al agotamiento temprano de la fuente de nitrógeno. Estos resultados reafirman la sinergia entre estas dos variables y la importancia de su estudio simultáneo.

Figura 16. Cinéticas de producción de PHB para la relación C/N 10 y todas las condiciones de OD

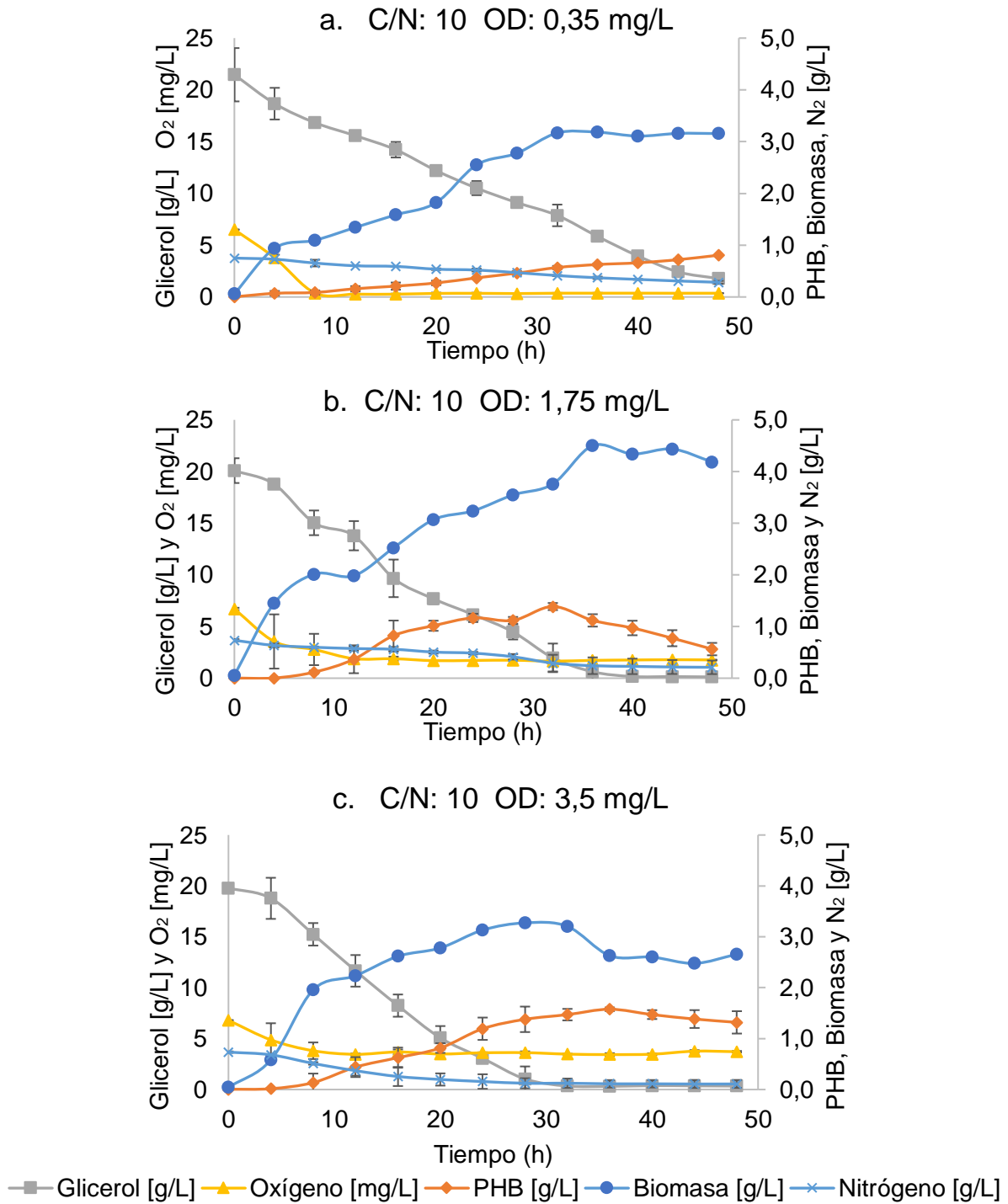
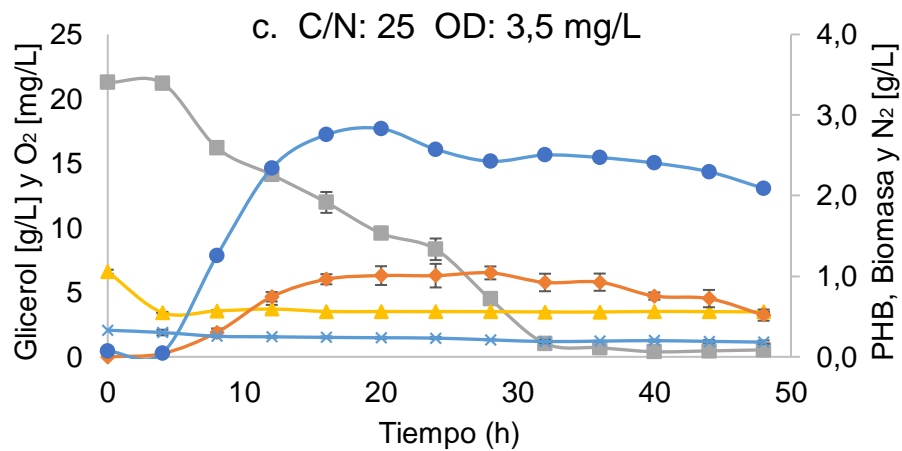
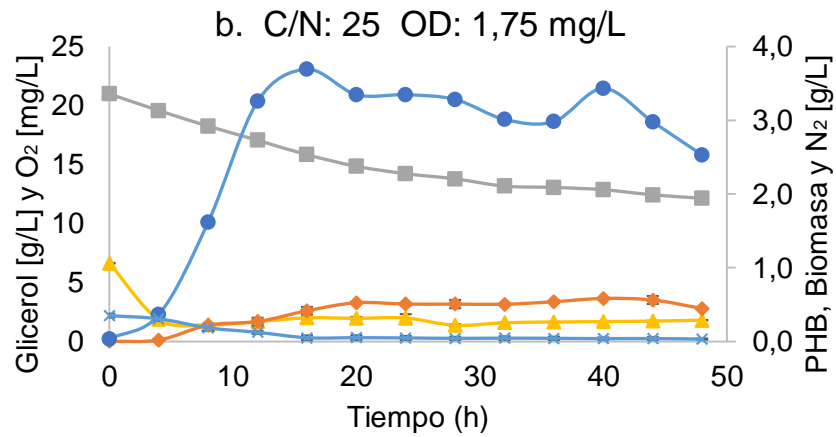
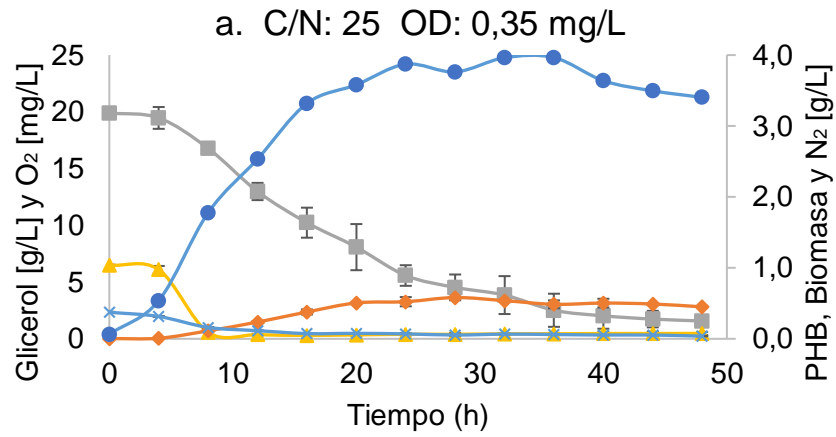
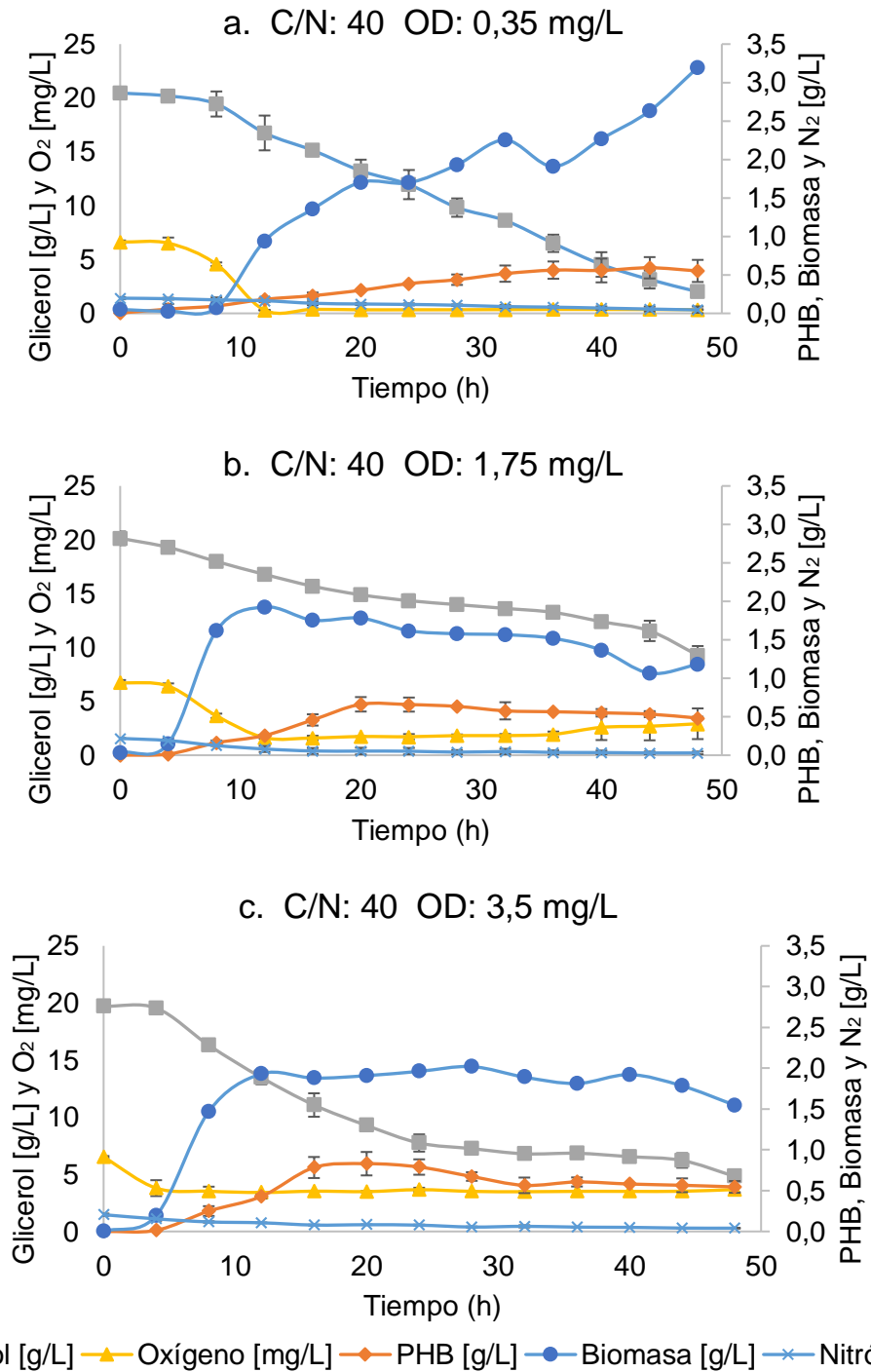


Figura 17. Cinéticas de producción de PHB para la relación C/N 25 y todas las condiciones de OD



■ Glicerol [g/L] ▲ Oxígeno [mg/L] ◆ PHB [g/L] ● Biomasa [g/L] × Nitrógeno [g/L]

Figura 18. Cinéticas de producción de PHB para la relación C/N 40 y todas las condiciones de OD



La Tabla 9 presenta la máxima concentración de PHB alcanzada en cada experimento.

Tabla 9. Máxima concentración de PHB (g/L) alcanzada en cada experimento

Relación C/N	Oxígeno disuelto [mg/L]		
	0,35	1,75	3,5
10	0,807±0,001	1,387±0,069	1,577±0,035
25	0,582±0,011	0,597±0,009	1,048±0,089
40	0,593±0,139	0,692±0,051	0,831±0,144

La máxima concentración de PHB se alcanzó para la condición C/N = 10 y OD = 3,5 con un valor de 1,577 ± 0,035 g/L. Este valor representa un incremento del 33% con respecto a la máxima concentración de PHB reportada anteriormente para *Bacillus megaterium* B2⁷² y es mayor que el valor de 1,14 g/L reportado para la cepa BBST4 a partir de glicerol puro⁷³. La Tabla 10 muestra el análisis de varianza para la concentración de PHB.

El análisis de varianza muestra que los efectos de los factores concentración de oxígeno (A), relación carbono nitrógeno (B) y las interacciones AB y BB tiene efecto significativo sobre la producción de PHB puesto que el valor del estadístico P es menor a 0,05 para un intervalo de confianza del 95%. Así mismo, los factores mostrados en la tabla Anova describen la variabilidad de los datos en un 91,8%.

⁷² MORENO, Paalo, *et al.* Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glicerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology. Diciembre, 2015, vol. 32, no. 6, p. 682-689.

⁷³ PORRAS, Mauricio A., *et al.* Bioconversion of glycerol to poly(HB-co-HV) copolymer in an inexpensive medium by a *Bacillus megaterium* strain isolated from marine sediments. En: Journal of Environmental Chemical Engineering. Febrero, 2017, vol. 5, no. 46, p 1-9.

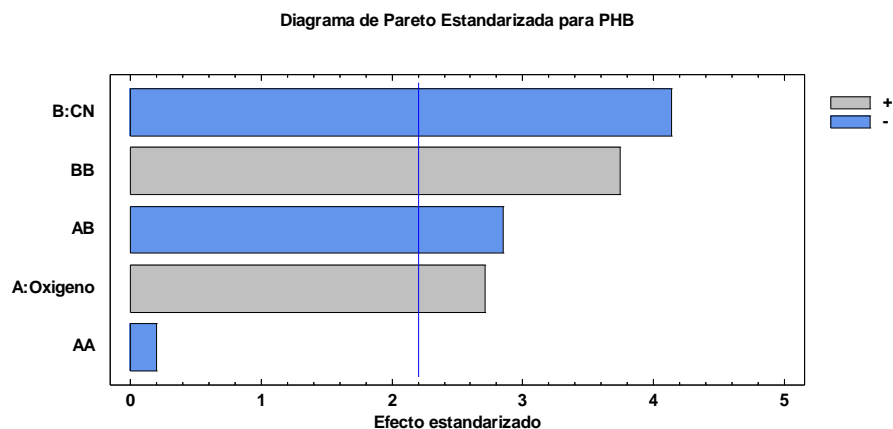
Tabla 10. Análisis de varianza para la concentración de PHB

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón -F	Valor-P
A:Oxígeno	0,1202	1	0,120245	7,35	0,0202
B:CN	0,2796	1	0,279555	17,1	0,0017
AA	0,0007	1	0,000674	0,04	0,8428
AB	0,1325	1	0,1325	8,1	0,0159
BB	0,2289	1	0,228894	14	0,0033
Error total	0,1799	11	0,0163505		
Total (corr.)	2,18138	17			

$R^2 = 0,918$

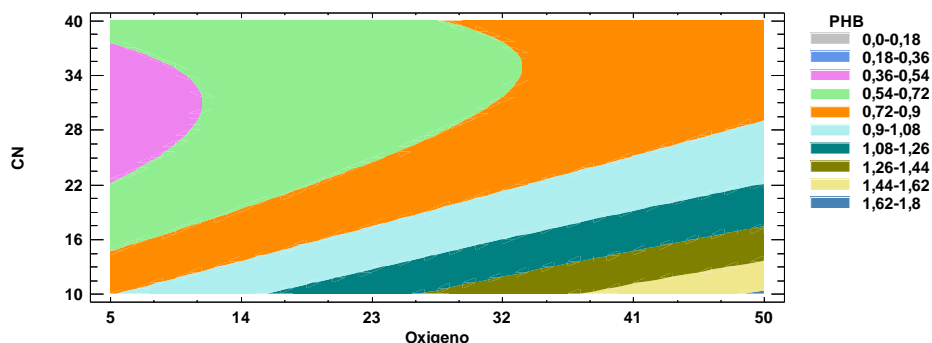
La Figura 19 muestra el diagrama de Pareto para la producción de PHB.

