

Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la bioproducción de polihidroxibutirato a partir de glicerol crudo bajo condiciones de exceso y limitación de oxígeno

Alexander Berbeo López, Fabian Camilo Morales Molano

Trabajo de grado para optar por el título de ingeniero químico

Director

Humberto Escalante Hernández

Ingeniero Químico, PhD.

Codirector(es)

Mabel Juliana Quintero Silva

Bacterióloga, M. Sc.

Víctor Alexis Lizcano González

Ingeniero Químico

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingeniería Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2018

Dedicatoria

A Dios por darme la sabiduría e iluminarme el camino que permitió culminar mi etapa como estudiante de ingeniería química.

A mi madre Maria Nelly López, quien con su amor incondicional pudo inculcarme todos los valores y principios de los que ahora me siento orgulloso.

A mi padre Alejandro Berbeo, quien pudo brindarme todo lo necesario sin falta alguna y siempre creyendo en mí.

A mis hermanos Orlando y Alirio, quienes siempre me apoyaron y me aconsejaron en toda mi vida para ser una excelente persona

A mis cuñadas Sonia y Maritza, quienes me brindaron su ayuda en todo momento que lo necesitaba.

A mi sobrino Santiago, para que en un futuro también sea un excelente profesional.

A todos mis amigos(as) y compañeros(as) quienes han llenado mi vida de momentos felices.

A los del grupo UNO por hacerme reír con tantos memes y por compartir momentos divertidos jugando uno y en las recochas de fútbol.

Alexander Berbeo López

Dedicatoria

A mis padres Ferney y Elvia quienes me apoyaron en la elección de formarme como Ingeniero Químico en la Universidad Industrial de Santander, confiaron en mí y me brindaron su apoyo incondicional.

Fabian Camilo Morales Molano

Agradecimientos

Al Ingeniero Químico PhD. Humberto Escalante Hernández, por haber confiado en nosotros y haber sido el apoyo principal.

A la Bacterióloga M. Sc. Mabel Quintero, por su enseñanza y apoyo incondicional.

Al futuro Magister en Ingeniería Química Víctor Lizcano, por sus conocimientos, paciencia, colaboración y tutoría permanente. Infinitas gracias.

A la Magister e Ingeniera Química Karen Núñez, por sus ánimos y conocimientos aportados.

A la Universidad Industrial de Santander, por ser el alma mater.

A todos los profesores de la escuela por formarnos como Ingenieros Químicos.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	16
1. Objetivos	23
1.1. General	23
1.2. Específicos	23
2. Metodología	23
2.1. Medio de cultivo y cepa previamente adaptada	24
2.2. Fuente de carbono	25
2.3. Microorganismo	26
2.4. Primera Etapa	26
2.4.1. Curvas de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> B2 en condiciones de limitación y exceso de nitrógeno.	26
2.5. Segunda Etapa	27
2.5.1. Efecto de la limitación y exceso de la fuente de nitrógeno sobre la producción de PHB en <i>Bacillus megaterium</i> B2	27
2.6. Tercera Etapa	28
2.6.1. Efecto combinado de la relación C/N y disponibilidad de oxígeno en la producción de PHB por <i>Bacillus megaterium</i> B2	28
2.7. Métodos Analíticos	28

2.7.1. PHB.....	28
2.7.2. Biomasa.....	29
2.7.3. Glicerol	29
2.7.4. Nitrógeno..	29
3. Resultados y análisis	29
3.1. Curvas de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> B2 en el medio de cultivo bajo limitación y exceso de nitrógeno.....	29
3.2. Cinéticas de producción de PHB por <i>Bacillus megaterium</i> B2 en condiciones de exceso y limitación de nitrógeno	31
3.3. Efecto de la relación C/N en la producción de PHB por <i>Bacillus megaterium</i> B2 en sistemas con y sin aireación	35
4. Conclusiones	39
5. Recomendaciones	40
Referencias Bibliográficas	41
Apéndices.....	46

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Estudios de la producción de PHB por bacterias utilizando diferentes fuentes de carbono y sistemas de cultivo.....	17
Tabla 2. Medio de cultivo.	25
Tabla 3. Concentración de sulfato de amonio para cada relación C/N en el medio de cultivo.	25
Tabla 4. Caracterización del GRIB.....	26

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Ciclo de la síntesis y degradación de PHB.....	22
Figura 2. Metodología desarrollada.....	24
Figura 3. Curvas de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> B2 en el medio de cultivo para las relaciones C/N 9.4 y 36.9.....	30
Figura 4. Concentraciones de PHB, Biomasa, Glicerol y Nitrógeno obtenidas para la relación C/N 9.4.....	32
Figura 5. Concentraciones de PHB, Biomasa, Glicerol y Nitrógeno obtenidas para la relación C/N 36.9.....	32
Figura 6. Concentración de PHB, biomasa, consumo de glicerol y nitrógeno con aireación para todas las relaciones C/N.....	35
Figura 7. Concentración de PHB, biomasa, consumo de glicerol y nitrógeno sin aireación para todas las relaciones C/N.....	36
Figura 8. pH para las diferentes relaciones C/N en los sistemas con y sin aireación al final de la fermentación.....	38

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Composición química de los elementos traza usados en el medio de cultivo.	46
Apéndice B. Datos experimentales y desviaciones estándar para las curvas de crecimiento en las relaciones C/N 9.4 y 36.9, exceso y limitación de nitrógeno respectivamente.	47
Apéndice C. Datos experimentales y desviaciones estándar para las cinéticas de producción en las relaciones C/N 9.4 y 36.9, exceso y limitación de nitrógeno respectivamente.	49
Apéndice D. Datos experimentales y desviaciones estándar para los sistemas con y sin aireación en las relaciones C/N 9.4, 16.2, 23.1, 30.0, y 36.9.	53

Nomenclatura

PHB: Polihidroxibutirato

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

C/N: Carbono - nitrógeno

GRIB: Glicerol residuo de la industria del Biodiesel

CEIAM: Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales

Resumen

Título: Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la bioproducción de polihidroxibutirato a partir de glicerol crudo bajo condiciones de exceso y limitación de oxígeno. *

Autores: Alexander Berbeo López**, Fabian Camilo Morales Molano. **

Palabras clave: POLIHIDROXIBUTIRATO, RELACIÓN CARBONO NITRÓGENO, OXÍGENO, GLICEROL CRUDO, *Bacillus megaterium* B2.

Descripción:

El plástico es un elemento indispensable en la vida cotidiana, sin embargo, su excesivo uso ha generado un problema ambiental a causa de su difícil degradación. En la actualidad, se ha impulsado el uso de plásticos de origen biológico como el polihidroxibutirato (PHB); polímero biodegradable y biocompatible con propiedades térmicas y características similares a los plásticos convencionales. El PHB es producido por diferentes microorganismos, entre ellos el *Bacillus megaterium* B2. Se ha utilizado glicerol residual de la industria del biodiesel (GRIB), como fuente de carbono. En este estudio, se busca conocer el efecto que tienen la relación carbono - nitrógeno (C/N) y la disponibilidad de oxígeno en *B. megaterium* B2 sobre la producción de PHB en matraces de 500 ml sin control de pH. Se verificó un crecimiento celular para la cepa adaptada a concentraciones de hasta 20 g/l de glicerol. Se observó menor velocidad de crecimiento a mayor valor de C/N. El efecto de la relación C/N no fue significativa en la producción de PHB en condiciones de limitación de oxígeno mientras que el exceso de este favoreció la producción de biomasa. Se estableció que, para diferentes condiciones, en la hora 30 se encuentra la mayor concentración de PHB. La mayor concentración se da con una relación C/N de 30 en limitación de oxígeno obteniendo un valor de 0.35 g/l y un rendimiento $Y_{p/s}$ de 10.75%.

*Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Humberto Escalante Hernández, Ingeniero Químico PhD. Codirectores: Mabel Juliana Quintero Silva, Bacterióloga, M. Sc., Víctor Alexis Lizcano González, Ingeniero Químico.

Abstract

Title: Effect of carbon/nitrogen ratio on bioproduction of polyhydroxybutyrate from crude glycerol under oxygen excess and limitation conditions.*

Authors: Alexander Berbeo López**, Fabian Camilo Morales Molano.**

Keywords: POLYHIDROXIBUTIRATE, NITROGEN CARBON RATIO, OXYGEN, CRUDE GLYCEROL, *Bacillus megaterium* B2.

Description:

The plastic is an indispensable element in everyday life; however, its excessive use has generated an environmental problem because of its difficult degradation. At present, the use of plastics of biological origin such as polyhydroxybutyrate (PHB) has been promoted; biodegradable and biocompatible polymer with thermal properties and characteristics similar to conventional plastics. PHB is produced by different microorganisms, including *Bacillus megaterium* B2. Residual glycerol from the biodiesel industry (GRIB) has been used as a carbon source. In this study, we seek to know the effect of the carbon - nitrogen (C/N) ratio and the oxygen availability in *B. megaterium* B2 on the production of PHB in 500 ml flasks without pH control. Cell growth was verified for the strain adapted to concentrations of up to 20 g/l of glycerol. Lower growth rate was observed at higher C/N value. The effect of the C/N ratio was not significant in the production of PHB under conditions of oxygen limitation while the excess of this favored the production of biomass. It was established that for different conditions, at the 30th hour, the highest concentration of PHB is found. The highest concentration is given with a C/N ratio of 30 in oxygen limitation obtaining a value of 0.35 g/l and a yield $Y_{p/s}$ of 10.75%.

*Bachelor Thesis

** Faculty of Engineering Physicochemical. School of Chemical Engineering. Director: Humberto Escalante Hernández, Chemical Engineer PhD. Codirectors: Mabel Juliana Quintero Silva, Bacteriologist, M. Sc., Víctor Alexis Lizcano González, Chemical Engineer.

Introducción

Los plásticos sintéticos son productos derivados del petróleo los cuales se destacan por ser ligeros, fuertes, flexibles, relativamente inertes, etc. Actualmente la producción anual de plásticos sintéticos es aproximadamente de 300 millones de toneladas a nivel mundial (Zalasiewicz *et al.*, 2016). Los plásticos sintéticos generan un problema ambiental de acumulación de residuos puesto que no se degradan fácilmente y no se tiene un adecuado tratamiento después de su uso (Téllez Maldonado, 2012). Las alternativas para su tratamiento pueden ser el reciclaje, incineración o foto degradación; sin embargo, éstas presentan desventajas como subproductos tóxicos y alta complejidad en sus procesos (González Garcia, Meza Contreras, González Reynoso, y Córdoba López, 2013).

Debido a los problemas ambientales ocasionados por la acumulación de plásticos sintéticos, en los últimos años se ha planteado la opción de uso de bioplásticos (Albuquerque y Malafaia, 2018). Los bioplásticos son polímeros degradables en un corto periodo de tiempo por microorganismos. Entre los bioplásticos más estudiados se destaca el polihidroxitirato (PHB) ya que posee propiedades térmicas y características físicas similares a los plásticos convencionales, es biocompatible y puede ser obtenido de fuentes renovables (Chen, Chou, Tsai, y Wu, 2013; Mousavioun, George, y Doherty, 2012). Entre sus aplicaciones el PHB se utiliza para el envasado de alimentos de baja calidad, en la ingeniería de tejidos y en otras aplicaciones médicas relacionadas (Yeo, Muiruri, Thitsartarn, Li, y He, 2017).

El PHB es un poliéster alifático lineal (Rizzarelli y Carroccio, 2014; Rodríguez Contreras, Calafell Monfort, y Marqués Calvo, 2012) que puede ser sintetizado de tres formas distintas: mediante la polimerización por apertura de anillos (Vroman y Tighzert, 2009), por medio del uso

de plantas que sintetizen de forma natural el PHB o sean modificadas genéticamente para dicho propósito (Mousavioun *et al.*, 2012) y por último, siendo el caso más estudiado, sintetización de PHB por medio de fermentación bacteriana (Ghanbarzadeh y Almasi, 2013; Lenz y Marchessault, 2005);. En la fermentación, el PHB es sintetizado y acumulado dentro del microorganismo en forma de gránulos. La función del PHB dentro de la célula es actuar como reserva de alimento y energía en el caso de escasez de nutrientes (Pagliano, Ventorino, Panico, y Pepe, 2017).

En la literatura se reporta que tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas son capaces de producir PHB. Entre las especies de bacterias más estudiadas que sintetizan PHB están: *Ralstonia eutropha* (Zhang, Liu, Weng, Ding, y Liu, 2015), *Escherichia coli* (Chen *et al.*, 2013), *Bacillus megaterium* (Sudesh, Abe, y Doi, 2000) entre otras (ver Tabla 1).

Tabla 1.

Estudios de la producción de PHB por bacterias utilizando diferentes fuentes de carbono y sistemas de cultivo.

Bacteria	Fuente de carbono	Variables principales	Sistema de cultivo	% de acumulación	Autor
<i>C. necator</i>	Glicerol crudo e hidrolizado de harina de colza	C/N y tiempo de fermentación	Fed-batch	55 - 60	(García <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pseudomonas putída</i>	Mezcla de glicerol y octanoato o ácidos grasos	C/N	Matraz	10 - 57	(Fontaine, Mosrati, y Corroler, 2017)

	Glicerol de grado reactivo, glicerol residual, aceite de palma, aceite de jatropa, aceite de castor, residuo de aceite para fritar y suero.	C/N, pH y temperatura	Matraz	45.0 - 86.7	(Gómez Cardozo, Mora Martínez, Yepes Pérez, y Correa Londoño, 2016)
<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus sp.</i> y <i>Lactococcus lactis</i>					
	Glicerol crudo y ácido propanóico o ácido hexanóico	C/N	Matraz	49 - 63.6	(Kakazu, De Paula, Gomez, y Contiero, 2017)
<i>Pandoraea sp.</i>					
<i>Halomonas</i> TDO1 y sus derivados	Glucosa, sucrosa, maltosa, fructosa y glicerol.	C/N	Matraz	69 - 82	(Tan, Wu, Chen, y Chen, 2014)

Nota: Adaptado de Albuquerque, P. B. S., & Malafaia, C. B. (2018). Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 615–625. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.09.026>

La Tabla 1 muestra diferentes sustratos utilizados tanto residuos como puros. Los sustratos puros más distinguidos son la glucosa, la fructosa, el glicerol y el aceite de palma. Entre los residuos se destacan el glicerol crudo, el aceite residuo de frituras y aguas residuales, constatando que es posible trabajar con residuos provenientes de diferentes industrias. Las bacterias que trabajan con dichos residuos son *C. necator*, *Bacillus megaterium*, *Lactococcus*

lactis, y *Pandoraea sp.* El porcentaje más alto de acumulación de PHB se da en *Bacillus megaterium* con un sistema de cultivo por matraz usando glicerol de grado de reactivo, alcanzando un valor de 89.69% (Gómez Cardozo *et al.*, 2016). Todos los estudios mostrados en la Tabla 1, tienen en común la variable C/N corroborando que dicha relación es la variable más estudiada en la bioproducción de PHB en diferentes sustratos.

Las bacterias productoras de PHB también pueden ser clasificadas en dos grupos: En un grupo están las bacterias que acumulan el PHB únicamente en la fase estacionaria de crecimiento cuando se limita un nutriente esencial como N, P, Mg, K, O, S, mientras que en el otro grupo están las bacterias que acumulan la mayor parte del PHB durante el crecimiento de las mismas (Kessler, Weusthuis, Witholt, y Eggink, 2001; Lee, 1996).

Durante la producción microbiológica de PHB el sustrato que usa la bacteria como fuente de carbono es destinado para crecimiento celular, mantenimiento de la misma y para la producción de PHB (Moreno Yañez, 2015). Sin embargo, los sustratos son costosos y puede representar hasta el 40% del costo total de producción (Choi y Lee, 1999). Una estrategia para reducir los costos de producción es utilizar residuos agroindustriales como fuente de carbono, aprovechándose los subproductos de dicha industria reduciendo los costos de producción de PHB. Por este motivo en los últimos años se han investigado los residuos agroindustriales como posible fuente de carbono para la producción de PHB (ver Tabla 1).

Un residuo agroindustrial atractivo que actúa como sustrato en la producción de PHB es el glicerol residuo de la industria del biodiesel (GRIB). El GRIB es un subproducto de la formación de biodiesel generado en una relación de 10% (p/p) (Da Silva, Mack, y Contiero, 2009) y su composición consta principalmente de glicerol con presencia de algunas impurezas como metanol, sales, metales, jabones y agua (Hájek y Skopal, 2010). En Colombia se producen cerca

de 50 mil toneladas al año de GRIB exponiéndolo como potencial fuente de carbono para la producción de PHB en Colombia (Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia [FNBC], 2015)

Entre los diferentes microorganismos productores de PHB se destacan los *Bacillus* debido a su rápido crecimiento, pocas restricciones en las condiciones de operación y tolerancia a altas temperaturas (Valappil, Boccaccini, Bucke, y Roy, 2007). Moreno Yañez (2015) reportó una cepa nativa denominada *Bacillus megaterium* B2; cepa Gram positiva, aerobia estricta, tiene forma cilíndrica con un tamaño de 1.2 a 1.5 μm de ancho y 2.0 a 5 μm de largo; al observarla en el microscopio se ve en forma individual, en pares o en cadenas. Sin embargo, la especie *Bacillus megaterium* tiende a formar esporas elipsoidales; sus colonias son redondas hasta ovaladas con un aspecto brillante (Faccin *et al.*, 2009).