Figura 19. Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de PHB



El diagrama de Pareto muestra que la relación carbono – nitrógeno tiene un mayor efecto sobre la producción de PHB que la concentración de oxígeno y la interacción entre estas dos variables. La Figura 20 muestra los contornos de la superficie de respuesta estimada para la máxima concentración de PHB.

Figura 20. Contornos de la superficie de respuesta estimada para la máxima concentración de PHB



Nota: La concentración de OD se presenta en porcentaje de saturación siendo 7 mg/L el 100%.

Los resultados presentados en la Tabla 9 y Figura 20 muestran que *Bacillus megaterium* no necesita una limitación de nitrógeno ni de oxígeno para la producción de PHB en cultivos Batch con el medio de cultivo empleado, dentro del rango estudiado. Dicho resultado se debe a que una limitación temprana de estos sustratos restringe el crecimiento celular y por lo tanto la producción de PHB. Por otra parte, en la formulación del medio de cultivo se emplean concentraciones bajas de hierro, el cual es necesario para el transporte de oxígeno al interior de la célula, por lo que, aunque este sustrato esté disponible, se pudo haber limitado su ingreso a las células. Resultados similares fueron obtenidos para otras cepas de *Bacillus megaterium*, en donde la producción de PHB se da asociada al crecimiento y se alcanzaron las mayores producciones de PHB para condiciones de no limitación^{74 75 76}.

⁷⁴ ZHANG, Youhong, *et al.* Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. En: Bioresource Technology. Noviembre, 2013, vol. 147, p. 307-314.

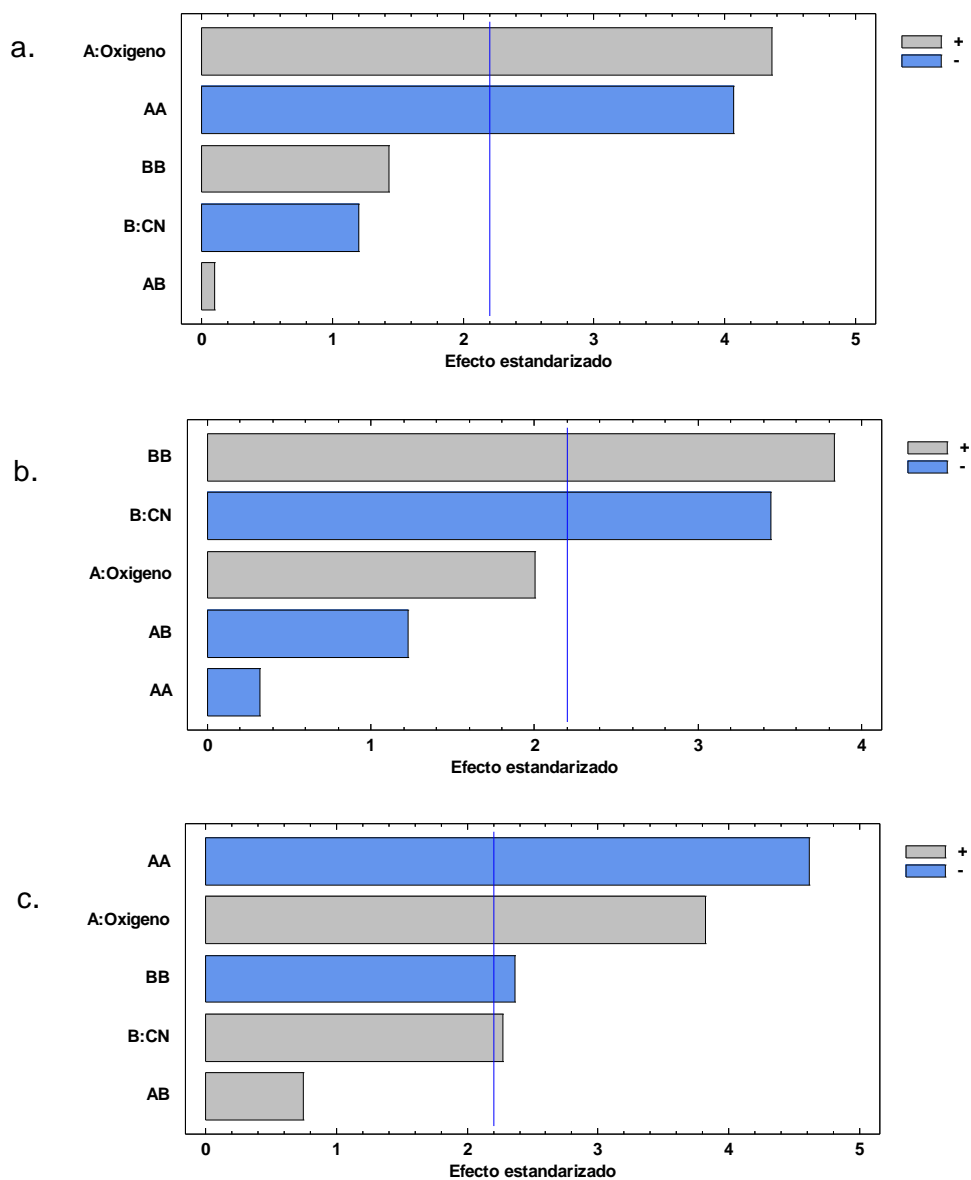
⁷⁵ PANDIAN, Sureshbabu RamKumar, *et al.* Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. En: Bioresource Technology. Enero, 2010, vol. 101, no. 2, p. 705-711.

⁷⁶ OMAR, S., *et al.* Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. En: Biotechnology Letters. Julio, 2001, vol. 23, no. 14, p. 1119-1123.

2.3.2. Influencia de la concentración de N₂ y O₂ sobre parámetros cinéticos de la producción de PHB a partir de glicerol

La Figura 21 muestra los diagramas de Pareto estandarizados obtenidos, tomando como variable de respuesta los rendimientos $y_{p/s}$, $y_{p/x}$ y $y_{x/s}$.

Figura 21. Diagramas de Pareto estandarizados para los rendimientos a. $y_{p/s}$, b. $y_{p/x}$ y c. $y_{x/s}$



El rendimiento producto sustrato se ve influenciado positivamente por la concentración de oxígeno disuelto en el medio, presentando curvatura dentro del rango estudiado de OD. No hay influencia considerable de la concentración de nitrógeno ni de interacción $N_2 - O_2$ (Ver Figura 21. a.).

Comportamiento contrario es observado para el rendimiento producto biomasa en donde sólo la concentración de nitrógeno tiene un efecto considerable, presentándose un fuerte efecto de curvatura con respecto a esta variable (Ver Figura 21. b.). Para este caso, la relación C/N tiene una influencia negativa sobre el rendimiento $y_{p/x}$, lo que significa que una disponibilidad de nitrógeno permite obtener rendimientos mayores. Finalmente, el rendimiento $y_{x/s}$ se ve influenciado positivamente por la concentración de oxígeno y la relación carbono nitrógeno. Se observa además que se presenta una curvatura fuerte con respecto a la concentración de oxígeno y una débil con respecto a la relación C/N (Ver Figura 21. c.).

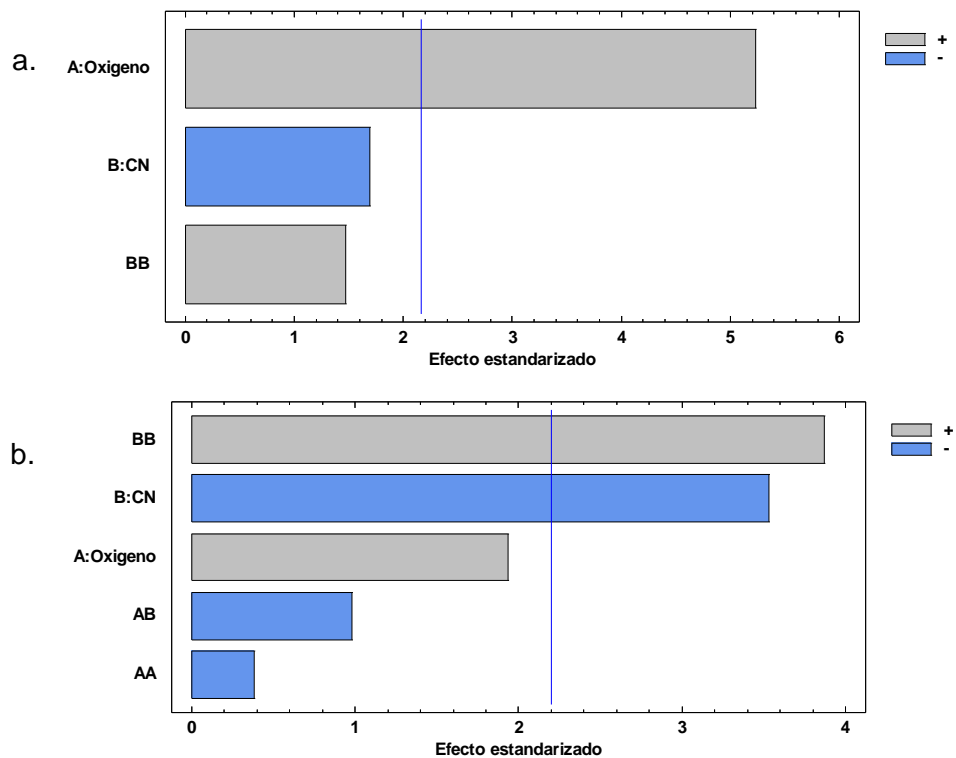
Los resultados del análisis de datos muestran que los rendimientos obtenidos para estos parámetros dependen de los valores de C/N y OD empelados. Cabe destacar que para los rendimientos $y_{p/s}$, $y_{p/x}$, asociados con la producción y acumulación de polímero, la influencia de la concentración de oxígeno es positiva, mientras que la de C/N es negativa, lo cual confirma que *Bacillus megaterium* no requiere limitación de nitrógeno u oxígeno para la producción de PHB en cultivos Batch.

La Figura 22 muestra los diagramas de Pareto estandarizados para a. Productividad volumétrica y b. Porcentaje de acumulación de PHB.

Sólo la concentración de oxígeno tiene una influencia positiva sobre la productividad volumétrica del proceso (Ver Figura 22. a.), mientras que el porcentaje de acumulación de PHB depende principalmente de la relación carbono

nitrógeno empleada (Ver Figura 22. b.). Tanto la productividad volumétrica como el porcentaje de acumulación de PHB se ven favorecidos por una alta disponibilidad de nitrógeno y oxígeno cuando se realizan cultivos en modo Batch.

Figura 22. Diagramas de Pareto estandarizados para a. Productividad volumétrica y b. Porcentaje de acumulación de PHB



2.4. CONCLUSIONES

La producción de PHB a partir de glicerol crudo se ve favorecida por la disponibilidad de oxígeno y nitrógeno cuando se realizan cultivos de *Bacillus megaterium* B2 en modo Batch, empleando el medio de sales. La mayor producción de PHB se alcanzó para una relación C/N = 10 y una concentración de oxígeno disuelto de 3,5 mg/L..

Las modificaciones realizadas al medio y las condiciones de cultivo permitieron un incremento del 33% en la producción de PHB en comparación con los valores reportados para esta cepa.

Parámetros como los rendimientos $y_{p/s}$, $y_{p/x}$ y $y_{x/s}$, la productividad volumétrica y el porcentaje de acumulación también se ven favorecidos por la disponibilidad de oxígeno y nitrógeno en el medio de cultivo.

3. DESARROLLO DE METODOLOGÍA PARA CULTIVO TIPO FED-BATCH DE *Bacillus megaterium* B2

Resumen

Entre las estrategias usadas para incrementar la productividad de los procesos microbiológicos se encuentra la modificación de los modos de operación de los cultivos⁷⁷. Los tres modos de operación de mayor uso son: Batch, Fed-Batch y Continuo⁷⁸. Cada modo de operación presenta ventajas y desventajas por lo que su aplicación depende del bioproceso a realizar. Por ejemplo, el cultivo Fed-Batch permite evitar inhibición por sustrato o agotamiento de este, incrementando la productividad del proceso⁷⁹. Con el fin de mantener la concentración deseada de sustratos, se debe estimar los flujos de alimentación y para esto una estrategia empleada es la simulación del proceso a partir de modelos matemáticos obtenidos para cultivos Batch⁸⁰. En este capítulo se presentan los resultados del tercer objetivo de la presente tesis de maestría: Diseñar e implementar una estrategia de alimentación Fed-Batch para la producción de PHB a partir de glicerol empleando *Bacillus megaterium* B2 a escala laboratorio. Se desarrolló un modelo matemático que permite describir y predecir la variación de biomasa, PHB, oxígeno, glicerol y nitrógeno en cultivos Batch y Fed-batch. Se planteó una expresión para la velocidad específica de crecimiento teniendo como sustratos limitantes el oxígeno, el glicerol y el nitrógeno. El proceso de producción de PHB se describió con base en la ecuación de Luedeking-Piret y se incluyó un término para el consumo del

⁷⁷ PATNAIK, Pratap R. Response coefficient analysis of a fed-batch bioreactor to dissolved oxygen perturbation in complementary cultures during PHB production. En: Journal of Biological Engineering. Marzo, 2008, vol. 2, no. 4.

⁷⁸ MACAULEY-PATRICK, Sue y FINN, Beverley. Modes of Fermenter Operation. En: MCNEIL, Brian y HARVEY, Linda M. Practical Fermentation Technology. Wiley, 2008, 402 p. ISBN: 978-0-470-01434-9.

⁷⁹ SHULER, Michael y KARGI, Fikret. Bioprocess Engineering Basic Concepts. 2 ed. Prentice Hall, 2002, 553 p. ISBN: 0-13-081908-5

⁸⁰ GAHLAWAT, Geeta y SRIVASTAVA, Ashok K. Model-Based Nutrient Feeding Strategies for the Increased Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Octubre, 2017, vol. 183, no. 2, p. 530-542.

polímero. Los parámetros se estimaron utilizando los datos obtenidos en fermentaciones Batch. Se simularon dos procesos con cultivo en modo Fed-Batch, obteniéndose como resultado que la mayor concentración de PHB (2,79 g/L) se alcanza para un proceso con limitación de oxígeno. El mismo comportamiento se observó experimentalmente, lográndose una concentración de 2,47 g/L de PHB.

3.1. INTRODUCCIÓN

En las últimas cuatro décadas, el PHB ha despertado el interés de la industria química y de diferentes centros de investigación. A pesar de los esfuerzos, el alto costo de producción impide la masificación de la producción de este biopolímero. Debido a esto, se han planteado diferentes estrategias con el fin de disminuir los costos en la fabricación de PHB, entre ellas, el uso de modificaciones genéticas, búsqueda de sustratos económicos, optimización de medios de cultivo y la aplicación de diferentes modos de operación⁸¹.

Dentro de los modos de operación desarrollados para procesos fermentativos, los tres más estudiados son el cultivo Batch, Fed-Batch y continuo⁸². Cada modo de operación posee ventajas y desventajas, lo cual hace que su aplicación dependa de cada cultivo en específico. El cultivo Batch hace referencia a un recipiente cerrado en donde se tiene una carga inicial de nutrientes, sin cambio de volumen durante la fermentación⁸³. El proceso termina cuando se alcanza una de las siguientes condiciones: agotamiento de los nutrientes o inhibición por producto, después de un determinado periodo de tiempo o una vez alcanzada la concentración deseada de producto. Dentro de sus ventajas se destaca la simplicidad, baja probabilidad de falla de los instrumentos, producción de metabolitos secundarios y baja probabilidad de contaminación. Por otra parte,

⁸¹ PATNAIK, Pratap R. Response coefficient analysis of a fed-batch bioreactor to dissolved oxygen perturbation in complementary cultures during PHB production. En: Journal of Biological Engineering. Marzo, 2008, vol. 2, no. 4.