B. megaterium B2 es capaz de producir PHB a partir de GRIB (Moreno Yañez, 2015). La producción de PHB en B2 se ha analizado de acuerdo a las variables C/N, temperatura, agitación, pH y tiempo de fermentación (Moreno Yañez, 2015). A pesar de los estudios realizados es posible incrementar la concentración del polímero mediante la evaluación de varias estrategias con base en las variables estudiadas (Faccin *et al.*, 2009; López *et al.*, 2012).

Las estrategias propuestas en la literatura para aumentar la producción de PHB empleando *Bacillus megaterium* tienen su fundamentación teórica en el ciclo de la síntesis y degradación de PHB en el microorganismo que se observa en la Figura 1. El Acetil-CoA es el metabolito clave del cual dependen la producción de acetato, la producción de PHB y el ciclo de respiración celular (Weitzman, 1981). La primera estrategia consiste en limitar la cantidad de fuente de nitrógeno disponible, esto se debe a que el nitrógeno es un nutriente esencial que interviene en el proceso de crecimiento celular y al limitar el nitrógeno, el crecimiento celular es restringido

permitiendo al Acetil-CoA ser implementado en la producción de PHB (Babel, Ackermann, y Breuer, 2001). La segunda estrategia consiste en limitar la disponibilidad de oxígeno. Al reducir la cantidad de oxígeno asequible para la bacteria se detiene el ciclo de Krebs del cual el Acetil CoA es precursor, permitiendo al Acetil-CoA ser utilizado para la ruta de formación de PHB (Babel *et al.*, 2001).

Naranjo, Posada, Higuera, y Cardona (2013) encontraron que una limitación de la fuente de nitrógeno (C/N de 36.9) en *B. megaterium* BBST4 permite obtener concentraciones de PHB de 3.4 g/l en un biorreactor mientras que Moreno Yañez (2015) reportó que en una relación de exceso (C/N de 9.4) se produjo 0.43 g/l de PHB en matraz. En otras investigaciones, Sabra y Abou-Zeid (2008) hallaron que bajo condiciones de limitación de oxígeno se lograban producciones de PHB de 5.3 g/l para *Bacillus megaterium* DSMZ90 mientras que Faccin *et al.* (2009) encontró producciones de PHB de 3.3 g/l para condiciones de oxígeno disuelto (OD) aproximadamente cero. En contraste a esto, López *et al.* (2012) y Naranjo *et al.* (2013) encontraron producciones de PHB de 4.8 g/l bajo condiciones de exceso de Oxígeno (OD = 80%).

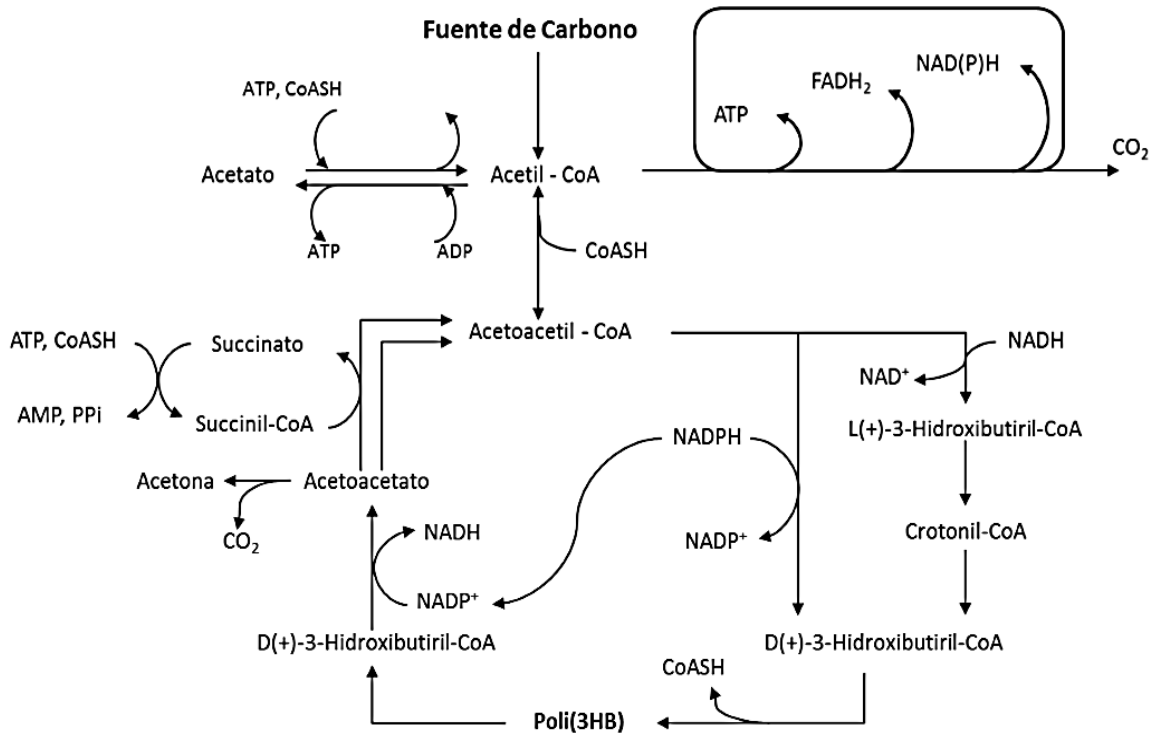


Figura 1. Ciclo de la síntesis y degradación de PHB. Adaptado de Babel, W., Ackermann, J.-U., y Breuer, U. (2001). *Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB)* (pp. 125–157). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-40021-4_4

Aunque las estrategias empleadas tienen efectos positivos en la producción de PHB, no se discute en detalle la influencia sobre el metabolismo de la cepa empleada. Debido a lo mencionado anteriormente, en este trabajo se realizó un estudio preliminar del efecto combinado de la relación C/N y la disponibilidad de oxígeno en la producción de PHB y biomasa por *B. megaterium* B2 en matraces de 500 ml sin control de pH usando GRIB como fuente de carbono.

1. Objetivos

1.1. General

Estudiar el efecto de la relación C/N en la bioproducción de PHB por *B. megaterium* B2 utilizando glicerol crudo en matraces de 500 ml sin control de pH bajo condiciones de exceso y limitación de oxígeno.

1.2. Específicos

- Examinar el crecimiento bacteriano de *B. megaterium* B2 en el medio de cultivo.
- Analizar el exceso y limitación de la fuente de nitrógeno en las cinéticas de producción de PHB y biomasa en *B. megaterium* B2.
- Evaluar el efecto de la relación C/N y la disponibilidad de oxígeno en la producción de PHB por *B. megaterium* B2.

2. Metodología

Las etapas metodológicas desarrolladas durante este estudio se resumen en la Figura 2. Todos los experimentos desarrollados se realizaron sin control de pH y por duplicado. El cálculo de las desviaciones se realizó con ayuda del software Microsoft Excel 2016.

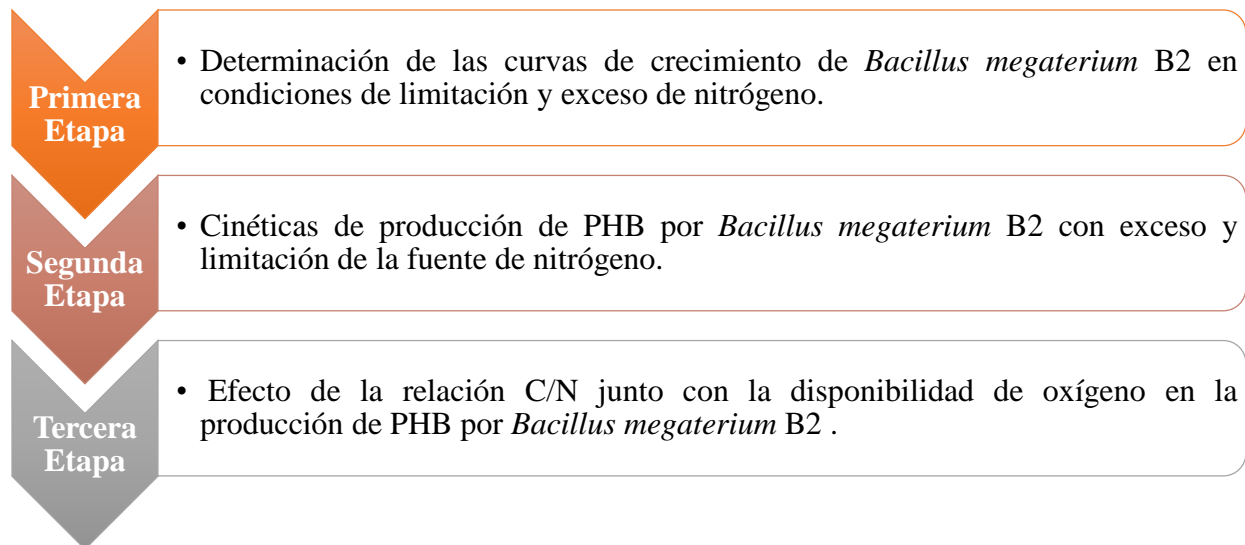


Figura 2. Metodología desarrollada.