⁸² MACAULEY-PATRICK, Sue y FINN, Beverley. Modes of Fermenter Operation. En: MCNEIL, Brian y HARVEY, Linda M. Practical Fermentation Technology. Wiley, 2008, 402 p. ISBN: 978-0-470-01434-9.

⁸³ SHULER, Michael y KARGI, Fikret. Bioprocess Engineering Basic Concepts. 2 ed. Prentice Hall, 2002, 553 p. ISBN: 0-13-081908-5

algunas desventajas del cultivo en modo Batch son el envejecimiento del cultivo, la variabilidad de un cultivo a otro y la inhibición por producto o sustrato⁸⁴.

Por otra parte, en el cultivo continuo los microorganismos son alimentados constantemente con medio fresco, mientras que el medio fermentado y las células son removidas. Esta técnica se emplea para crear un ambiente con menos fluctuaciones de nutrientes, células o biomasa. Entre sus ventajas se encuentra la posibilidad de controlar la productividad y velocidad de crecimiento, mayores periodos productivos y una mayor facilidad para analizar la influencia de los factores ambientales a los que se exponen los microorganismos⁸⁵.

Los cultivos Fed-Batch poseen características en común con el cultivo Batch y continuo. Los cultivos Fed-Batch empiezan como un cultivo Batch y después de un determinado tiempo inicia la alimentación de uno o varios nutrientes. El modo de operación Fed-Batch fue desarrollado para prolongar los cultivos en modo Batch, controlando la concentración de los sustratos limitantes, la velocidad específica de crecimiento y por lo tanto la demanda de oxígeno y otros nutrientes; por lo que se pueden adecuar tanto para la producción de metabolitos primarios como secundarios. Su principal desventaja que, en ausencia de un sistema de control en línea de la concentración de sustratos limitantes, se debe determinar con anticipación los flujos de alimentación⁸⁶.

En la Tabla 11 se presentan las producciones de PHB reportadas para diferentes cepas de *Bacillus megaterium* en diferentes modos de operación; mostrando que las mayores producciones de PHB han sido reportadas en cultivos Fed-Batch.

⁸⁴ MACAULEY-PATRICK, Sue y FINN, Beverley. Modes of Fermenter Operation. En: MCNEIL, Brian y HARVEY, Linda M. Practical Fermentation Technology. Wiley, 2008, 402 p. ISBN: 978-0-470-01434-9.

⁸⁵ *Ibíd.*

⁸⁶ *Ibíd.*

En la Tabla 11 se observa que las mayores concentraciones de PHB reportadas son 41,58 g/L y 30,5 g/L para la cepa BA-019 en cultivo en modo Fed-Batch. Para la cepa DSMZ90 se reportó una producción de 5,3 g/L, mostrando que las tres mayores concentraciones fueron alcanzadas en modo Fed-Batch, por lo que este tipo de cultivo se muestra como una opción prometedora para el incremento de la concentración de PHB en cultivos de *Bacillus megaterium* B2.

Tabla 11. Producciones de PHB reportadas para diferentes cepas de *Bacillus megaterium* para cultivos Batch y Fed-Batch

Autor	Cepa	Sustrato	Modo	PHB g/L
Omar <i>et al.</i> , 2001	sp	Jarabe de dátil	Batch	0,85
Sabra y Abou-Zeid, 2008	DSMZ90	Sacarosa	Fed-Batch	5,3
Faccin <i>et al.</i> , 2009	DSM32	Sacarosa	Batch	1,4
Kulpreecha <i>et al.</i> , 2009	BA-019	Melaza de caña	Fed-Batch	30,5
López <i>et al.</i> , 2012	BBST4	Glicerol puro	Batch	3,4
Naranjo <i>et al.</i> , 2013	BBST4	Glicerol puro	Batch	4,8
Kanjanachumpol <i>et al.</i> , 2013	BA-019	Melaza de caña	Fed-Batch	41,58
Faccin <i>et al.</i> , 2013	DSM32	Sacarosa	Batch	3,3
Moreno <i>et al.</i> , 2015	B2	Glicerol crudo	Fed-Batch	2,06

Sin embargo, las producciones más altas de PHB por cepas de *Bacillus megaterium* han sido reportadas para procesos que emplean azúcares como fuente de carbono (Sacarosa y Melaza de caña). La mayor producción de PHB a

partir de azúcares, en comparación con la alcanzada con otros sustratos, se puede esperar ya que estos son sustratos de fácil asimilación.

El factor clave en los cultivos Fed-Batch es la determinación de los flujos de alimentación. Una estrategia para el cálculo de los flujos de alimentación es la simulación del proceso a partir de un modelo matemático. Las cinéticas microbianas pueden ser descritas por cuatro tipos de modelos: modelos segregados si consideran cada célula individualmente, no segregados si consideran el conjunto como un todo, estructurados si se considera constante la concentración interna de la célula y no estructurados si se considera variable la concentración interna de la célula⁸⁷.

Aunque los modelos estructurados y segregados permiten un mayor entendimiento de los procesos internos que ocurren en las diferentes rutas metabólicas, los modelos no estructurados y no segregados son preferidos frecuentemente debido a su menor costo computacional, logrando muy buenas descripciones de los metabolitos y nutrientes cuantificados. El eje principal de los modelos no estructurados y no segregados es la ecuación que describe la velocidad específica de crecimiento microbiano, la cual es función de el o los sustratos limitantes del proceso⁸⁸.

En la literatura se reportan más de 11 modelos matemáticos no estructurados, no segregados que describen la producción de PHB por diferentes cepas bacterianas y a partir de diferentes sustratos. Los modelos encontrados en la literatura incluyen el efecto de máximo dos sustratos limitantes y sólo uno de ellos contempla el efecto de la concentración de oxígeno sobre la velocidad específica de crecimiento. La Tabla 12 muestra las expresiones usadas para la velocidad específica de crecimiento, para diferentes procesos de producción de PHB.

⁸⁷ SHULER, Michael y KARGI, Fikret. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. 2 ed. Prentice Hall, 2002, 553 p. ISBN: 0-13-081908-5

⁸⁸ *Ibíd.*

Tabla 12. Expresiones para la velocidad específica de crecimiento usadas para diferentes procesos de producción de PHB

Autor	Fuente de carbono	Microorganismo	Velocidad específica de crecimiento
Gahlawat y Srivastava, 2017	Sacarosa	<i>Alcaligenes latus</i>	$\mu = \mu_m \left(\frac{S_1}{K_{S_1} + S_1} \right) * \left(\frac{S_2^n}{S_2^n + K_{S_1}^n} \right) * \left(\frac{K_1}{K_1 + S_1} \right) * \left(1 - \left(\frac{S_2}{S_m} \right)^a \right)$
Moreno, 2015	Glicerol	<i>Bacillus megaterium</i>	$\mu = \mu_m * \left(\frac{S^n}{S^n + K_S^n} + \frac{O}{O + K_O} \right)$
Gahlawat y Srivastava, 2013	Sacarosa	<i>Azohydromonas australica</i>	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_S + S} \right) * \left(\frac{N^n}{N^n + K_N^n} \right) * \left(\frac{S_m}{S_m + S} \right) * \left(1 - \left(\frac{N}{N_m} \right)^m \right)$
Faccin <i>et al.</i> , 2012	Sacarosa	<i>Bacillus megaterium</i>	$\mu = \mu_m \frac{N}{K_N + N}$
Penloglou <i>et al.</i> , 2012	Sacarosa	<i>Azohydromonas lata</i>	$\mu = \mu_m \frac{N/S}{K_{N/S} + N/S}$
Pirouz <i>et al.</i> , 2011	Glucosa, fructosa y suero de leche	<i>Azotobacter beijerinckii</i>	$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{R}{R_m} \right)$
Mahmoudi <i>et al.</i> , 2010	Glucosa y Fructosa	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S}$ $\mu = \mu_m \left(1 - \frac{R}{R_m} \right)$
Somashekara <i>et al.</i> , 2009	Sacarosa	<i>Bacillus flexus</i>	$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{R}{R_m} \right)$
Patwardhan y Srivastava, 2008	Fructosa	<i>Cupriavidus necator</i>	$\mu = \left(\mu_{m1} \left(\frac{N}{K_N + N} \right) + \mu_{m2} \left(\frac{\left(\frac{N}{K_{N2}} \right)^n}{1 + \left(\frac{N}{K_{N2}} \right)^n} \right) \right) * \left(1 - \left(\frac{N/S}{N_m} \right)^m \right)$

Tabla 12. Continuación

Autor	Fuente de carbono	Microorganismo	Velocidad específica de crecimiento
Wang <i>et al.</i> , 2007	Ácido butírico y fructosa	<i>Cupriavidus necator</i>	$\mu = \mu_m \frac{S_o/X_o}{K_{S/X} + S_o/X_o}$
Khanna y Srivastava., 2006	Fructosa	<i>Cupriavidus necator</i>	$\mu = \mu_m \left(\frac{S^n}{K_S^n + S^n} \right) * \left(\frac{N^m}{N^m + K_N^m} \right) * \left(1 - \left(\frac{S}{S_m} \right)^p \right) * \left(1 - \left(\frac{N}{N_m} \right)^q \right)$
Raje y Srivastava 1998	Fructosa	<i>Cupriavidus necator</i>	$\mu = \left(\mu_{m1} \left(\frac{N}{K_N + N} \right) + \mu_{m2} \left(\frac{\left(\frac{N}{K_{N2}} \right)^n}{1 + \left(\frac{N}{K_{N2}} \right)^n} \right) \right) * \left(1 - \left(\frac{N/S}{N_m} \right)^m \right)$

Se observa en la Tabla 12 que la mayoría de los modelos han sido desarrollados para cepas Gram negativas como *Cupriavidus necator*, sin embargo, se destaca el uso generalizado de dos expresiones base que componen las expresiones de la velocidad específica de crecimiento:

$$\text{Ecuación tipo Moser} \quad \frac{S^n}{S^n + K_S^n}$$

$$\text{Ecuación tipo Monod} \quad \frac{S}{S + K_S}$$

Donde:

S: concentración de sustrato K_S, n : parámetros cinéticos ⁸⁹

⁸⁹ SHULER, Michael y KARGI, Fikret. Bioprocess Engineering Basic Concepts. 2 ed. Prentice Hall, 2002, 553 p. ISBN: 0-13-081908-5

Debido a la sinergia existente entre el oxígeno y el nitrógeno y a que, bajo condiciones específicas la fuente de carbono puede ser el sustrato limitante del proceso, se desarrolló un modelo matemático no estructurado, no segregado que contempla la influencia de estos tres sustratos sobre el proceso de producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol crudo. El modelo desarrollado fue empleado posteriormente para el diseño de cultivos Fed-Batch.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Microorganismo y medio de cultivo Se empleó la cepa *Bacillus megaterium* B2 crio preservada posterior a la adaptación descrita ...en la sección 1.3.4...El medio de cultivo empleado fue el medio de sales modificado como se describe ...en la sección 1.3.3... y cuya formulación se muestra en la Tabla 6. Se empleó una relación carbono nitrógeno de 10 ya que en esta condición se alcanzó la mayor concentración de PHB.

3.2.2. Condiciones de cultivo Los experimentos fueron realizados en un biorreactor BioFlo Celligen 115 (New Brunswick) con un volumen total de 7.5 litros y un volumen de operación de 4 litros. Se empleó un porcentaje de inóculo del 5%. La temperatura y el pH se controlaron en 34 °C y 7 respectivamente. El control de pH se realizó mediante la adición de solución de KOH 2 M. Todos los experimentos iniciaron con 100% de saturación de O₂ en el medio de fermentación, un flujo de aire de 1 L/min y 200 rpm de agitación. Se fijó un valor mínimo de oxígeno disuelto de acuerdo con los experimentos realizados y se permitió la variación automática de las revoluciones dentro del rango de 200 rpm a 600 rpm con el fin de realizar el control.

Se prepararon soluciones para la alimentación de glicerol y nitrógeno, denominadas soluciones Fed-Batch. Se diluyó glicerol crudo en agua destilada hasta alcanzar una concentración de 500 g/L de glicerol. Cuando se requirió la adición simultánea de nitrógeno, se agregó sulfato de amonio a la solución hasta alcanzar 17 g/L de N.

Las fermentaciones se realizaron por duplicado durante 48 horas con una toma de muestra cada 4 horas para la medición de glicerol, PHB, biomasa y nitrógeno.

3.2.3. Métodos analíticos Las mediciones de concentración biomasa, PHB, glicerol y nitrógeno se realizaron siguiendo los procedimientos descritos ...en la sección 1.2.3...

La concentración de oxígeno disuelto fue medida mediante un sensor polarográfico InPro 6800 conectado en línea al biorreactor. La estimación de la concentración se realizó mediante calibración previa del sensor, determinándose la máxima concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo estéril en 7 mg O₂/L.

3.2.4. Cultivo en modo Batch Se tomó como experimento en modo Batch aquel con la mayor concentración de PHB, según los resultados descritos ...en la sección 2.3.1...

3.2.5. Modelado y simulación del proceso

La variación de la concentración de un sustrato o de un metabolito en cultivos Batch puede ser entendida en función de las velocidades de generación y de consumo:

$$\left[\begin{array}{l} \text{Variación de} \\ \text{concentración} \\ \text{en el tiempo} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Velocidad de} \\ \text{generación} \\ \text{de la especie} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Velocidad de} \\ \text{consumo} \\ \text{de la especie} \end{array} \right]$$

$$\frac{dy_i}{dt} = \sum r_{gen} - \sum r_{con} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde y_i corresponde a cada variable medida durante la fermentación (Masa/Volumen) y r_{gen} y r_{con} son las velocidades de generación y consumo de la sustancia (Masa/Volumen*Tiempo), respectivamente.

Debido a que las células actúan como catalizadores del proceso, se puede reescribir la Ecuación 1 en función de una velocidad específica de variación de la sustancia y la concentración de células:

$$\frac{dy_i}{dt} = q_i * x \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde q_i es la velocidad específica de variación de la sustancia (1/Tiempo) y x es la concentración de biomasa (Masa/Volumen). El término q_i puede ser positivo o negativo dependiendo si la sustancia se está generando o consumiendo.