2.1. Medio de cultivo y cepa previamente adaptada

En la Tabla 2 se presenta el medio de cultivo empleado. Se tomó como base el medio de sales utilizado por el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM). El pH inicial del medio de cultivo fue de 6.6 ± 0.12 , medido con un pH metro Thermo Scientific A111.

Las relaciones C/N estudiadas se seleccionaron de acuerdo con la literatura revisada. La relación limitante de nitrógeno fue C/N 36.9 según Naranjo *et al.* (2013) mientras que la relación en exceso fue C/N 9.4 según Moreno Yañez (2015). Los demás puntos estudiados se ubican dentro de las condiciones de exceso y limitación de nitrógeno como se muestra en la Tabla 3.

La fuente de carbono se mantuvo constante para todas las relaciones con un valor de 20 g/l de glicerol empleando GRIB mientras que la fuente de nitrógeno en el medio corresponde al sulfato de amonio cuya concentración varió de acuerdo con cada relación C/N como se observa en la Tabla 3.

Tabla 2.

Medio de cultivo.

Sustancia	Formula química	Concentración [g/l]
Glicerol	$C_3H_8O_3$	20
Fosfato diácido de potasio	KH_2PO_4	1.5
Fosfato ácido de sodio	Na_2HPO_4	3
Sulfato de magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
Elementos traza*	*	0.1

Nota: *Para conocer la composición química de los elementos traza, ver Apéndice A, Tabla A.1.

Tabla 3.

Concentración de sulfato de amonio para cada relación C/N en el medio de cultivo.

Relación C/N	Concentración sulfato de amonio [g/l]
9.4	3.9
16.2	2.3
23.1	1.6
30.0	1.2
36.9	1

2.2. Fuente de carbono

Se utilizó glicerol crudo como fuente de carbono, obtenido de una planta de producción de biodiesel llamada BIO D ubicada en Facatativá, Cundinamarca. Se almacenó en recipientes de vidrio a una temperatura de 4°C. Su caracterización fue reportada por Moreno Yañez (2015) como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4.

Caracterización del GRIB.

Parámetros fisicoquímicos		Valor
pH		6.41 ± 0.12
Densidad (g/ml)		1.04 ± 0.01
Glicerol (%p/p)		47.42 ± 0.23
Humedad (%p/p)		45.42 ± 0.02
Cenizas (%p/p)		2.85 ± 0.25
Materia Orgánica no Glicerol	Metano (%p/p)	3.57 ± 0.05
	Jabones (%p/p)	1.34 ± 0.17

Nota: Adaptado de Moreno Yañez, P. A. (2015). *Estudio de la producción de polihidroxibutirato (PHB) por Bacillus sp utilizando glicerol residuo de la industria del biodiesel como fuente de carbono.* Universidad Industrial de Santander.

2.3. Microorganismo

Se utilizó la cepa nativa *Bacillus megaterium* B2 la cual estaba almacenada a -21 °C en un medio con 200 g/l de glicerol aislada por Moreno Yañez (2015). La bacteria se adaptó para un consumo de glicerol de 20 g/l usando GRIB y se almacenó a igual temperatura.

2.4. Primera Etapa

2.4.1. Curvas de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 en condiciones de limitación y exceso de nitrógeno. Con el fin de determinar la curva de crecimiento de la cepa *B. megaterium* B2 se realizaron experimentos en matraces de 250 ml con 50 ml de medio en condiciones de limitación y exceso de nitrógeno (C/N 36.9 y 9.4) e incubada en un agitador orbital (Unimax 1010) con una agitación constante de 200 rpm y una temperatura de 34°C durante 24 horas. Cada 3 horas se tomaron muestras de 100 µl realizándose diluciones seriadas en 900 µl de solución peptonada estéril (0.1% p/v). Se hicieron 6 disoluciones por muestra y se inocularon 10 µl de

cada disolución en cajas de Petri con agar nutritivo y glicerol, las cuales se incubaron a 34°C durante 8 horas. Al terminar el periodo de incubación, se contaron las colonias formadas calculándose las unidades formadoras de colonia (UFC/ml).

2.5. Segunda Etapa

2.5.1. Efecto de la limitación y exceso de la fuente de nitrógeno sobre la producción de PHB en *Bacillus megaterium* B2. Para conocer el efecto de la limitación y exceso de la fuente de nitrógeno sobre la producción de PHB por parte de *B. megaterium* B2, se realizaron experimentos en matraces de 500 ml con 200 ml de medio de cultivo con las relaciones C/N 36.9 y 9.4 incubándose a 200 rpm y 34°C durante 48 horas. Se tomaron muestras cada 6 horas para determinar la producción de biomasa y PHB como también el consumo de glicerol y nitrógeno. Se identificó el tiempo para el cual se tiene la mayor concentración de PHB para cada una de las dos condiciones, con el fin de determinar el tiempo de parada de los experimentos de la tercera etapa. Para estos experimentos, se realizó una reactivación previa a la cepa *B. megaterium* B2 en matraces de 250 ml con 50 ml de medio con una relación C/N de 36.9 a 200 rpm y a una temperatura de 34°C durante 12 horas (se determinó el tiempo de reactivación según los resultados de la primera etapa), esto con el objetivo de lograr una adecuada adaptación al medio de cultivo. Posteriormente a la reactivación se agregó 1 ml de preinóculo por cada 50 ml de medio.

2.6. Tercera Etapa

2.6.1. Efecto combinado de la relación C/N y disponibilidad de oxígeno en la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2. Los experimentos se realizaron con y sin aireación para las cinco relaciones C/N mostradas en la sección 2.1 (ver Tabla 3). Se trabajó en matraces de 500 ml con 200 ml de medio de cultivo, manteniéndose las condiciones de operación empleadas en la segunda etapa. El tiempo de fermentación fue de 30 horas, determinado con base en los resultados de la segunda etapa. Para los experimentos con aireación, se dispuso de un sistema de burbujeo constante para garantizar la saturación de oxígeno en el medio durante todo el tiempo de fermentación. Al finalizar la fermentación, se determinó la producción de PHB, la formación de biomasa, el consumo de glicerol y de nitrógeno como también medición de pH. Se realizó el mismo procedimiento de reactivación de la segunda etapa para la cepa crio preservada.

2.7. Métodos Analíticos

2.7.1. PHB. Se centrifugó 2 ml de muestra a 7000 rpm y 4 °C durante 8 min. Se retiró el sobrenadante y el pellet sobrante fue sellado y congelado a -21°C. Posteriormente la muestra fue sometida a un proceso de liofilización por 48 horas. Luego se realizó una digestión agregando 1 ml de ácido sulfúrico a 96°C durante 30 min. La muestra resultante fue diluida 50 veces en una solución de H₂SO₄ (5 mM) y se tomó 1 ml de la muestra diluida en un recipiente de HPLC para su posterior cuantificación.

Las concentraciones de PHB se determinaron mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) usando como fase móvil una solución de H₂SO₄ 5 mM. Se utilizó un detector UV-VIS con una longitud de onda de 210 nm. Se implementó una columna SUPELCOGEL C-610H, con un flujo isocrático de 0.6 ml/min a una temperatura de 60°C.

2.7.2. Biomasa. Se utilizó una técnica de gravimetría para determinar la concentración de biomasa. Se almacenaron 10 ml de muestra en tubos falcon los cuales fueron previamente secados y pesados. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 7000 rpm y 4°C durante 8 min. Se retiró el sobrenadante y el pellet resultante fue secado por 24 horas a 60°C. La diferencia entre el peso del tubo vacío y el peso del tubo con pellet representa la cantidad de biomasa presente en 10 ml de muestra.

2.7.3. Glicerol. Para el análisis de glicerol se requirió 1 ml de sobrenadante obtenido de la cuantificación de la biomasa. La concentración de glicerol se determinó por HPLC y como fase móvil se empleó una solución de H₂SO₄ 5 mM. Para la detección de glicerol se utilizó un detector de índice de refracción. La columna empleada fue SUPELCOGEL C-610H con un flujo isocrático de 0.6 ml/min y a una temperatura de 60°C.