3.2.5.1. Balance de biomasa La variación en la concentración de biomasa sin considerar muerte celular puede ser descrita por la Ecuación 3:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Variación de Biomasa} \\ \text{en el tiempo} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad específica} \\ \text{de crecimiento} \end{array} \right] * \left[\begin{array}{c} \text{Concentración de} \\ \text{Biomasa} \end{array} \right]$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu * x \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

μ : Velocidad específica de crecimiento (1/h) x : Concentración de biomasa (g/L)

3.2.5.2. Balance de PHB La variación de la concentración de PHB en el medio de cultivo es un balance entre la generación de PHB asociada y no asociada al crecimiento y el consumo de PHB por parte del microorganismo en ausencia de fuente de carbono. Podemos describir por lo tanto la variación de la concentración de PHB de acuerdo con la Ecuación 4:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Variación} \\ \text{de PHB en} \\ \text{el tiempo} \end{array} \right] = \left(\left[\begin{array}{c} \text{Generación} \\ \text{de PHB} \\ \text{asociada al} \\ \text{crecimiento} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Generación} \\ \text{de PHB no} \\ \text{asociada al} \\ \text{crecimiento} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Consumo} \\ \text{de PHB} \end{array} \right] \right) * \left[\begin{array}{c} \text{Concentración} \\ \text{de} \\ \text{biomasa} \end{array} \right]$$

$$\frac{dP}{dt} = q_p * x = \left(Y_{p/x} \mu + k_p - f(S) \right) x \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

P : Concentración de PHB $\left(\frac{g}{L}\right)$ q_p : velocidad específica de variación de PHB $\left(\frac{g}{g * h}\right)$

$Y_{p/x}$: Rendimiento producto biomasa $\left(\frac{g}{g}\right)$ $f(S)$: término de consumo de PHB $\left(\frac{g}{g * h}\right)$

k_p : constante de formación de producto no asociado al crecimiento $\left(\frac{g}{g * h}\right)$

3.2.5.3. Balance de glicerol El glicerol es consumido para el crecimiento celular, la formación de producto y el mantenimiento celular. La Ecuación 5 corresponde al balance general de sustrato:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Variación} \\ \text{de glicerol} \\ \text{en el} \\ \text{tiempo} \end{array} \right] = \left(- \left[\begin{array}{c} \text{Consumo} \\ \text{de glicerol} \\ \text{asociado al} \\ \text{crecimiento} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Consumo de} \\ \text{glicerol no} \\ \text{asociado al} \\ \text{crecimiento} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Constante} \\ \text{de} \\ \text{mantenimiento} \end{array} \right] \right) * \left[\begin{array}{c} \text{Concentración} \\ \text{de} \\ \text{biomasa} \end{array} \right]$$

$$\frac{dS}{dt} = q_s * x = \left(- \frac{\mu}{Y_{x/s}} - \frac{q_P}{Y_{p/s}} - m_s \right) x \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

S : Concentración de glicerol $\left(\frac{g}{L}\right)$ q_s : velocidad específica de variación de glicerol $\left(\frac{g}{g * h}\right)$

$Y_{x/s}$: Rendimiento biomasa sustrato $\left(\frac{g}{g}\right)$ $Y_{p/s}$: Rendimiento producto sustrato $\left(\frac{g}{g}\right)$

m_s : constante de mantenimiento $\left(\frac{g}{g * h}\right)$

3.2.5.4. Balance de nitrógeno Al ser el PHB un producto no nitrogenado, la variación de nitrógeno en el cultivo puede describirse según la Ecuación 6.

$$\left[\begin{array}{c} \text{Variación} \\ \text{de nitrógeno} \\ \text{en el} \\ \text{tiempo} \end{array} \right] = \left(- \left[\begin{array}{c} \text{Consumo} \\ \text{de nitrógeno} \\ \text{asociado al} \\ \text{crecimiento} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Constante} \\ \text{de} \\ \text{mantenimiento} \end{array} \right] \right) * \left[\begin{array}{c} \text{Concentración} \\ \text{de} \\ \text{biomasa} \end{array} \right]$$

$$\frac{dN}{dt} = q_N * x = \left(- \frac{\mu}{Y_{x/N}} - m_N \right) x \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

N : Concentración de nitrógeno $\left(\frac{g}{L}\right)$ $Y_{x/N}$: Rendimiento biomasa/nitrógeno $\left(\frac{g}{g}\right)$

q_N : velocidad específica de variación de nitrógeno $\left(\frac{g}{g * h}\right)$

m_s : Constante de mantenimiento celular $\left(\frac{g}{g * h}\right)$

3.2.5.5. Balance de oxígeno Aunque el oxígeno disuelto en el medio de cultivo fue controlado, este varió libremente desde el inicio de la fermentación hasta el punto en que alcanzó el mínimo establecido. Por lo tanto, se planteó un balance para la concentración de oxígeno disuelto, el cual es válido desde el inicio de la fermentación, hasta alcanzar el mínimo de oxígeno disuelto. La variación de la concentración de oxígeno tiene en cuenta la transferencia de oxígeno debido a la agitación y aireación durante la fermentación. La Ecuación 7 describe la variación libre de oxígeno disuelto en el medio de cultivo⁹⁰.

$$\left[\begin{array}{c} \text{Variación} \\ \text{de oxígeno} \\ \text{en el} \\ \text{tiempo} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad de} \\ \text{transferencia} \\ \text{de oxígeno} \end{array} \right] + \left(- \left[\begin{array}{c} \text{Consumo} \\ \text{de oxígeno} \\ \text{asociado al} \\ \text{crecimiento} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Consumo} \\ \text{de oxígeno no} \\ \text{asociado al} \\ \text{crecimiento} \end{array} \right] \right) * \left[\begin{array}{c} \text{Concentración} \\ \text{de} \\ \text{biomasa} \end{array} \right]$$

⁹⁰ MAVITUNA, Ferda y SINCLAIR, Charles G. Modelling the Kinetics of Biological Activity in Fermentation Systems. En: MCNEIL, Brian y HARVEY, Linda M. Practical Fermentation Technology. Wiley, 2008, 402 p. ISBN: 978-0-470-01434-9.

$$\frac{dO_2}{dt} = k_L a * (C_g^* - C_{O_2}) + (-k_4 * \mu - k_5) * x \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

O_2 : Concentración de oxígeno (mg/L)

$k_L a$: Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (1/h)

C_g^* : Concentración máxima de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (mg/L)

C_{O_2} : Concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (mg/L)

k_4 : Constante de consumo de oxígeno asociado al crecimiento (mg/L)

k_5 : Constante de consumo de oxígeno no asociado al crecimiento (mg/(L * h))

3.2.5.6. Estimación de los parámetros cinéticos La estimación de los valores de los parámetros cinéticos se realizó en dos etapas: primero mediante análisis de las cinéticas obtenidas y finalmente mediante optimización matemática.

Para la optimización de los parámetros cinéticos, se construyó un algoritmo empleando el software MATLAB R2017b (MathWorks) en donde se minimizó el error de las concentraciones estimadas con respecto a los valores experimentales. Se empleó la función ODE45 para la solución de las ecuaciones diferenciales y el optimizador fmincon para la estimación de los parámetros.

Se planteó como función objetivo de la optimización el porcentaje de error relativo entre las concentraciones experimentales y las calculadas mediante el modelo. La Ecuación 8 muestra la función objetivo empleada:

$$F_{obj} = \sum_j \sum_i \frac{|C_{ij} - \tilde{C}_{ij}|}{C_{ij}} * 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde C_{ij} y \tilde{C}_{ij} son respectivamente, los valores experimentales y predichos por el modelo de la especie j (Biomasa, PHB, glicerol, nitrógeno, oxígeno y velocidad de crecimiento) en el punto experimental i , respectivamente.

3.2.6. Estrategia de cultivo Fed-Batch basada en simulación

Para el cultivo en modo Fed-Batch se tiene una corriente de alimentación de entrada al proceso. Durante la fermentación no se retira medio de cultivo del reactor (Se considera despreciable el volumen de muestreo), por lo que el cambio de volumen en el fermentador depende sólo de la corriente de ingreso. El balance global del proceso se muestra en la Ecuación 9:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Flujo volumétrico} \\ \text{de entrada} \\ \text{al reactor} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Flujo volumétrico} \\ \text{de salida} \\ \text{del reactor} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Variación de volumen} \\ \text{en el tiempo} \end{array} \right]$$

$$F_{\text{entrada}} - F_{\text{salida}} = \frac{dV}{dt}$$

$$F = \frac{dV}{dt} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde: V : volumen del medio (L) F : flujo de alimentación (L/h)

Debido al incremento en el volumen, los balances de masa de los sustratos y los metabolitos deben ser construidos teniendo en cuenta el volumen variable y el flujo de entrada al proceso. El balance general para cualquier especie puede ser entendido en función de las velocidades de generación y de consumo y de las tasas de flujo másico:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Variación} \\ \text{de masa} \\ \text{en el tiempo} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad de} \\ \text{generación} \\ \text{de la especie} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad de} \\ \text{consumo} \\ \text{de la especie} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad de} \\ \text{entrada de} \\ \text{masa de la} \\ \text{especie} \end{array} \right]$$

$$\frac{dVy_i}{dt} = \sum Vr_{gen} - \sum Vr_{con} + F_i y_i = q_i Vx + F_i y_i$$

3.2.6.1. Balance de biomasa Sin considerar muerte celular y teniendo en cuenta una alimentación estéril, la Ecuación 10 describe el balance general de la variación de biomasa en el medio:

$$\frac{dVx}{dt} = \mu xV \quad \text{Ecuación 10}$$

Desarrollando el término de la izquierda, se obtiene la variación de la concentración de biomasa en términos del factor de dilución (Ecuación 11):

$$V \frac{dx}{dt} + x \frac{dV}{dt} = \mu xV \quad V \frac{dx}{dt} + xF = \mu xV \quad \frac{dx}{dt} = \mu x - \frac{F}{D} x$$

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde

$$D: \text{Factor de dilución} = \frac{F}{V} \left(\frac{1}{h} \right) \quad \mu: \text{velocidad específica de crecimiento (1/h)}$$

x : concentración de biomasa (g/L)

3.2.6.2. Balance de glicerol El balance en modo Fed-Batch para la concentración de glicerol se obtiene de forma similar al de biomasa, pero teniendo en cuenta el flujo de alimentación. La Ecuación 12 describe el balance general de la variación de sustrato en el medio:

$$\frac{dVS}{dt} = q_S x V + F S_o \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde S_o : Concentración de glicerol en la corriente de alimentación (g/L)

Desarrollando el término de la izquierda obtenemos la variación de la concentración de glicerol en términos del factor de dilución (Ecuación 13):

$$V \frac{dS}{dt} + S \frac{dV}{dt} = q_S x V + F S_o \quad V \frac{dS}{dt} + S F = q_S x V + F S_o \quad \frac{dS}{dt} + S \frac{F}{V} = q_S x + \frac{F}{V} S_o$$

$$\frac{dS}{dt} = q_S x + \frac{F}{V} S_o - S \frac{F}{V} \quad \frac{dS}{dt} = q_S x + D S_o - S D$$

$$\frac{dS}{dt} = q_S x + D(S_o - S) \quad \text{Ecuación 13}$$

3.2.6.3. Balance de nitrógeno De forma similar obtenemos el balance para la variación de nitrógeno (Ecuación 14):

$$\frac{dVN}{dt} = q_N x V + F N_o \quad V \frac{dN}{dt} + N \frac{dV}{dt} = q_N x V + F N_o \quad V \frac{dN}{dt} + N F = q_N x V + F N_o$$

$$\frac{dN}{dt} + N \frac{F}{V} = q_N x + \frac{F}{V} N_o \quad \frac{dN}{dt} = q_N x + \frac{F}{V} N_o - N \frac{F}{V} \quad \frac{dN}{dt} = q_N x + D N_o - N D$$

$$\frac{dN}{dt} = q_N x + D(N_o - N) \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde N_o : Concentración de nitrógeno en la corriente de alimentación (g/L)

3.2.6.4. Balance de PHB El balance para la concentración de producto se muestra en la Ecuación 15:

$$\frac{dVP}{dt} = q_P x V \quad V \frac{dP}{dt} + P \frac{dV}{dt} = q_P x V \quad V \frac{dP}{dt} + PF = q_P x V$$

$$\frac{dP}{dt} + P \frac{F}{V} = q_P x \quad \frac{dP}{dt} = q_P x - P \frac{F}{V}$$

$$\frac{dP}{dt} = q_P x - PD$$

Ecuación 15

3.2.6.5. Cultivo en modo Fed-Batch Se diseñaron dos cultivos en modo Fed Batch con el fin de aplicar limitación de fuente de nitrógeno u oxígeno al cultivo. Los cultivos se iniciaron en modo Batch y se buscó mantener constante la concentración de glicerol una vez esta disminuyó a un valor de 8 g/L mediante alimentación de la solución Fed-Batch. Se fijó esta concentración de glicerol con el fin de evitar el agotamiento de la fuente de carbono y porque para ese punto ya se había producido un 80% de la biomasa total del experimento en modo Batch. El flujo de alimentación de solución Fed-Batch fue calculado mediante la simulación del cultivo. Se simularon dos procesos Fed-Batch:

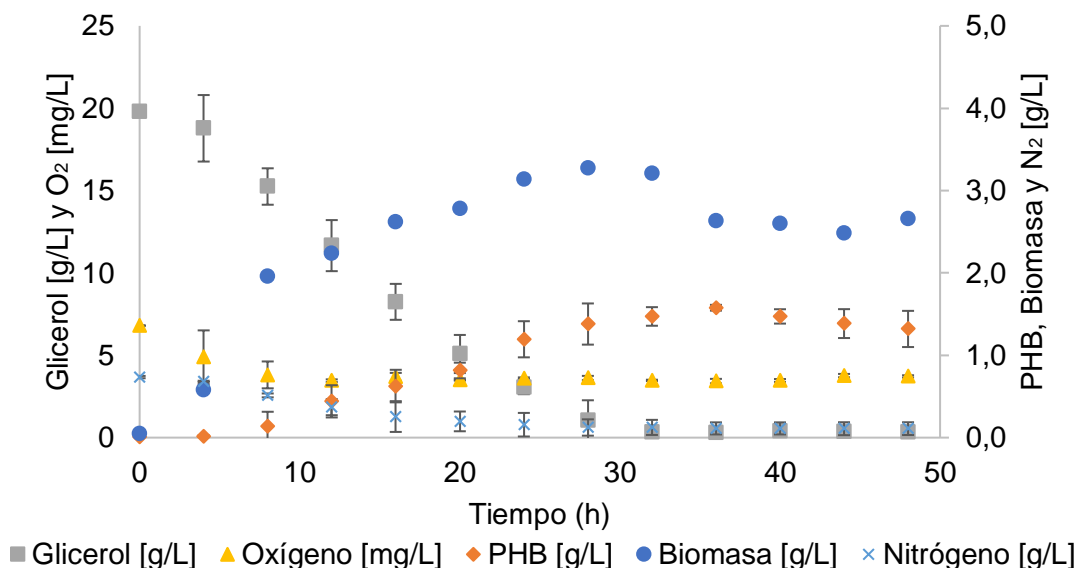
Fed-Batch 1: Una vez alcanzada una concentración de 8 g/L de glicerol se inició adición de glicerol crudo con el fin de mantener este valor constante. La concentración mínima de OD se fijó en 3,5 mg/L durante todo el experimento. No se adicionó fuente de N₂. A esta estrategia se le llamó Fed-Batch con limitación de nitrógeno.

Fed-Batch 2: Una vez alcanzada una concentración de 8 g/L de glicerol se inició la adición de solución Fed-Batch con el fin de mantener este valor constante y se cambió el set point de concentración de oxígeno de 3,5 mg/L a 0,35 mg/L. La concentración de N₂ en la solución Fed-Batch fue calculada previamente con el fin de mantener su concentración constante en el medio de cultivo. A esta estrategia se le llamó Fed-Batch con limitación de oxígeno.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Cultivo en modo Batch La Figura 23 muestra la cinética obtenida para la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N = 10 y OD = 3,5 mg/L.

Figura 23. Cinética de producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N = 10 y OD = 3,5 mg/L.



Con respecto a la producción de biomasa, no se observa una fase de latencia en la curva de crecimiento del microorganismo, lo que indica que esta tuvo una duración menor a 4 horas. Aunque el crecimiento exponencial se dio sólo durante las primeras 8 horas del proceso, la máxima concentración de biomasa se alcanzó a la hora 28 del proceso, con un valor de 3,27 g/L. El consumo de glicerol inició desde la hora cero del proceso, hasta la hora 32 cuando se dio el agotamiento total del mismo. El consumo de nitrógeno se dio durante el mismo intervalo de tiempo que el de glicerol, permaneciendo un remanente de 0,12 g/L de nitrógeno,

lo que equivale al 16% del nitrógeno agregado. Este comportamiento indica que el nitrógeno no es asimilado por el microorganismo en ausencia de fuente de carbono.

La producción de PHB siguió un comportamiento similar que la producción de biomasa, pero su máximo se alcanzó a las 36 horas de cultivo. La producción de PHB observada posterior al cese de producción de biomasa muestra que el biopolímero es generado por B2 tanto asociado como no asociado al crecimiento, convirtiéndolo en un metabolito mixto. La formación de PHB se dio en un 87% asociado al crecimiento y en un 13% no asociado al crecimiento. Dicho comportamiento indica además que se presentó un consumo de sustrato para la formación de producto no asociado al crecimiento. Se observa un consumo de PHB a partir de la hora 36, provocado por el agotamiento de la fuente de carbono y el cual es empelado principalmente para el mantenimiento celular y la formación de esporas⁹¹.

La concentración de oxígeno disuelto alcanzó los 3,5 mg/L a las doce horas de cultivo, momento a partir del cual se mantuvo constante por acción del sistema de control del biorreactor.

3.3.2. Modelado y simulación del proceso

3.3.2.1. Balance de biomasa Para la determinación de la función que describe velocidad específica de crecimiento se calcularon los valores experimentales de velocidad específica de crecimiento mediante la Ecuación 16:

⁹¹ BABEL, Wolfgang, *et al.* Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

Ecuación 16

Se determinó una función tal que $x = f(t)$ y esta se derivó para calcular los valores de dx/dt . Se emplearon los valores de $f'(t)$ mayores a cero para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento. Los cálculos se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento empleando la Ecuación 16.

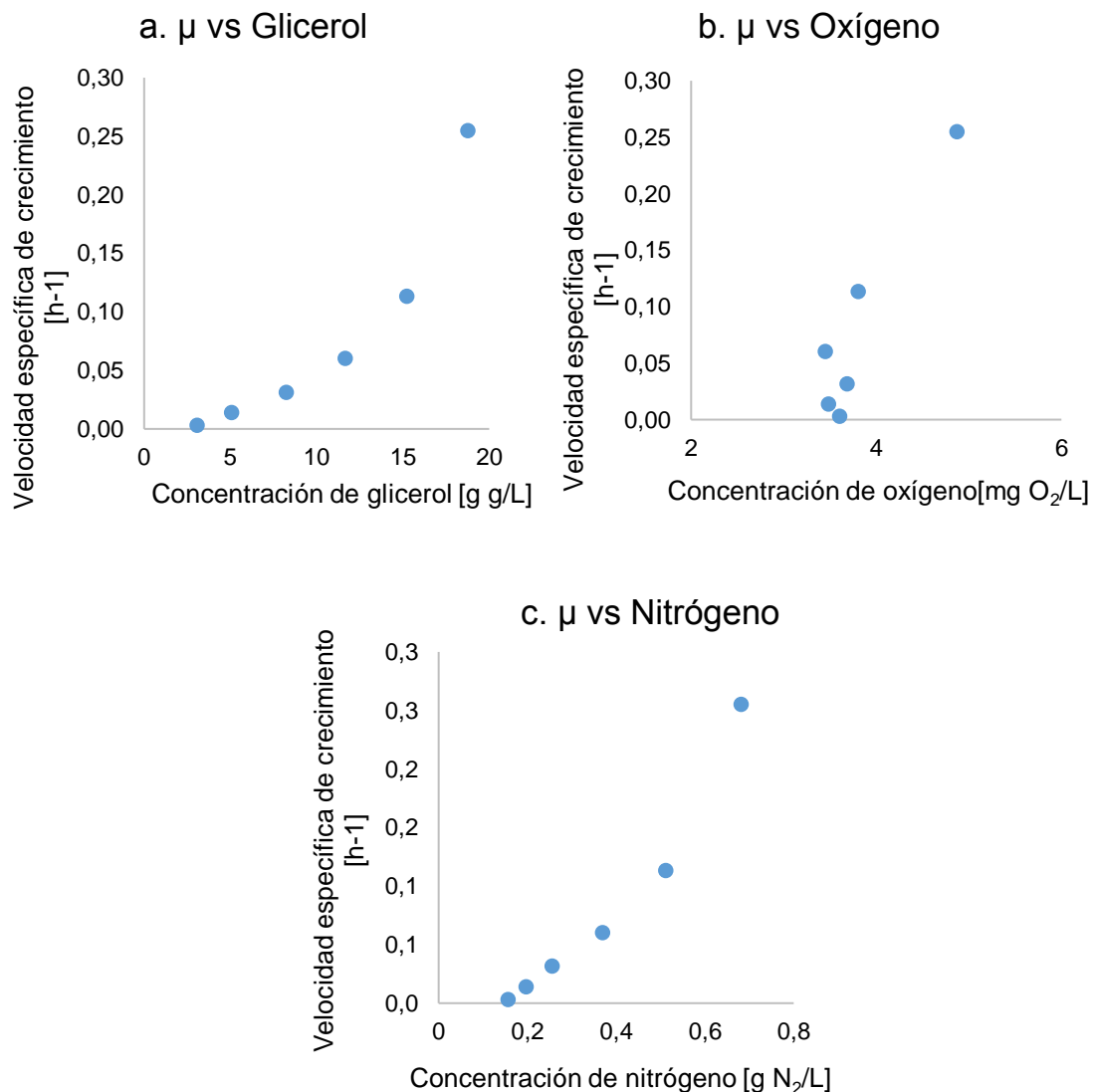
Hora	Biomasa (g/L)	dx/dt (g/Lh ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
0	0,0000	0,2079	ln*
4	0,8302	0,2116	0,2549
8	1,6316	0,1845	0,1131
12	2,2788	0,1370	0,0601
16	2,7223	0,0852	0,0313
20	2,9709	0,0410	0,0138
24	3,0662	0,0087	0,0028

* Indeterminado

Como se observa en la Tabla 13 la función empleada para el ajuste de biomasa vs tiempo pasa por el punto (0,0) por lo que la velocidad específica queda indeterminada para las cero horas. Debido a esto se emplearon los valores de la hora 4 a la 24 para los cálculos posteriores. Como sustratos limitantes del crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 se seleccionaron la concentración de glicerol, nitrógeno y oxígeno. Sin fuente de carbono o nitrógeno, el microorganismo es incapaz de construir los aminoácidos necesarios para la formación de proteínas. Por otra parte, al ser *Bacillus megaterium* un microorganismo estrictamente aerobio, una limitación de oxígeno afecta negativamente su crecimiento. Se graficó la velocidad específica de crecimiento vs

la concentración de cada sustrato para determinar la relación matemática. La Figura 24 muestra la variación de la velocidad específica de crecimiento en función de los sustratos limitantes.

Figura 24. Variación en la velocidad específica de crecimiento en función de los sustratos limitantes: a. Glicerol, b. Oxígeno y c. Nitrógeno



Se observa que, para el nitrógeno y glicerol, la variación de la velocidad específica de crecimiento tiene una tendencia exponencial. Este comportamiento puede ser

descrito por la ecuación de crecimiento de Moser⁹². Para el caso del oxígeno, la gráfica tiene una forma característica de la ecuación de Monod. Por lo tanto, se construyó la función de la velocidad específica de crecimiento teniendo en cuenta los aportes de los tres sustratos limitantes, como se muestra en la Ecuación 17:

$$\mu = \mu_m * \left(\frac{S^n}{S^n + K_S} \right) * \left(\frac{O_2}{O_2 + K_O} \right) * \left(\frac{N_2^m}{N_2^m + K_N} \right) \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde:

μ_m : Velocidad máxima específica de crecimiento (1/h)

S : concentración de glicerol (g/L) O_2 : concentración de oxígeno (mg/L)

N_2 : concentración de nitrógeno (g/L) n, m : constantes empíricas

K_S, K_N : constantes empíricas (g/L) K_O : constante de Monod (mg/L)

La Ecuación 17 se compone del aporte de 4 factores: el primero es la constante de velocidad máxima de crecimiento y los tres restantes son el aporte de los sustratos limitantes. Las constantes n y m dan efecto de curvatura a la función de Moser, el cual se puede apreciar en la Figura 24. a. y Figura 24. c. Las constantes K_S, K_N y K_O , indican que tan limitante es el sustrato sobre el crecimiento del microorganismo⁹³. A medida que el valor de dichas constantes tiende a cero, el término para el respectivo sustrato tiende a uno, por lo que se puede decir que no es limitante del proceso. Por el contrario, a medida que el valor de las constantes aumenta, el valor de la velocidad específica de crecimiento disminuye, por lo que el respectivo sustrato es limitante. Físicamente, los valores bajos de las constantes K_S, K_N y K_O indican afinidad del microorganismo por el sustrato.

⁹² SHULER, Michael y KARGI, Fikret. Bioprocess Engineering Basic Concepts. 2 ed. Prentice Hall, 2002, 553 p. ISBN: 0-13-081908-5

⁹³ FOGLER, H. Scott. Elements of Chemical Reaction Engineering: Pearson New International Edition. 4 ed. Pearson, 2013, 880 p. ISBN: 9781292026169.

Los parámetros de la Ecuación 17 se estimaron de tal forma que se redujera el error con los valores de μ experimentales, calculados con la Ecuación 16. Los valores calculados a partir de la Ecuación 17 se denominaron μ teórico. La Tabla 14 muestra los parámetros cinéticos de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo calculados para la Ecuación 17.

Tabla 14. Parámetros cinéticos asociados a la velocidad específica de crecimiento

Parámetro	Valor	Unidad
μ_m	1,4	h^{-1}
n	1,8	-
K_S	1,6	$g L^{-1}$
K_O	1	$mg L^{-1}$
K_N	1,6	$g L^{-1}$
n	2,1	-

La Tabla 15 muestra la comparación entre la velocidad específica de crecimiento teórica y la experimental.

Tabla 15. Comparación entre la velocidad específica de crecimiento teórica y experimental

Hora	μ experimental [h^{-1}]	μ calculado [h^{-1}]
0	0,299	0,299*
4	0,255	0,252
8	0,113	0,146
12	0,060	0,077
16	0,031	0,037
20	0,014	0,020
24	0,003	0,011

*Fijado de acuerdo con el valor teórico

En la Tabla 15 se observa el buen grado de ajuste obtenido con la Ecuación 17, alcanzándose un coeficiente de correlación de $R^2=0,995$.

3.3.2.2. Balance de PHB Excluyendo el término de consumo de PHB, la Ecuación 4 se transforma en el modelo de Luedeking-Piret⁹⁴. Los parámetros $Y_{p/x}$ y k_p fueron calculados por linealización del modelo de Luedeking-Piret y empleando los datos de la curva de PHB en los cuales se mantuvo producción del polímero (0 h – 36 h). La Tabla 16 muestra los valores calculados para los parámetros $Y_{p/x}$ y k_p :

Tabla 16. Parámetros cinéticos asociados con la producción de PHB

Parámetro	Valor	Unidad
$Y_{p/x}$	0.1314	g g^{-1}
k_p	0.0157	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

Una vez agotada la fuente de carbono, no se presenta formación de producto, por lo que la Ecuación 4 se reduce a la Ecuación 18:

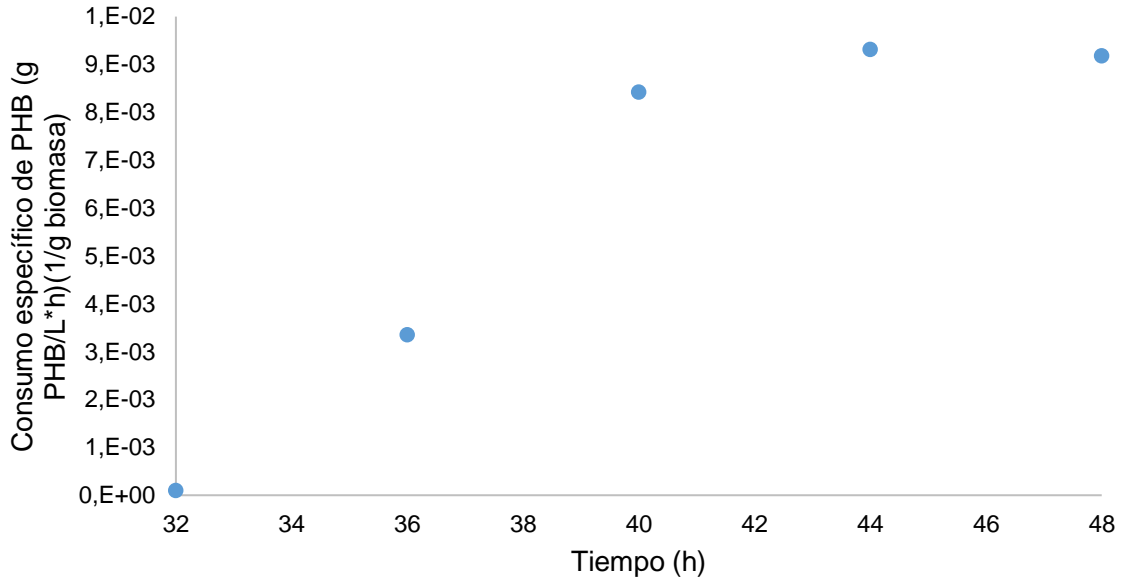
$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = -f(S) \quad \text{Ecuación 18}$$

Ya que para valores de $S=0$ se tienen diferentes valores de la función, se graficó la velocidad específica de consumo de PHB vs el tiempo con el fin de determinar la forma de la función $f(S)$ (Ver Figura 25).

En la Figura 25 se observa que el consumo de PHB inicia desde la hora 32 con un valor de 0,0001 (g PHB/L*h)(1/g biomasa) alcanzando un valor de 0,009 (g PHB/L*h)(1/g biomasa) en la hora 48.

⁹⁴ LUEDEKING, Robert y PIRET, Edgar L. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation Batch Process at Controlled pH. En: Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering. Diciembre, 1959, vol. 1, no. 4, p. 393-412.

Figura 25. Consumo específico de PHB vs tiempo



Este comportamiento indica que a medida que la concentración de sustrato tiende a cero, el consumo de PHB pasa desde cero hasta 0,009 (g PHB/L*h)(1/g biomasa) describiendo una curva inversa a la observada en la Figura 23. La forma inversa de la función observada en la Figura 23 puede ser descrita por el modelo Ratkowsky, el cual a medida que la variable tiende a cero, la función alcanza su valor máximo, y a medida que el valor de la variable independiente aumenta, la función tiende a cero⁹⁵. Por lo tanto, el consumo de PHB en función de la concentración de sustrato puede ser descrito según la Ecuación 19:

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{k_1}{1 + e^{k_2 S - k_3}} x \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde:

k_1 : Velocidad máxima específica de consumo de PHB $\left(\frac{g}{L * h}\right) \left(\frac{1}{g}\right)$

⁹⁵ RATKOWSKY, D. A., *et al.* Model for Bacterial Culture Growth Rate Throughout the Entire Biokinetic Temperature Range. En: Journal of Bacteriology. Junio, 1983, vol. 154, no. 3, p. 1222-1226.

k_2 : constante empírica $\left(\frac{L}{g}\right)$ k_3 : constante empírica

Se realizó una estimación preliminar de los parámetros de la Ecuación 19, obteniéndose los valores mostrados en la Tabla 17.