2.7.4. Nitrógeno. Se utilizó el método Kjeldahl para determinar la concentración de nitrógeno restante. Se destilaron 5 ml de sobrenadante residual en un destilador Kjeldahl UDK 129 (Velp Scientifica) en presencia de 150 ml de NaOH a 8.3M. El destilado se recolectó en 50 ml de ácido bórico 2% p/v. La presencia de amoníaco produce un cambio de color verde en la solución de ácido bórico debido a la presencia del indicador Mixto N°5 para titulaciones de amoníaco. Por último, la solución es llevada a titulación con ácido clorhídrico al 0.05 M.

3. Resultados y análisis

3.1. Curvas de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 en el medio de cultivo bajo limitación y exceso de nitrógeno

Se examinó el crecimiento de *B. megaterium* B2 en limitación y exceso de nitrógeno, relaciones C/N 36.9 y 9.4 respectivamente en el medio de cultivo definido en la sección 2.1. La

Figura 3 presenta las curvas de crecimiento de la cepa adaptada a 20 g/l de glicerol en dichas condiciones.

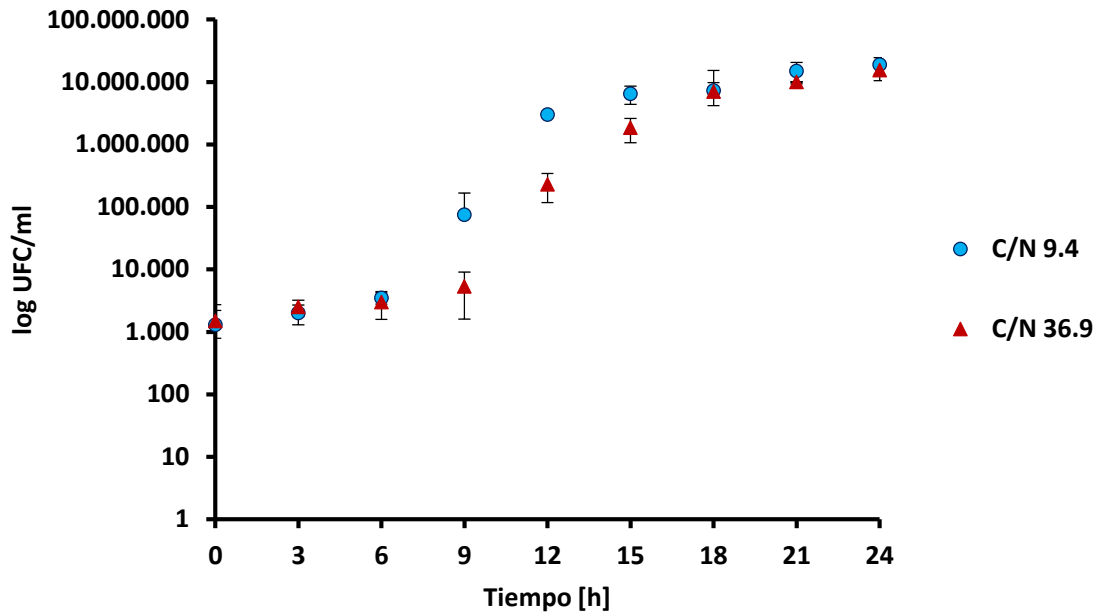


Figura 3. Curvas de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 en el medio de cultivo para las relaciones C/N 9.4 y 36.9.

En la Figura 3 se evidencia la tendencia del crecimiento del microorganismo por unidades formadoras de colonias UFC/ml en el tiempo. Las dos relaciones C/N inician con una concentración mayor a 10^3 UFC/ml. Se observa una fase de latencia más larga para la relación C/N 36.9 (9 horas) en comparación con la relación C/N 9.4 (6 horas). Se alcanza un mayor número de células viables en la relación C/N 9.4 al final de la fase de latencia (aproximado a 3.5×10^3 UFC/ml (ver Apéndice B, Tabla B.1). La relación C/N 9.4 registró un menor tiempo de duración en su fase exponencial (hora 12) ya que dispone de una mayor cantidad de nitrógeno en el medio mientras que la relación C/N 36.9 registró un tiempo mayor de duración (hora 18) al verse limitada su fuente de nitrógeno haciendo más lento su crecimiento. Al final de la fase estacionaria ambas relaciones C/N tienen una concentración similar mayor a 10^7 UFC/ml (ver

Apéndice B, Tabla B.2) demostrando que la bacteria crece en el medio adaptado a 20 g/l de glicerol.

Moreno Yañez (2015) reportó una fase de latencia de 12 horas para concentraciones de glicerol mayores o igual a 20 g/l. Por ende, se logra mejorar la velocidad de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 en el medio de cultivo.

A partir de los resultados, se definió el tiempo de reactivación para el medio de cultivo en 12 horas tomando como criterio de parada el punto medio de la fase exponencial para una relación C/N de 36.9.

3.2. Cinéticas de producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 en condiciones de exceso y limitación de nitrógeno

En las Figura 4 y Figura 5 se presentan los resultados obtenidos de la medición de la concentración de PHB y biomasa producida por el microorganismo junto a la concentración de nitrógeno y glicerol residual para las relaciones C/N 9.4 y 36.9 durante un tiempo de 48 horas.

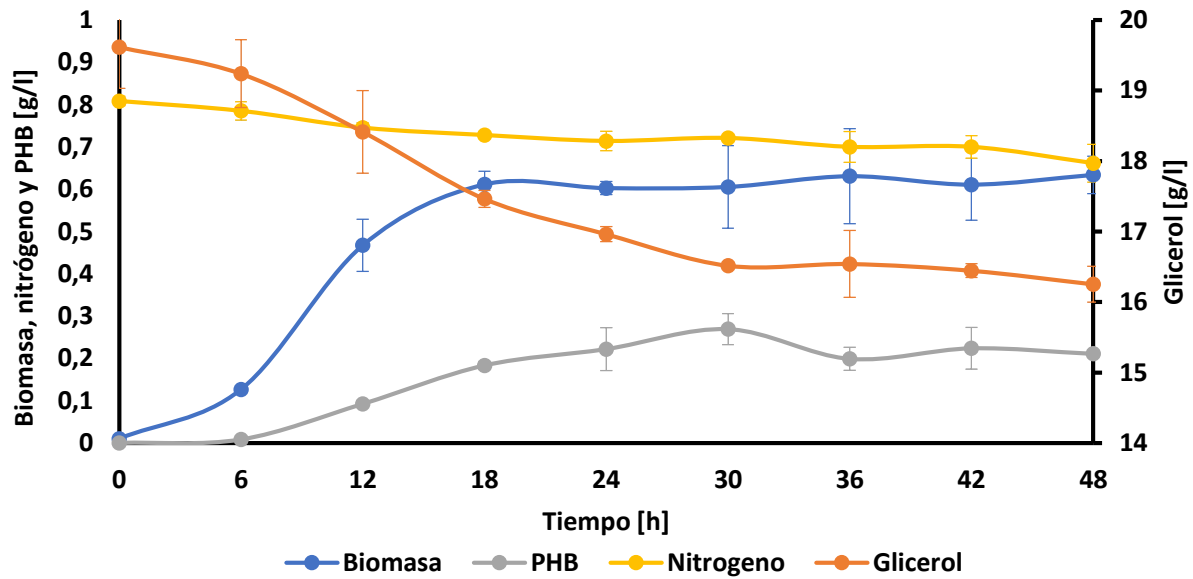


Figura 4. Concentraciones de PHB, Biomasa, Glicerol y Nitrógeno obtenidas para la relación C/N 9.4.