Tabla 17. Estimación inicial de los parámetros cinéticos asociados al consumo de PHB por *Bacillus megaterium* B2

Parámetro	Valor	Unidad
k_1	0.00924	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$
k_2	12.0226	$L\ g^{-1}$
k_3	8.43375	-

3.3.2.3. Balance de glicerol El consumo de glicerol no asociado al crecimiento se observó desde la hora 24 a la 32, tiempo en el cual la concentración de glicerol pasó de 3,064 g/L a 0,345 g/L sin formación considerable de biomasa. En este período de tiempo el consumo de glicerol estuvo gobernado por los términos de la Ecuación 20, la cual es una ecuación de línea recta:

$$\frac{1}{x} \frac{dS}{dt} = -\frac{q_P}{Y_{p/s}} - m_s \quad \text{Ecuación 20}$$

A partir de la Ecuación 20 y empleando los datos experimentales de la hora 24 a la 32 del proceso, se obtuvo la estimación preliminar de los parámetros de consumo de glicerol no asociados al crecimiento, los cuales se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Parámetros cinéticos de consumo de glicerol no asociado al crecimiento

Parámetro	Valor	Unidad
$Y_{p/s}$	0,1068	$g\ g^{-1}$
m_s	0,0	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$

Una vez estimados los parámetros de consumo no asociados al crecimiento, se reorganizó la Ecuación 5, como se muestra en la Ecuación 21 y se calcularon los parámetros de consumo asociados al crecimiento, mostrados en la Tabla 19:

$$\frac{1}{x} \frac{dS}{dt} + \frac{q_P}{Y_{p/s}} = \left(-\frac{\mu}{Y_{x/s}} - m_s \right) \quad \text{Ecuación 21}$$

Tabla 19. Parámetros cinéticos de consumo de glicerol asociados al crecimiento

Parámetro	Valor	Unidad
$Y_{x/s}$	0,4256	$g\ g^{-1}$
m_s	0,0	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$

3.3.2.4. Balance de Nitrógeno Se linealizó la Ecuación 6 y los parámetros fueron estimados por ajuste gráfico. La estimación inicial de los parámetros asociados al consumo de nitrógeno se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Parámetros cinéticos asociados al consumo de nitrógeno

Parámetro	Valor	Unidad
$Y_{x/N}$	6,9315	$g\ g^{-1}$
m_N	0,0021	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$

3.3.2.5. Balance de Oxígeno La estimación inicial de los parámetros asociados al consumo de oxígeno se realizó mediante optimización matemática debido a la no linealidad de la Ecuación 7. Sólo se tuvo en cuenta datos de las primeras doce horas de cultivo ya que a partir de allí el oxígeno disuelto se mantiene constante por acción del sistema de control del reactor. La Tabla 21 muestra los valores iniciales calculados:

Tabla 21. Estimación preliminar de los parámetros cinéticos asociados al consumo de oxígeno

Parámetro	Valor	Unidad
C_g^*	7	mg/L
$k_L a$	0,6	h^{-1}
k_4	6,6862	$mg\ g^{-1}$
k_5	0,0584	$mg\ g^{-1}\ h^{-1}$

3.3.2.6. Optimización de los parámetros cinéticos En la Tabla 22 se puede observar que la mayoría de los parámetros obtenidos mediante optimización matemática mantienen el mismo orden de magnitud que los calculados analíticamente, por lo que se mantiene el sentido físico del valor. Se destaca además que el parámetro k_p relacionado con la producción de PHB no asociada al crecimiento, mantiene su valor positivo. Esto es una ventaja del modelo desarrollado con respecto a otros modelos reportados en literatura en donde se sacrifica el sentido físico del parámetro con el fin de aumentar el grado de ajuste del modelo⁹⁶.

Tabla 22. Parámetros cinéticos estimados para la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol

Parámetro	Estimación Inicial	Valor post Optimización	Unidad
μ_m	1,4	1,3263	h^{-1}
n	1,8	1,8233	-
K_S	1,6	1,9000	$g\ L^{-1}$
K_O	1	0,7718	$mg\ L^{-1}$
K_N	1,6	1,1805	$g\ L^{-1}$
n	2,1	2,2488	-
$Y_{p/x}$	0,1314	0,2749	$g\ g^{-1}$

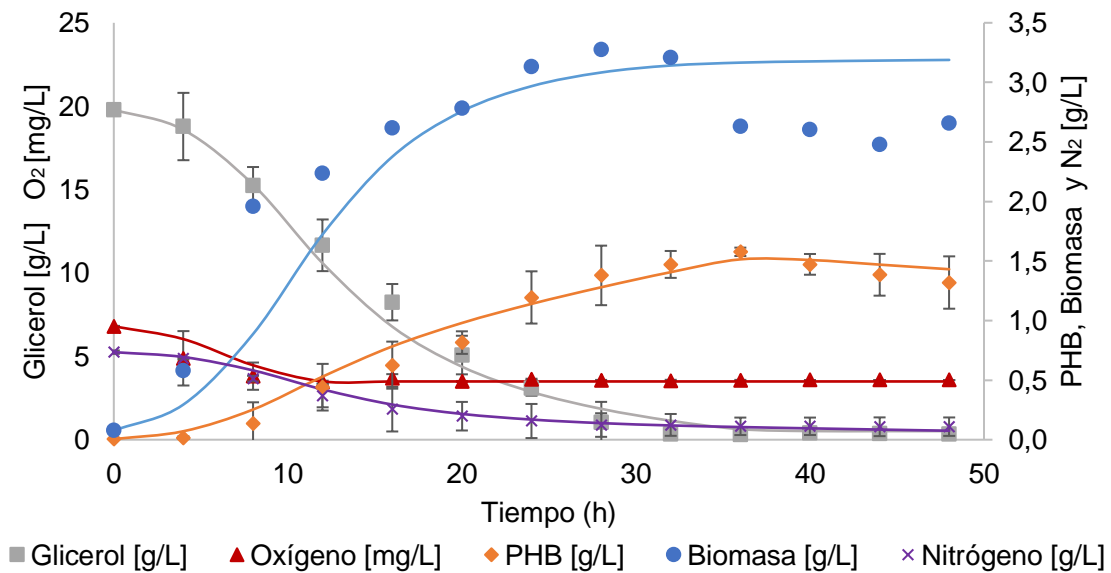
⁹⁶ FACCIN, Debora Jung Luvizetto, *et al.* Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. *En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Marzo, 2012, vol. 87, no. 3, p. 325-333.

Tabla 22. continuación

Parámetro	Estimación Inicial	Valor post Optimización	Unidad
k_p	0,0157	0,0089	$g g^{-1} h^{-1}$
k_1	0,0092	0,0215	$g g^{-1} h^{-1}$
k_2	12,0226	13,5553	$L g^{-1}$
k_3	8,434	7,2237	-
$Y_{x/s}$	0,4256	0,2154	$g g^{-1}$
$Y_{p/s}$	0,1068	0,3488	$g g^{-1}$
m_s	0,00	0,0065	$g g^{-1} h^{-1}$
$Y_{x/N}$	6,93	5,3616	$g g^{-1}$
m_N	0,002	0,0007	$g g^{-1} h^{-1}$
k_{La}	0,6	0,5807	h^{-1}
k_4	6,686	8,2965	$mg g^{-1}$
k_5	0,058	0,2777	$mg g^{-1} h^{-1}$

La Figura 26 muestra la comparación de los datos experimentales con la cinética obtenida a partir del modelo matemático.

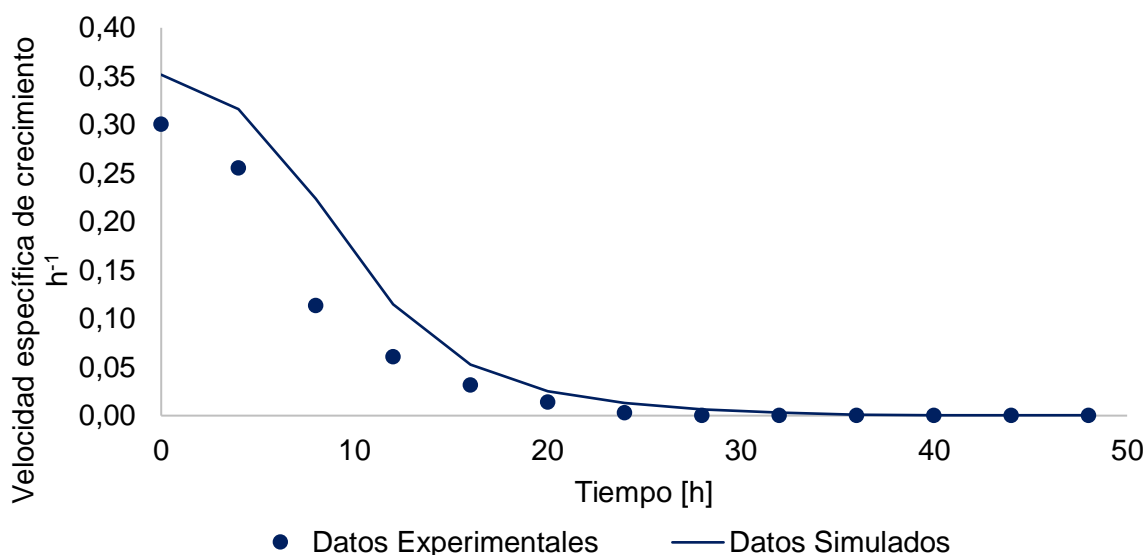
Figura 26. Comparación entre los datos experimentales y los simulados para la producción de PHB por *B. megaterium* B2 Las líneas continuas corresponden a los datos simulados y los marcadores a los datos experimentales.



Se puede apreciar la adecuada descripción de los datos experimentales por parte del modelo propuesto y de los fenómenos observados. Se logra la adecuada descripción del consumo de PHB en ausencia de fuente de carbono. No se presentan valores negativos para ninguna concentración y el aumento de la concentración de biomasa cesa una vez se agota la fuente de nitrógeno.

La Figura 27 presenta la comparación entre los datos experimentales y los simulados para la velocidad específica de crecimiento.

Figura 27. Comparación de los datos experimentales y simulados de la velocidad específica de crecimiento



La similitud entre los datos simulados y los experimentales para la velocidad específica de crecimiento confirmó el correcto planteamiento de la función descrita en la Ecuación 17.

Finalmente, la Tabla 23 presenta los coeficientes de correlación (R^2) entre los datos experimentales y los simulados para cada variable. Todos los valores fueron superiores a 0,89 mostrando el grado de ajuste alcanzado con el modelo.

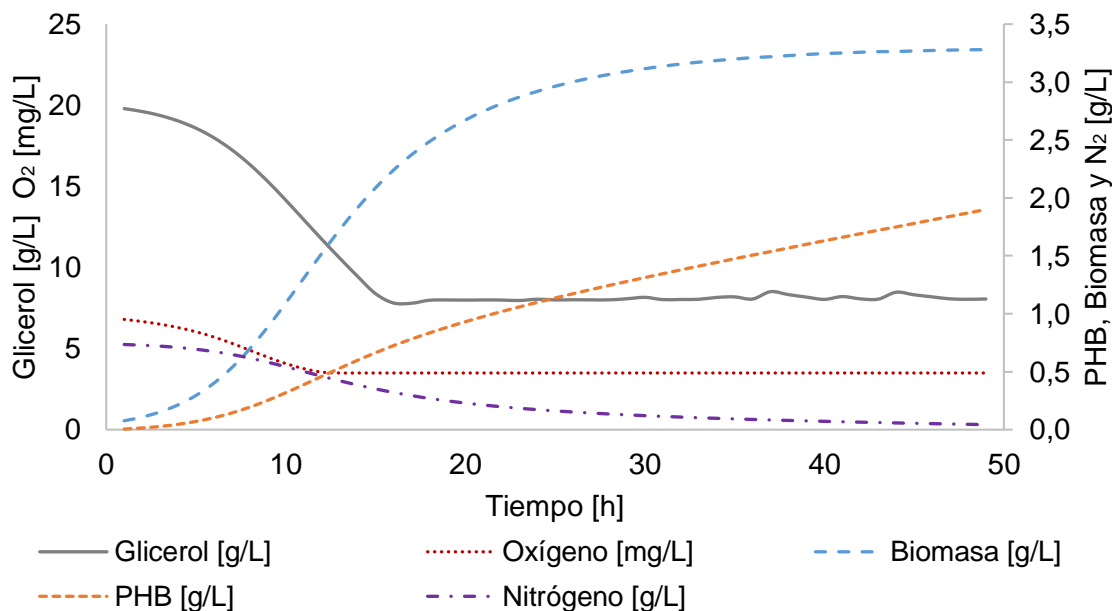
Tabla 23. Coeficiente de correlación R^2 entre los datos experimentales y los simulados para cada variable

Biomasa	PHB	Glicerol	Nitrógeno	Oxígeno	Velocidad específica de Crecimiento
0,944	0,979	0,993	0,987	0,892	0,961

3.3.3. Estrategia de cultivo Fed – Batch basada en simulación

3.3.3.1. Fed – Batch con limitación de nitrógeno La Figura 28 muestra la simulación del cultivo Fed – Batch con limitación de nitrógeno.

Figura 28. Simulación del cultivo en modo Fed-Batch con limitación de Nitrógeno

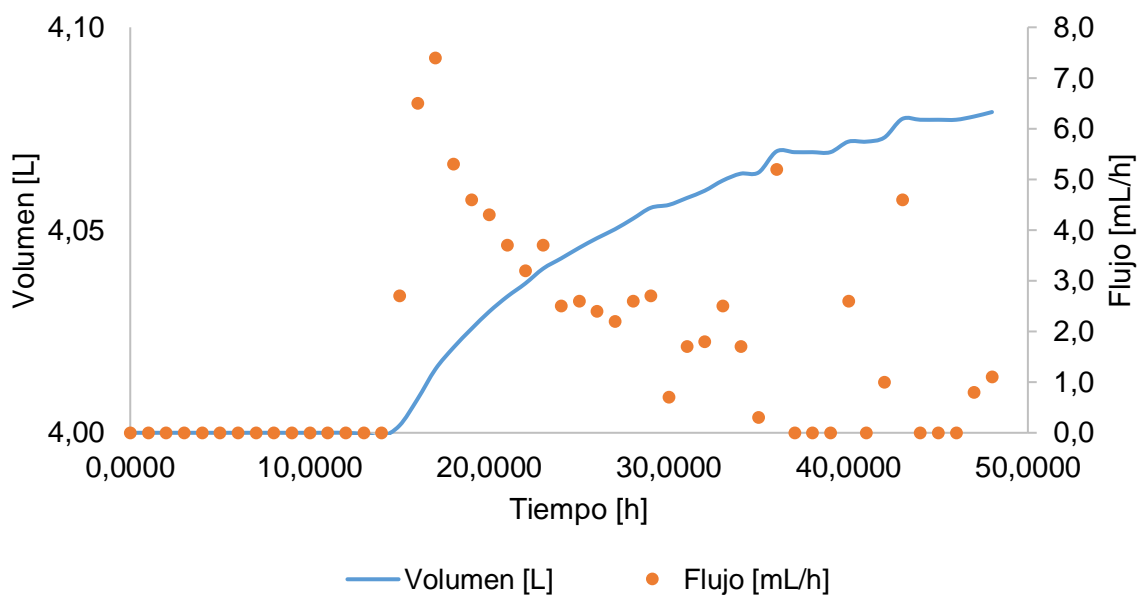


De acuerdo con la simulación, la concentración de glicerol de 8 g/L se alcanza a las 15 horas de fermentación, momento en el cual debe iniciarse el flujo de alimentación de glicerol. Se simuló el proceso manteniendo constante la concentración de glicerol en diferentes valores, siendo la máxima concentración de PHB alcanzada muy similar para todos los casos. Tanto la curva de concentración de nitrógeno como la de biomasa tienen un comportamiento casi idéntico al observado en el cultivo en modo Batch. Esto indica que una concentración constante de glicerol no influye significativamente en la velocidad de consumo de nitrógeno. Adicionalmente, la concentración máxima de biomasa alcanzada (3,28 g/L) es muy similar a la del cultivo en modo Batch (3,18 g/L), lo cual se debe a la no adición de nitrógeno.

Finalmente, la curva de PHB alcanzó su máximo de 1,57 g/L a la hora 36 en el cultivo en modo Batch. Según la simulación para el cultivo Fed-Batch con limitación de nitrógeno, se espera que la concentración de PHB sea de 1,50 g/L a la hora 36, punto a partir del cual continúa el aumento en la concentración de PHB, alcanzando 1,9 g/L a las 48 horas de cultivo. Se destaca que, al no presentarse agotamiento de la fuente de carbono, no hay consumo de polímero, lo que demuestra la correcta descripción fenomenológica por parte del modelo propuesto.

La Figura 29, muestra el volumen de cultivo y el flujo de alimentación de solución Fed-Batch para el cultivo con limitación de nitrógeno.