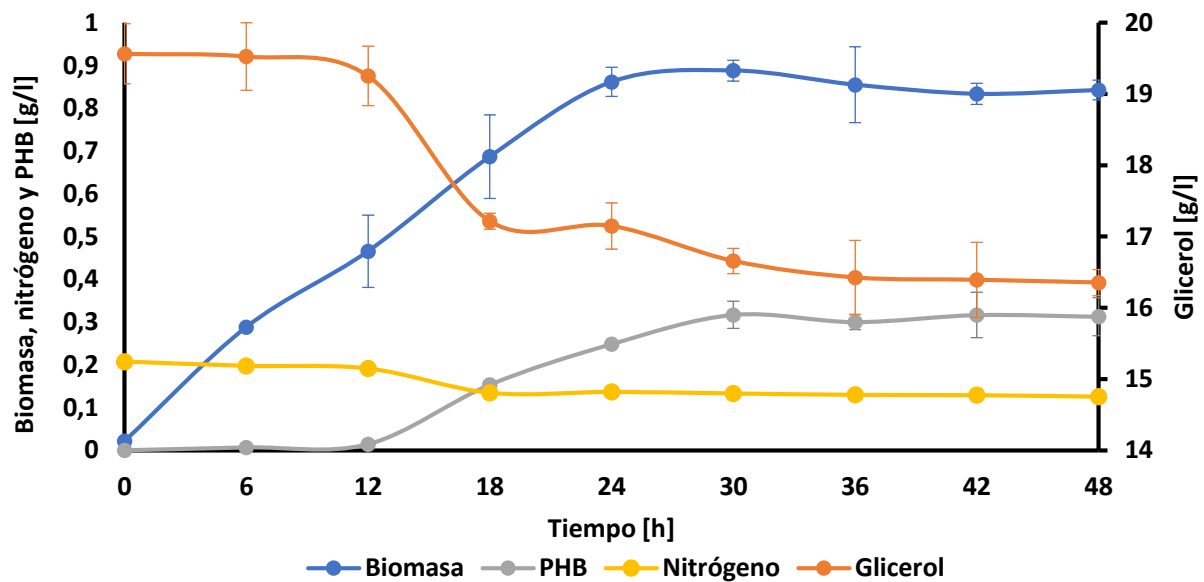


Figura 5. Concentraciones de PHB, Biomasa, Glicerol y Nitrógeno obtenidas para la relación C/N 36.9.

En ambas figuras (Figura 4 y Figura 5) con respecto a la concentración de biomasa no se observa una fase de latencia definida, lo que indica que tiene una duración menor a 6 horas. También se observa que en la Figura 4 se alcanza la máxima concentración de biomasa alrededor de la hora 18 (0.61 g/l; ver Apéndice C, Tabla C.1) manteniéndose constante después de dicha hora, a su vez, para la Figura 5 se alcanza la máxima concentración de biomasa (0.89 g/l) a la hora 30 y se mantiene constante después de dicha hora (ver Apéndice C, Tabla C.5). Se puede evidenciar que mientras aumenta la concentración de biomasa también aumenta la concentración de PHB. La concentración máxima de PHB se alcanzó después de que cesara el crecimiento de la biomasa en ambas graficas mostrándolo como un metabolito mixto. Divyashree, Rastogi, y Shamala (2009) y Elles Montero y García Echeverry (2012) han encontrado que el PHB se puede comportar como metabolito primario o secundario.

Se puede observar que la concentración de PHB aumenta desde la hora 6 hasta la hora 30 en la Figura 4 mientras que en la Figura 5 la concentración de PHB aumenta a partir de la hora 12, siendo en la hora 30 la concentración más alta de PHB para ambas figuras. La concentración más alta obtenida para la relación C/N 36.9 fue 0.29 g/l de PHB (ver Apéndice C, Tabla C.8) mientras que para la relación C/N 9.4 se obtuvieron 0.24 g/l (ver Apéndice C, Tabla C.4); ambas concentraciones obtenidas a la hora 30. Entre la hora 30 y la hora 36 se evidencia que la concentración de PHB disminuye al igual que lo hace el consumo de glicerol en el mismo lapso en ambas figuras, sugiriendo que el microorganismo consumió PHB como fuente de energía en vez de glicerol, aun cuando este último todavía estaba presente en exceso (Faccin *et al.*, 2009). Se obtuvieron mejores resultados en cuanto a la producción de PHB comparado con Aslim, Yüksekdag, y Beyatli (2002) que encontraron una concentración de 0.21 g/l para la producción

de PHB en *B. megaterium* Y6 . Aunque Gouda, Swellam, y Omar (2001) obtuvieron mejores concentraciones de PHB (0.69 g/l) en *B. megaterium*.

En cuanto al glicerol se evidencia un consumo total de 3.36 g/l en la Figura 4 (datos experimentales en Apéndice C, Tabla C.1 y Tabla C.2) y un consumo total de 3.21 g/l en la Figura 5 (datos experimentales en Apéndice C, Tabla C.6) observándose que no se consume todo el sustrato en ambos casos. La mayor velocidad de consumo de glicerol se presentó entre las horas 6 y 30 coincidiendo la hora 30 con la mayor concentración de PHB registrada en ambas figuras.

Analizando la concentración de nitrógeno se visualiza un consumo mínimo de dicho compuesto en ambas relaciones (ver Apéndice C, Tabla C.3, Tabla C.7). Esto supone que la bacteria creció principalmente debido a la disponibilidad y consumo de la fuente de carbono.

Para ambas relaciones el consumo de glicerol total fue muy similar, pero para la relación C/N 36.9 el microorganismo creció más que en la relación C/N 9.4 obteniéndose rendimientos en función de biomasa $Y_{x/s}$ de 27.8% y 18.8% respectivamente. De la misma forma en la relación C/N 36.9 se produjo mayor cantidad de PHB mostrando un rendimiento $Y_{p/s}$ de 9.9% en comparación con la relación C/N 9.4 que obtuvo un rendimiento $Y_{p/s}$ 8% aduciendo que una limitación de nitrógeno mejora la síntesis de PHB, aunque dicha mejoría no es significativa, mientras que su exceso genera un aumento de mantenimiento celular y una disminución en la producción de PHB y biomasa (datos experimentales de PHB en Apéndice C, Tabla C.4, y Tabla C.8).

Para *B. megaterium* B2 la máxima concentración de PHB se obtuvo en la hora 30 en ambos experimentos similar a Moreno Yañez (2015) donde la mejor producción de PHB se encontró a

la hora 28. Por ende, se eligió la hora 30 como criterio de parada para la siguiente etapa del proyecto.

3.3. Efecto de la relación C/N en la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 en sistemas con y sin aireación

En las Figura 6 y Figura 7 se presentan los resultados obtenidos de la medición de la concentración de PHB y biomasa producida por *B. megaterium* B2 junto al consumo de nitrógeno y glicerol con y sin aireación para las relaciones C/N mostradas en la sección 2.1 (ver Tabla 3) durante un tiempo de 30 horas de fermentación.

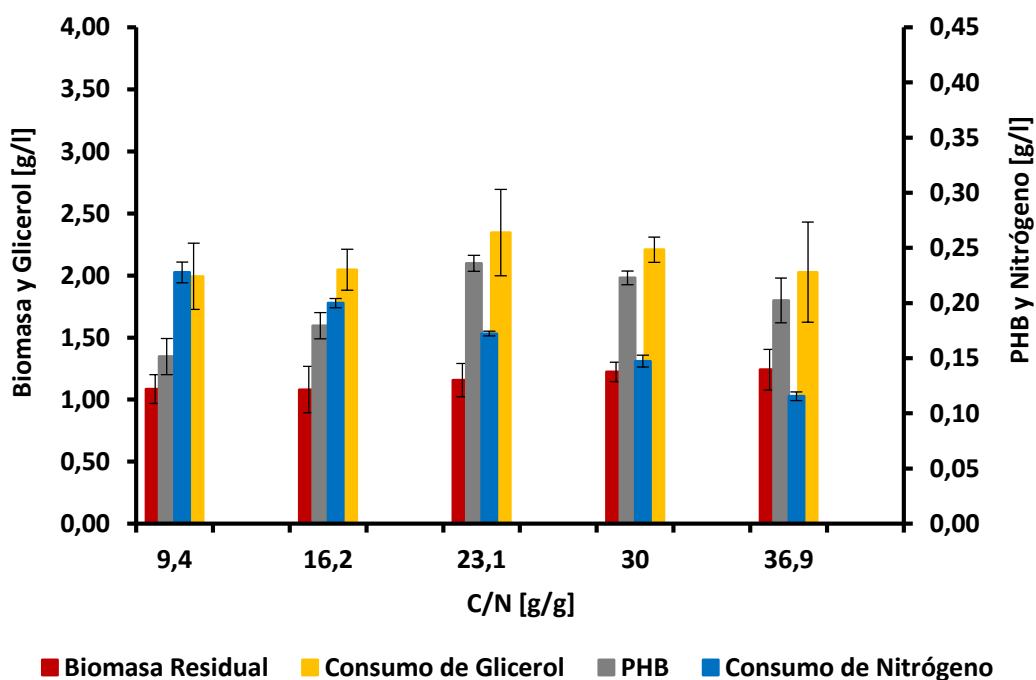


Figura 6. Concentración de PHB, biomasa, consumo de glicerol y nitrógeno con aireación para todas las relaciones C/N.

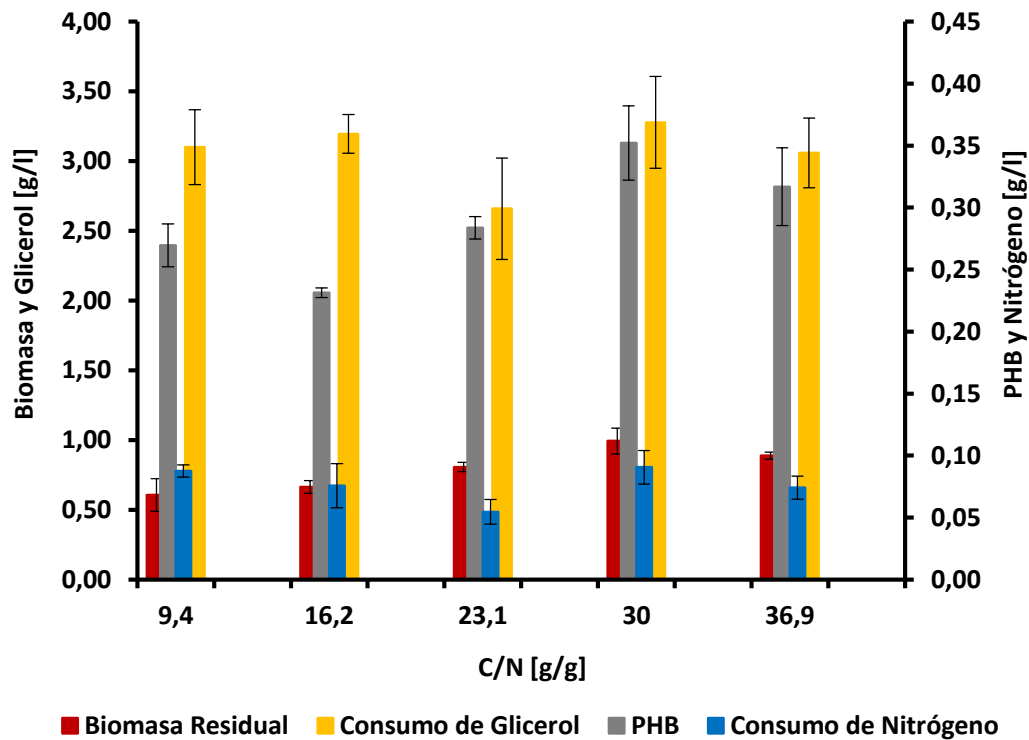


Figura 7. Concentración de PHB, biomasa, consumo de glicerol y nitrógeno sin aireación para todas las relaciones C/N.

En la Figura 6 se observa que en todas las relaciones C/N la concentración de biomasa formada es mayor que en la Figura 7. De acuerdo con la información recopilada en la Figura 6, la mayor concentración de biomasa se da en la relación C/N 36.9 al obtener un valor de 1.24 g/l, mientras que en la relación C/N 9.4 se encuentra la menor concentración de biomasa en el sistema con aireación, correspondiente a 1.08 g/l. La Figura 7 correspondiente al sistema sin aireación demuestra que la máxima concentración de biomasa se da para la relación C/N 30.0 alcanzando un valor de 0.99 g/l, en cambio la menor concentración de biomasa se da para la relación C/N 9.4 con un valor de 0.61 g/l. El rendimiento alcanzado por la relación C/N que produjo la mayor concentración de biomasa en un sistema aireado fue de $Y_{x/s}$ 61.22 %, siendo

mejor que el rendimiento obtenido para un sistema sin aireación de $Y_{x/s}$ 30.30% en la relación C/N 30 (ver Apéndice D, Tabla D.1, Tabla D.2).

Se observa en la Figura 6 un aumento general en todas las relaciones C/N del consumo de nitrógeno con respecto a lo contemplado en la Figura 7 (datos experimentales en Apéndice D, Tabla D.5 y Tabla D.6). Dicho consumo, muestra la necesidad de nitrógeno y oxígeno por parte del microorganismo para poder producir una mayor concentración de biomasa.

Se deduce que el exceso de oxígeno junto con el exceso de la fuente de nitrógeno favorecen la formación de biomasa destinando la fuente de carbono a dicho proceso. Aunque la producción de PHB está ligada al crecimiento del microorganismo, si el metabolito precursor para la formación de PHB es tomado para el proceso de crecimiento celular, su producción disminuirá.

Al observar la concentración de PHB en ambas gráficas (Figura 6 y Figura 7) se alcanza una mayor concentración en todas las relaciones C/N estudiadas en un sistema de no aireación (Figura 7) encontrando la mayor concentración de PHB producida en la relación C/N 30 de 0.35 g/l mientras que en la Figura 6 la máxima concentración de PHB llegó hasta 0.23 g/l para una relación C/N 23.1, siendo igual a la menor concentración del sistema sin aireación con una relación C/N 16.2. De la misma manera el mayor rendimiento $Y_{p/s}$ registrado fue de 10.75% en la relación C/N 30 para un sistema de no aireación, aunque el menor rendimiento se dio en el mismo sistema en una relación C/N de 16.2 con un $Y_{p/s}$ de 7.24% (ver Apéndice D, Tabla D.7, Tabla D.8).

En cuanto al glicerol, todas las relaciones C/N sin aireación consumieron más sustrato en comparación al sistema con aireación. La relación que consume mayor cantidad de glicerol en la Figura 7 con un valor de 3.3 g/l es la relación C/N 30 como también es la relación que más PHB

produce mostrando una relación entre el consumo de glicerol y la producción de PHB. El menor consumo de glicerol en la Figura 7 se dio en la relación C/N 23.1 y fue de 2.7 g/l mientras que el máximo consumo de glicerol en la Figura 6 fue de 2 g/l (ver Apéndice D, Tabla D.3, Tabla D.4).

Se demuestra que la limitación de oxígeno inhibe hasta cierto punto el crecimiento celular y de esta forma aumenta la formación de PHB en el microorganismo. A su vez, aunque se formó menos biomasa comparado con el proceso en un sistema aireado, el consumo de glicerol fue mayor en un sistema limitado de oxígeno. No obstante, los rendimientos $Y_{p/s}$ de ambos sistemas (ver Apéndice D, Tabla D.7 y Tabla D.8) son muy similares, por tanto, se deduce que el gasto energético por mantenimiento celular aumenta en condiciones de limitación de oxígeno.

La Figura 8 presenta los datos obtenidos en la medición de pH para cada relación C/N en los sistemas con y sin aireación al final de la fermentación.

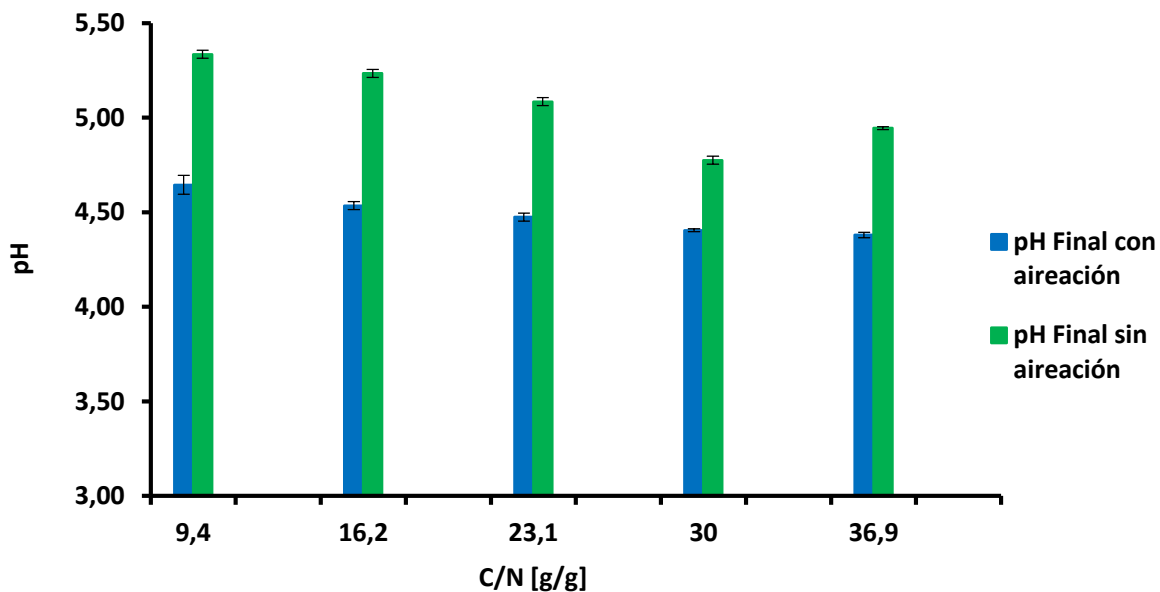


Figura 8. pH para las diferentes relaciones C/N en los sistemas con y sin aireación al final de la fermentación.