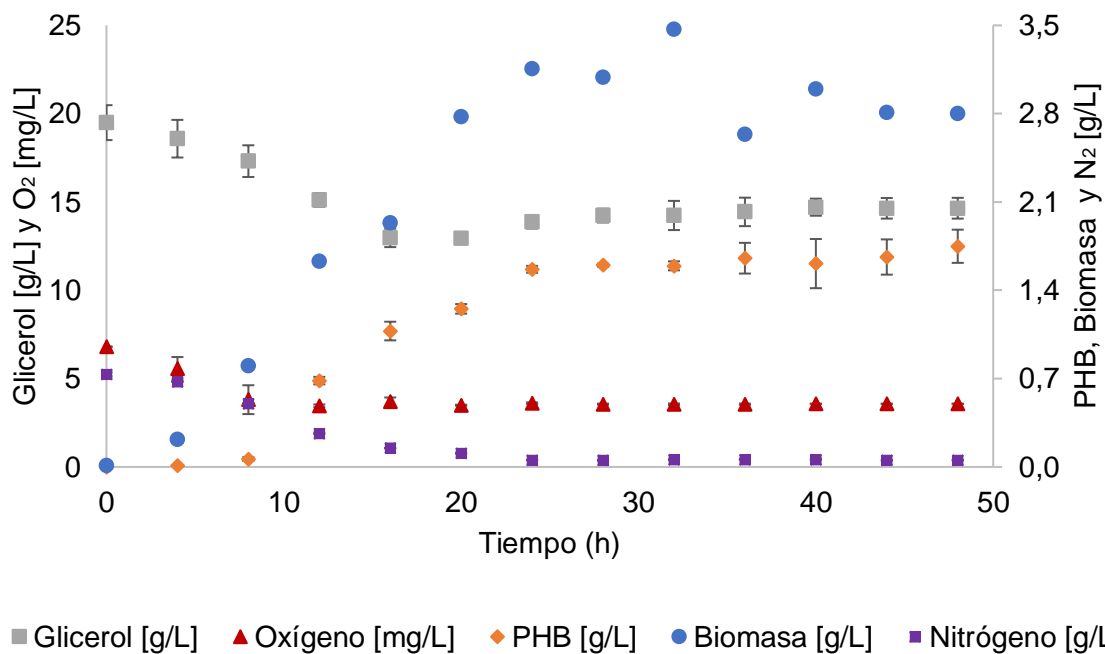
Figura 29. Volumen de cultivo y flujo de alimentación para el cultivo Fed-Batch con limitación de nitrógeno



El flujo inicia con valores de hasta 7,4 mL/h en las primeras horas de la alimentación para posteriormente descender paulatinamente. Este comportamiento indica que a medida que la fermentación avanza, la demanda de glicerol es cada vez menor, debido principalmente a la limitación de fuente de nitrógeno. El volumen final del cultivo 4,08 L, valor inferior al volumen máximo de trabajo, por lo que el régimen de alimentación es viable desde el punto de vista técnico. En total se consumirían 80 mL de solución Fed-Batch con una concentración de 500 g/L de glicerol.

La Figura 30 muestra los resultados experimentales del cultivo Fed-Batch con limitación de nitrógeno.

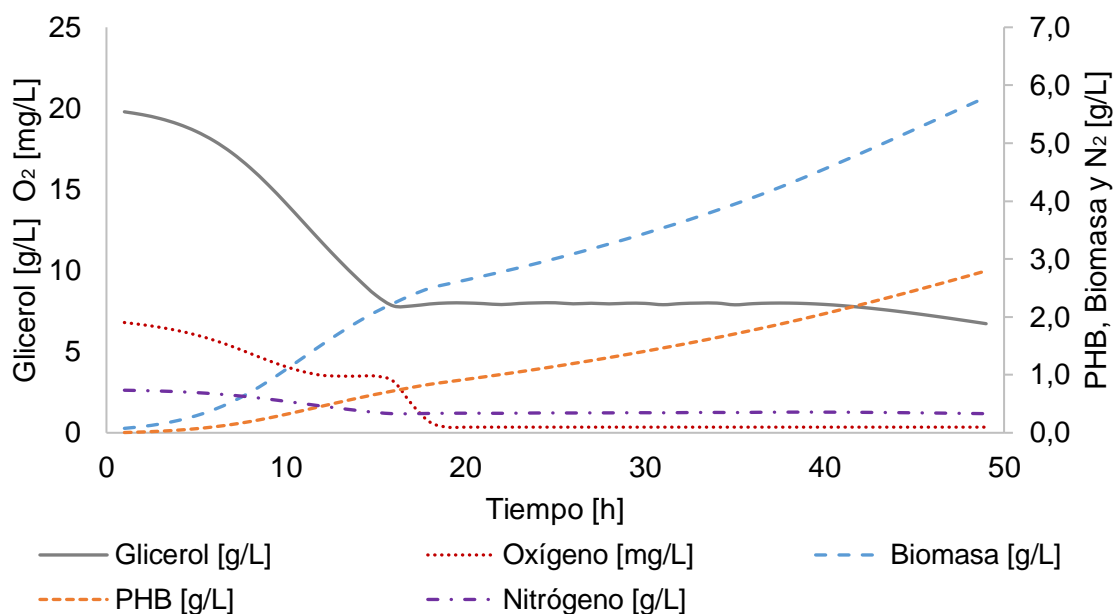
Figura 30. Datos experimentales de cultivo Fed-Batch con limitación de nitrógeno



Las cinéticas de producción de biomasa y PHB presentaron un comportamiento similar al obtenido a partir del modelo matemático. No se observó consumo de PHB y la producción de biomasa cesó debido al agotamiento de la fuente de nitrógeno. La máxima concentración de biomasa y de PHB observadas fueron de 3,46 g/L y 1,75 g/L. Por otra parte, la concentración de glicerol se estabilizó entre 13 g/L y 14,4 g/L y no en 8 g/L como se esperaba, sin embargo, esta diferencia no afectó en gran medida los valores predichos de biomasa y PHB.

3.3.3.2. Fed – Batch con limitación de oxígeno La Figura 31 muestra la simulación del cultivo en modo Fed-Batch con limitación de oxígeno.

Figura 31. Simulación del cultivo en modo Fed-Batch con limitación de Oxígeno

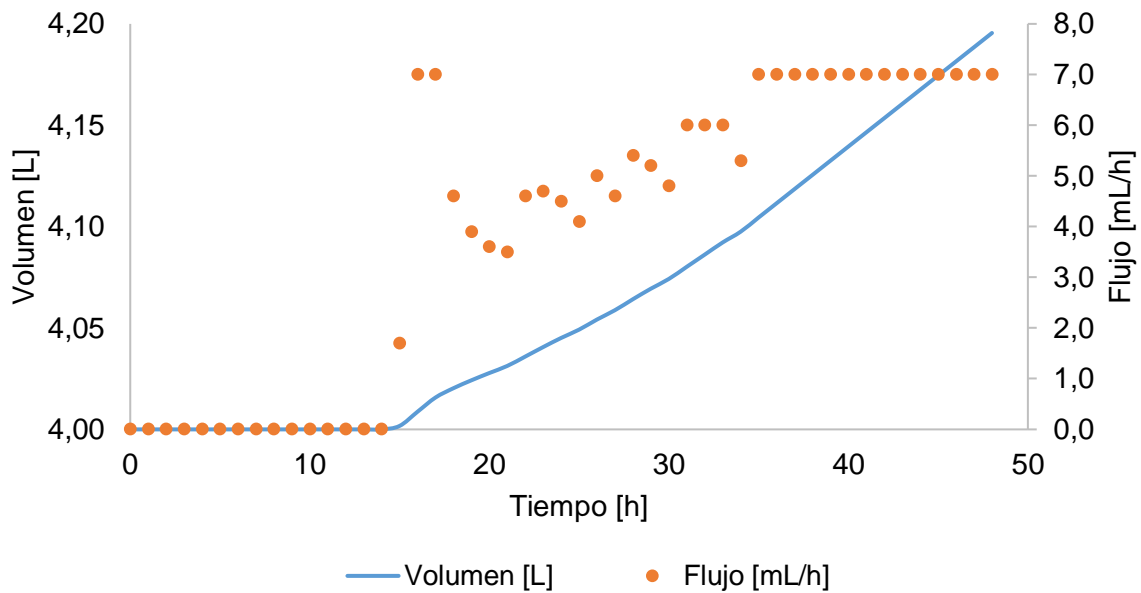


La concentración de glicerol de 8 g/L se alcanza igualmente a las 15 horas de fermentación. A partir de ese momento inicia la alimentación de solución Fed-Batch, procurando mantener constante la concentración de glicerol. Se fijó un flujo máximo de solución Fed-Batch de 7 mL/h. Se estimó la concentración de nitrógeno en la solución Fed-Batch en 17 g/L con el fin de mantener constante la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. Debido a la adición de glicerol y nitrógeno, se observó un aumento constante en la concentración de biomasa, alcanzando 5,79 g/L en la hora 48 de la fermentación.

Bajo estas condiciones, el modelo matemático predijo una concentración máxima de PHB de 2,79 g/L en la hora 48 del cultivo, lo cual representa un incremento del 46% con respecto a lo obtenido en la simulación del cultivo Fed-Batch con limitación de nitrógeno, indicando que la limitación de oxígeno es una mejor opción para la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2.

La Figura 32, muestra el volumen de cultivo y el flujo de alimentación de solución Fed-Batch para el cultivo con limitación de oxígeno.

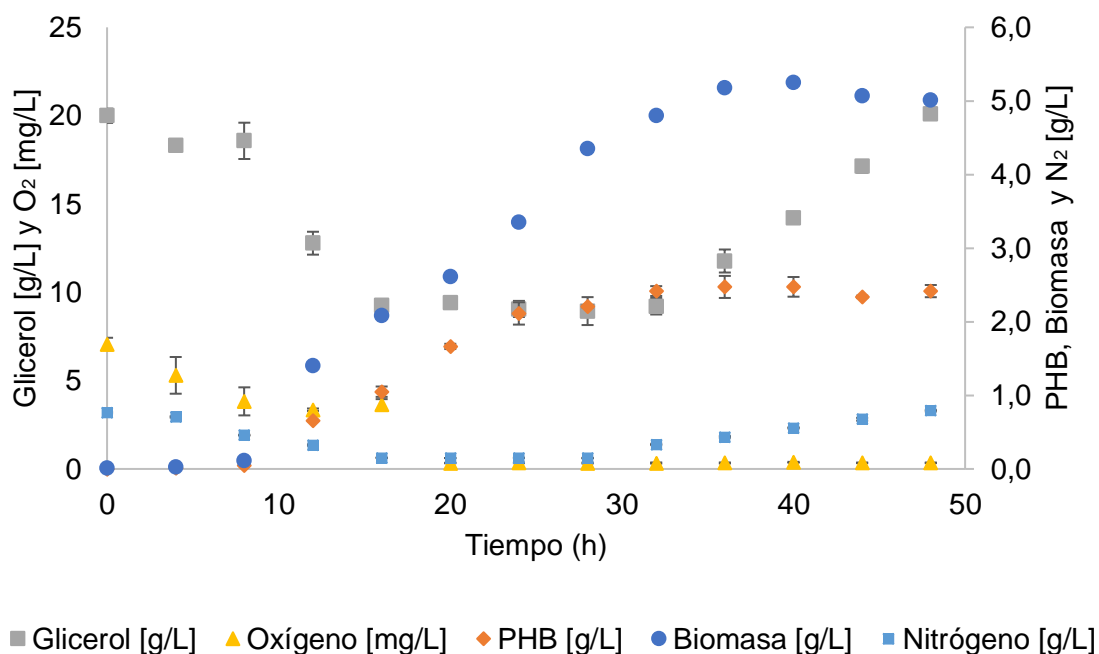
Figura 32. Volumen de cultivo y flujo de alimentación para el cultivo Fed-Batch con limitación de oxígeno



Se predijo una mayor actividad metabólica en la condición de limitación de oxígeno, por lo que la demanda de glicerol es mayor para esta condición. La Figura 32 muestra que se alcanzó un volumen final de 4,2 L, lo que representa un consumo de 200 mL de solución Fed-Batch. Así mismo, se observa que el flujo inició a las 15 horas del proceso y a partir de ahí se incrementó, hasta alcanzar el máximo de 7 mL/h a las 35 horas y se mantuvo en ese valor hasta el final de la fermentación.

La Figura 33 muestra los resultados experimentales del cultivo Fed-Batch con limitación de oxígeno.

Figura 33. Datos experimentales de cultivo Fed-Batch con limitación de oxígeno



En la Figura 33 se puede observar que la concentración de glicerol estuvo constante desde el inicio de la alimentación hasta la hora 32 del proceso, momento a partir del cual empezó a acumularse glicerol en el medio de cultivo. Un comportamiento similar se observa para el perfil de concentración de nitrógeno. El inicio del aumento de la concentración de glicerol y nitrógeno coincide con el cese de la producción de biomasa y PHB. Lo anterior indica que el proceso de producción de biomasa y PHB se vio afectado por la influencia de una variable diferente a la limitación de glicerol, oxígeno o nitrógeno. Descartando variaciones en las condiciones operacionales como pH o temperatura, las cuales permanecieron dentro del rango permitido, se contempla la posibilidad del agotamiento de un macro o micronutriente necesario para el crecimiento de *B. megaterium* B2.

Los valores máximos alcanzados de biomasa y PHB fueron 5,18 g/L y 2,47 g/L mostrando que la limitación de oxígeno es una estrategia más favorable para la producción de PHB. Este comportamiento era previsible puesto que como se concluyó en el capítulo 2, una gran parte del PHB se produce asociado al crecimiento del microorganismo. El valor alcanzado de PHB representa un aumento del 23 % con respecto a la máxima producción de PHB reportada para *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol crudo⁹⁷.

⁹⁷ MORENO YAÑEZ, Paalo Andrea. Estudio de la producción de polihidroxi-butarato (PHB) por *Bacillus sp* utilizando glicerol residuo de la industria del biodiesel como fuente de carbono. Tesis de Doctorado en Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2015, 141 p.

3.4. CONCLUSIONES

El modelo matemático propuesto incluye la influencia de 3 sustratos que bajo ciertas circunstancias pueden ser limitantes del crecimiento microbiano y la adición de un término que rige el consumo de PHB en función de la disponibilidad de fuente de carbono, características no encontradas en los modelos reportados en la literatura hasta el momento. Adicionalmente, los parámetros cinéticos estimados, mantienen su significado físico, especialmente los relacionados a la variación de la concentración de PHB en el medio de cultivo.

El modelo matemático propuesto describe adecuadamente el proceso de producción de PHB a partir de glicerol por *Bacillus megaterium* B2, alcanzando un coeficiente de ajuste promedio del modelo para todas las variables medidas en el experimento en modo Batch de R^2 0,959.

La limitación de oxígeno en cultivos tipo Fed – Batch de *Bacillus megaterium* B2 es una mejor estrategia que la limitación de nitrógeno para la producción de PHB. Esta diferencia se presentó tanto en la simulación del proceso como en los datos experimentales.

Por último, en el cultivo Fed-Batch con limitación de oxígeno, el crecimiento microbiano cesó aun cuando se tenía disponibilidad de glicerol, nitrógeno y oxígeno. Este comportamiento puede ser debido al agotamiento de otro macro o micro nutriente por lo que se recomienda una evaluación más detallada de este fenómeno.

CONCLUSIONES GENERALES

Se demostró que *Bacillus megaterium* B2 no presenta inhibición de crecimiento debido a concentraciones de glicerol crudo de 20 g/L. Adicionalmente, se evidenció inhibición del crecimiento microbiano y de la producción de PHB para altas concentraciones de elementos traza y de fosfato ácido de sodio.

Se propuso un nuevo medio de sales modificado para la producción de PHB a partir de glicerol crudo empleando *Bacillus megaterium* B2.

En cultivos Batch con control de pH, aireación y empleando el medio de sales desarrollado, la producción de PHB por *Bacillus megaterium* a partir de glicerol crudo se ve favorecida por la disponibilidad de oxígeno y nitrógeno. Así mismo, parámetros como los rendimientos $y_{p/s}$, $y_{p/x}$ y $y_{x/s}$, la productividad volumétrica y el porcentaje de acumulación también se ven favorecidos por la disponibilidad de oxígeno y nitrógeno en el medio de cultivo.

Las modificaciones realizadas al medio y las condiciones de cultivo permitieron un incremento del 33% en la producción de PHB en comparación con los valores reportados para esta cepa.

El modelo matemático desarrollado describe adecuadamente la influencia de la concentración de glicerol, nitrógeno y oxígeno sobre el crecimiento del microorganismo. Se logró un alto grado de ajuste del modelo para cultivos Batch y una adecuada predicción de cultivos Fed-Batch por lo que este modelo se constituye en una herramienta para el estudio teórico del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

BABEL, Wolfgang, ACKERMANN, Jörg-Uwe y BREUER, Uta. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Mayo, 2001, vol. 71, p. 125-157.

CASTILLO, Tania, HEINZLE, Elmar, PEIFER, Susanne, SCHNEIDER, Konstantin y PEÑA M, Carlos F. Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. En: Process Biochemistry. Julio, 2013, vol. 48, no. 7, p. 995-1003.

CHEN, Guo-Qiang. Introduction of Bacterial Plastics PHA, PLA, PBS, PE, PTT, and PPP. En: Plastics from Bacteria: Natural functions and Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, vol. 14, p. 1-16. ISBN: 978-3-642-03287-5.

CLARKE, Kim Gale. Bioprocess Engineering: An Introductory Engineering and Life Science Approach. Woodhead Publishing Limited, 2013, 266 p. ISBN: 978-1-78242-168-9.

DA SILVA, Gervásio Paulo, MACK, Matthias y CONTIERO, Jonas. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Review. En: Biotechnology Advances. Enero-febrero, 2009, vol. 27, no. 1, p. 30-39.

DE LA RUBIA, T, GONZÁLEZ-LÓPEZ, J y BALLESTEROS, F. Growth of *Bacillus megaterium* in phosphate-limited médium. En: Folia microbiológica. Febrero, 1985, vol. 31, p. 98-105.

DUTTA, Rajiv. Fundamentals of Biochemical Engineering. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2008, 292 p. ISBN: 978-3-540-77900-1.

FACCIN, Debora Jung Luvizetto, MARTINS, Ivana, MEDEIROS CARDOZO, Nilo Sergio, RECH, Rosane, ZÁCHIA AYUB, Marco Antônio, MOITINHO ALVES, Tito

Lívio, GAMBETTA, Rossano y RESENDE SECCHIC, Argimiro. Optimization of C : N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Junio, 2009, vol. 84, no. 12, p. 1756-1761.

FACCIN, Debora Jung Luvizetto, PACHECO CORRÊA, Mariana, RECH, Rosane, ZÁCHIA AYUB, Marco Antônio, RESENDE SECCHIC, Argimiro y MEDEIROS CARDOZO, Nilo Sergio. Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Marzo, 2012, vol. 87, no. 3, p. 325-333.

FACCIN, Debora Jung Luvizetto, RECH, Rosane, RESENDE SECCHIC, Argimiro, MEDEIROS CARDOZO, Nilo Sergio y ZÁCHIA AYUB, Marco Antônio. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Marzo, 2013, vol. 48, no. 3, p. 420-425.

Federación Nacional de Biocombustibles. Producción y Venta de Biodiesel [en línea]. Disponible en internet: <http://www.fedebiocombustibles.com/estadistica-produccion-titulo-Biodiesel.htm>

FOGLER, H. Scott. Elements of Chemical Reaction Engineering: Pearson New International Edition. 4 ed. Pearson, 2013, 880 p. ISBN: 9781292026169.

GADD, Geoffrey y GRIFFITHS, Alan. Microorganisms and Heavy Metal Toxicity. En: Microbial Ecology. Diciembre, 1997, vol. 4, no. 4, p. 303–317.

GAHLAWAT, Geeta y SRIVASTAVA, Ashok K. Estimation of Fundamental Kinetic Parameters of Polyhydroxybutyrate Fermentation Process of *Azohydromonas australica* Using Statistical Approach of Media Optimization. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Noviembre, 2012, vol. 168, no. 5, p. 1051-1064.

GAHLAWAT, Geeta y SRIVASTAVA, Ashok K. Development of a mathematical model for the growth associated Polyhydroxybutyrate fermentation by

Azohydromonas australica and its use for the design of fed-batch cultivation strategies. En: Bioresource Technology. Junio, 2013, vol. 137, p. 98-105.

GAHLAWAT, Geeta y SRIVASTAVA, Ashok K. Model-Based Nutrient Feeding Strategies for the Increased Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Octubre, 2017, vol. 183, no. 2, p. 530-542.

GANGURDE, N. S. y SAYYED, R. Z. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB): A Biodegradable Polymer of Microbial Origin. En: THOMAS, Sabu, NINAN, Neethu, MOHAN, Sneha y FRANCIS, Elizabeth. Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends, and IPNs. Apple Academic Press, 2012, vol. 2, 370 p. ISBN: 9781926895161.

GARCIA-OCHOA, Felix y GOMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. Review. En: Biotechnology Advances. Marzo-Abril, 2009, vol. 27, no. 2, p. 153-176.

KANJANACHUMPOL, Pawut, KULPREECHA, Songsri, TOLIENG, Vasana y THONGCHUL, Nuttha. Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. En: Bioprocess and Biosystems Engineering. Octubre, 2013, vol. 36, no. 10, p. 1463-1474.

KHAN, Imran, IQBALA, Muhammad, YASIN ASHRAF, Muhammad, ARSLAN ASHRAFA, Muhammad y ALI, Shafaqat. Organic chelants-mediated enhanced lead (Pb) uptake and accumulation is associated with higher activity of enzymatic antioxidants in spinach (*Spinacea oleracea L.*). En: Journal of Hazardous Materials. Noviembre, 2016, vol. 317, p. 352-361.

KHANNA, Shilpi, SRIVASTAVA, Ashok K. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. En: Process Biochemistry. Mayo, 2005, vol. 40, no. 6, p. 2173-2182.

KHANNA, Shilpi, SRIVASTAVA, A.K. Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. En: Biochemical Engineering Journal. Enero, 2006, vol. 27, no. 3, p. 197-203.

KULPREECHA, Songsri, BOONRUANGTHAVORN, Atipol, MEKSIRIPORN, Boonyarit y THONGCHUL, Nuttha. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Marzo, 2009, vol. 107, no. 3, p. 240-245.

LÓPEZ, Jimmy A., NARANJO, Javier M., HIGUITA, Juan C., CUBITTO, Maria A., CARDONA, Carlos A. y VILLAR, Marcelo A. Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. En: Biotechnology and Bioprocess Engineering. Abril, 2012, vol. 17, no. 2, p. 250-258.

LUEDKING, Robert y PIRET, Edgar L. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation Batch Process at Controlled pH. En: Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering. Diciembre, 1959, vol. 1, no. 4, p. 393-412.

MADIGAN, Michael T., MARTINKO, John M. y PARKER, Jack. Biología de los microorganismos. 10 ed. Pearson Education, 2003, 1096 p. ISBN: 9788420536798.

MACAULEY-PATRICK, Sue y FINN, Beverley. Modes of Fermenter Operation. En: MCNEIL, Brian y HARVEY, Linda M. Practical Fermentation Technology. Wiley, 2008, 402 p. ISBN: 978-0-470-01434-9.

MAHMOUDI, M., SHARIFZADEH BAEI, M., NAJAFPOUR, G. D., TABANDEH, F. y EISAZADEH, H. Kinetic model for polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Hydrogenophaga pseudoflava* and verification of growth conditions. En: African Journal of Biotechnology. Mayo, 2010, vol. 9, no. 21, p. 3151-3157.

MAVITUNA, Ferda y SINCLAIR, Charles G. Modelling the Kinetics of Biological Activity in Fermentation Systems. En: MCNEIL, Brian y HARVEY, Linda M. Practical Fermentation Technology. Wiley, 2008, 402 p. ISBN: 978-0-470-01434-9.

MOKHTARI-HOSSEINI, Zahra B., VASHEGHANI-FARAHANI, Ebrahim, HEIDARZADEH-VAZIFEKHORAN, Ali, SHOJAOSADATI, S. Abbas, KARIMZADEH, Ramin, KHOSRAVI DARANI, Kianoush. Statistical media optimization for growth and PHB production from metanol by a methylotrophic bacterium. En: Bioresource Technology. Abril, 2009, vol. 100, no. 8, p. 2436-2443.

MONTEIRO, Marcos Roberto, PEPE AMBROZIN, Alessandra Regina, MORAIS LIÃO, Luciano y FERREIRA, Antonio Gilberto. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. Review. En: Talanta. Diciembre, 2008, vol. 77, no. 2, p. 593-605.

MORALEJO-GÁRATE, Helena, KLEEREBEZEM Robbert, MOSQUERA-CORRAL, Anuska y VAN LOOSDRECHT, Mark C.M. Impact of oxygen limitation on glycerol-based biopolymer production by bacterial enrichments. En: Water Research. Marzo, 2013, vol. 47, no. 3, p. 1209-1217.

MORENO YAÑEZ, Paalo Andrea. Estudio de la producción de polihidroxibutirato (PHB) por *Bacillus* sp utilizando glicerol residuo de la industria del biodiesel como fuente de carbono. Tesis de Doctorado en Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2015, 141 p.

MORENO, Paalo, YAÑEZ, Camilo, MEDEIROS CARDOZO, Nilo Sergio, ESCALANTE, Humberto, COMBARIZA, Marianny Y. y GUZMAN, Carolina. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology. Diciembre, 2015, vol. 32, no. 6, p. 682-689.

MOZUMDER, Md. Salatul Islam, GOORMACHTIGH, Laurens, GARCIA-GONZALEZ, Linsey, DE WEVER, Heleen y VOLCKE, Eveline I.P. Modeling pure

culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB). En: Bioresource Technology. Marzo, 2014, vol. 155, p. 272-280.

NARANJO, Javier M., POSADA, John A., HIGUITA, Juan C. y CARDONA, Carlos A. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. En: Bioresource Technology. Abril, 2013, vol. 133, p. 38-44.

NIKEL, Pablo I., PETTINARI, M. Julia, GALVAGNO, Miguel A. y MÉNDEZ, Beatriz S. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glicerol by a recombinant *Escherichia coli arcA* mutant in fed-batch microaerobic cultures. En: Applied Microbiology and Biotechnology. Enero, 2008, vol. 77, no. 6, p. 1337-1343.

OMAR, S., RAYES, A., EQAAB, A., VOß, I. y STEINBÜCHEL, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. En: Biotechnology Letters. Julio, 2001, vol. 23, no. 14, p. 1119-1123.

PANDIAN, Sureshbabu RamKumar, DEEPAK, Venkatraman, KALISHWARALAL, Kalimuthu, RAMESHKUMAR, Neelamegam, JEYARAJ, Muniyandi y GURUNATHAN, Sangiliyandi. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. En: Bioresource Technology. Enero, 2010, vol. 101, no. 2, p. 705-711.

PATNAIK, Pratap R. Response coefficient analysis of a fed-batch bioreactor to dissolved oxygen perturbation in complementary cultures during PHB production. En: Journal of Biological Engineering. Marzo, 2008, vol. 2, no. 4.

PATWARDHAN, Pallavi y SRIVASTAVA, Ashok K. Fed-batch cultivation of *Wautersia eutropha*. En: Bioresource Technology. Abril, 2008, vol. 99, no. 6, p. 1787-1792.

PENLOGLOU, Giannis, CHATZIDOUKAS, Christos y KIPARISSIDES, Costas. Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: An

integrated modelling approach and experimental validation. En: Biotechnology Advances. Enero-febrero, 2012, vol. 30, no. 1, p. 329-337.

PIROUZ, F., ARDJMAN, M. y SHARIFZADEH BAEI, M. Kinetics Evaluation of Cell Growth and PHB Production by *Azotobacter beijerinckii* DSMZ 1041. En: World Applied Sciences Journal. Enero, 2011, vol. 14, no. 3, p. 392-397.

PlasticEurope. Plastics-The Facts 2016: An analysis of European plastics production, demand and waste data. Alemania, Plastics shape the future, 2016.

PORRAS, Mauricio A., VITALE, Cristian, VILLAR, Marcelo A. y CUBITTO, María A. Bioconversion of glycerol to poly(HB-co-HV) copolymer in an inexpensive medium by a *Bacillus megaterium* strain isolated from marine sediments. En: Journal of Environmental Chemical Engineering. Febrero, 2017, vol. 5, no. 46, p 1-9.

POSADA, John A., NARANJO, Javier M., LÓPEZ, Jimmy A., HIGUITA, Juan C. y CARDONA, Carlos A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. En: Process Biochemistry. Enero, 2011, vol. 46, no. 1, p. 310-317.

RAJE, Poonam, SRIVASTAVA, Ashok K. Updated mathematical model and fed-batch strategies for poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*. En: Bioresource Technology. Junio, 1998, vol. 64, no. 3, p. 185-192.

RATKOWSKY, D. A., LOWRY, R. K, McMEEKIN, T. A., STOKES, A. N. y CHANDLER, R. E. Model for Bacterial Culture Growth Rate Throughout the Entire Biokinetic Temperature Range. En: Journal of Bacteriology. Junio, 1983, vol. 154, no. 3, p. 1222-1226.

RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A., KOLLER, M., MIRANDA-DE SOUSA DIAS, M., CALAFELL-MONFORT, M., BRAUNEGG, G. y MARQUÉS-CALVO, M.S. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian

strain. En: Journal of Applied Microbiology. Mayo, 2013, vol. 114, no. 5, p. 1378-1387.

RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A., KOLLER, M., BRAUNEGG, G. y MARQUÉS-CALVO, M.S. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology. Enero, 2016, vol. 33, no. 1, p. 73-77.

SABRA, W. y ABOU-SEID, D.M. Improving Feeding Strategies for Maximizing Polyhydroxybutyrate Yield by *Bacillus megaterium*. En: Research Journal of Microbiology. Mayo, 2008, vol. 3, no. 5, p. 308-318.

SAMUL, Dorota, LEJA, Katarzyna y GRAJEK, Włodzimierz. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. En: Annals of Microbiology. Septiembre, 2014, vol. 64, no. 3, p. 891-898.

SCHLEIFER, Karl-Heinz. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. 2 ed. Springer Science & Business Media, 2011, 1450 p. ISBN: 9780387684895.

SHAHID, Salma, MOSRATI, Ridha, LEDAUPHIN, Jérôme, AMIEL, Caroline, FONTAINE, Paul, GAILLARD, Jean-Luc y CORROLER, David. Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Septiembre, 2013, vol. 116, no. 3, p. 302-308.

SHULER, Michael y KARGI, Fikret. Bioprocess Engineering Basic Concepts. 2 ed. Prentice Hall, 2002, 553 p. ISBN: 0-13-081908-5

SINDHU, Raveendran, AMMU, Balakrishnan, BINOD, Parameswaran, DEEPTHI, Sreelatha K., RAMACHANDRAN, K. B., SOCCOL, Carlos Ricardo y PANDEY, Ashok. Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Crude

Glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and Improving Its Thermal Properties by Blending with Other Polymers. En: Brazilian Archives of Biology and Technology. Julio-agosto, 2011, vol. 54, no. 4, p. 783-794.

SOMASHEKARA, Divyashree. M., RASTOGI, Navin K., RAMACHANDRIAH, Shamala T. A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. En: New Biotechnology. Octubre, 2009, vol. 26, no. 1-2, p. 92-98.

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, Daria. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. En: Electronic Journal of Biotechnology. Marzo, 2015, vol. 18, no. 2, p. 128-133.

WANG, J, FANG, F, YU, HQ. Substrate consumption and biomass growth of *Ralstonia eutropha* at various S₀/X₀ levels in batch cultures. En: Bioresource Technology. Septiembre, 2007, vol. 98, no. 13, p. 2599-2604.

XIE, Cheng-Hui y Yokota, Akira. Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. En: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Noviembre, 2005, vol. 55, no. 6, p. 2419-2425.

YAÑEZ-DIAZ, Camilo José. Extracción y caracterización de polihidroxitirato producido a partir de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 utilizando glicerol residuo de la industria de biodiesel como fuente de carbono. Trabajo de grado Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2013, 63 p.

ZHANG, Youhong, SUN, Wandong, WANG, Hengwei y GENG, Anli. Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. En: Bioresource Technology. Noviembre, 2013, vol. 147, p. 307-314.