Según la Figura 8, todos los sistemas presentan una disminución de pH (ver Apéndice D, Tabla D. 9 y Tabla D. 10) generado por la actividad metabólica de la bacteria (Sharma y Bajaj, 2015). El sistema con aireación presenta los valores más bajos de pH en comparación al sistema sin aireación. El valor más alto de pH (5.34) se da en una relación C/N 9.4 sin aireación mientras que el valor más bajo (4.38) se da en una relación C/N 36.9, demostrando que a mayor producción de biomasa (ver Figura 6 y Figura 7), mayor acidificación del medio.

En cuanto a la producción de PHB, se refleja una inhibición del proceso en todos los sistemas debido a la disminución del pH (Liu, Huang, Zhang, y Xu, 2014).

Faccin *et al.* (2009) reportó un resultado similar, donde valores de pH cercanos a 4.6 inhibían la producción de PHB en *Bacillus megaterium* DSM32.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que la mejor condición sin control de pH para la producción de PHB se encontró en un sistema no aireado en la relación C/N 30 llegando a una concentración de 0.35 g/l con un rendimiento $Y_{p/s}$ de 10.75%.

4. Conclusiones

Un exceso de nitrógeno aumenta la velocidad de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* B2. No obstante, la concentración de nitrógeno no afecta a la cantidad de células viables formadas al final del crecimiento celular llegando a valores por encima de 1.5×10^7 UFC/ml.

Se determinó que la mayor producción de PHB se da en la hora 30 de fermentación para procesos con limitación de aire y sin control de pH. Para las relaciones C/N 36.9 y 9.4 se

alcanzaron concentraciones de PHB de 0.29 g/l y 0.24 g/l respectivamente. Se obtuvo un rendimiento $Y_{p/s}$ de 9.9% para la relación C/N 36.9 y un $Y_{p/s}$ de 8% para la relación C/N 9.4.

Un exceso de oxígeno afecta negativamente la producción de PHB alcanzándose una concentración de 0.23 g/l para esta condición, mientras que para la condición con limitación de oxígeno se alcanzó una concentración de 0.35 g/l de PHB.

Existe un efecto combinado de la relación carbono nitrógeno y la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo sobre la concentración máxima de PHB durante los cultivos sin control de pH de *B. megaterium* B2. La mayor concentración de PHB para los experimentos sin aireación fue de 0.35 g/L para una relación C/N 30, mientras que para los experimentos con aireación la máxima concentración de PHB fue de 0.23 g/L para una relación C/N de 23.1.

5. Recomendaciones

La concentración obtenida del biopolímero es baja en las condiciones estudiadas, por ende, se recomienda estudiar el efecto C/N controlándose el pH y los niveles de oxígeno.

Referencias Bibliográficas

- Albuquerque, P. B. S., & Malafaia, C. B. (2018). Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 615–625. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.09.026>
- Aslim, B., Yüksekdag, Z. N., & Beyatli, Y. (2002). Determination of PHB growth quantities of certain bacillus species isolated from soil. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, 24–30.
- Babel, W., Ackermann, J.-U., & Breuer, U. (2001). Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB) (pp. 125–157). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-40021-4_4
- Chen, Y., Chou, I.-N., Tsai, Y.-H., & Wu, H.-S. (2013). Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) in drying treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(5), 3659–3667. <https://doi.org/10.1002/app.39616>
- Choi, J., & Lee, S. Y. (1999). Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 13–21. <https://doi.org/10.1007/s002530051357>
- da Silva, G. P., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2008.07.006>
- de Paula, F. C., Kakazu, S., de Paula, C. B. C., Gomez, J. G. C., & Contiero, J. (2017). Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated *Pandoraea* sp. *Journal of King Saud University - Science*, 29(2), 166–173. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2016.07.002>
- Divyashree, M. S., Rastogi, N. K., & Shamala, T. R. (2009). A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. *New Biotechnology*, 26(1–2), 92–98. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2009.04.004>

- Elles Montero, A. E., & García Echeverry, C. A. (2012). *Mezcla sinérgica entre polihidroxitirato (PHB) y caucho natural (latex) para obtener un copolimero*. Universidad de Cartagena.
- Faccin, D. J. L., Martins, I., Cardozo, N. S. M., Rech, R., Ayub, M. A. Z., Alves, T. L. ., ... Secchi, A.R. (2009). Optimization of C :N ratio and minimal 49 initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, *84*, 1756–1761.
- Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. (2015). <http://www.fedebiocombustibles.com>.
- Fontaine, P., Mosrati, R., & Corroler, D. (2017). Medium chain length polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Pseudomonas putida* mt-2 is enhanced by co-metabolism of glycerol/octanoate or fatty acids mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, *98*, 430–435. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.01.115>
- García, I. L., López, J. A., Dorado, M. P., Kopsahelis, N., Alexandri, M., Papanikolaou, S., ... Koutinas, A. A. (2013). Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, *130*, 16–22. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.11.088>
- Ghanbarzadeh, B., & Almasi, H. (2013). No Title. *Biodegradation - Life of Science*, *ch 6*, 141–185. <https://doi.org/10.5772/56230>
- Gómez Cardozo, J. R., Mora Martínez, A. L., Yepes Pérez, M., & Correa Londoño, G. A. (2016). Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste. *International Journal of Polymer Science*, *2016*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/6541718>
- González Garcia, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdoba López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. scielomx.

- Gouda, M. K., Swellam, A. E., & Omar, S. H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, *156*(3), 201–207.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1078/0944-5013-00104>
- Hájek, M., & Skopal, F. (2010). Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresource Technology*, *101*(9), 3242–3245.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.12.094>
- Kessler, B., Weusthuis, R., Witholt, B., & Eggink, G. (2001). Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes BT - Biopolyesters. In W. Babel & A. Steinbüchel (Eds.) (pp. 159–182). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/3-540-40021-4_5
- Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, *14*(11), 431–438. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10061-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10061-5)
- Lenz, R. W., & Marchessault, R. H. (2005). Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules*, *6*(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1021/bm049700c>
- Liu, Y., Huang, S., Zhang, Y., & Xu, F. (2014). Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate. *Journal of Environmental Sciences*, *26*(7), 1453–1462.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.05.011>
- López, J. A., Naranjo, J. M., Higuera, J. C., Cubitto, M. A., Cardona, C. A., & Villar, M. A. (2012). Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *17*(2), 250–258. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0448-1>
- Moreno Yañez, P. A. (2015). *Estudio de la producción de polihidroxibutirato (PHB) por Bacillus sp utilizando glicerol residuo de la industria del biodiesel como fuente de carbono*. Universidad Industrial de Santander.

- Mousavioun, P., George, G. A., & Doherty, W. O. S. (2012). Environmental degradation of lignin/poly(hydroxybutyrate) blends. *Polymer Degradation and Stability*, *97*(7), 1114–1122. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2012.04.004>
- Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higueta, J. C., & Cardona, C. A. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, *133*, 38–44. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.01.129>
- Pagliano, G., Ventrino, V., Panico, A., & Pepe, O. (2017). Integrated systems for biopolymers and bioenergy production from organic waste and by-products: a review of microbial processes. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0802-4>
- Rizzarelli, P., & Carroccio, S. (2014). Modern mass spectrometry in the characterization and degradation of biodegradable polymers. *Analytica Chimica Acta*, *808*, 18–43. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2013.11.001>
- Rodríguez Contreras, A., Calafell Monfort, M., & Marqués Calvo, M. S. (2012). Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by a commercial lipase. *Polymer Degradation and Stability*, *97*(11), 2473–2476. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2012.07.042>
- Sabra, W., & Abou-Zeid, D. M. (2008). Improving Feeding Strategies for Maximizing Polyhydroxybutyrate Yield by *Bacillus megaterium*. *Research Journal of Microbiology*, *3*(5), 308–318. <https://doi.org/10.3923/jm.2008.308.318>
- Sharma, P., & Bajaj, B. K. (2015). Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PS 10. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 241–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.008>
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, *25*(10), 1503–1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)

- Tan, D., Wu, Q., Chen, J.-C., & Chen, G.-Q. (2014). Engineering Halomonas TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering*, 26, 34–47.
<https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2014.09.001>
- Téllez Maldonado, A. (2012). *La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: Una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá*. Universidad Nacional de Colombi.
- Valappil, S. P., Boccaccini, A. R., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera Bacillus and Streptomyces. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91(1), 1–17. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/s10482-006-9095-5>
- Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable Polymers. *Materials*, 2(2), 307–344.
<https://doi.org/10.3390/ma2020307>
- Weitzman, P. D. J. (1981). Unity and diversity in some bacterial citric acid-cycle enzymes. *Adv. Microbial Physiol*, 22, 185.
- Yeo, J. C. C., Muiruri, J. K., Thitsartarn, W., Li, Z., & He, C. (2017). Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. *Materials Science and Engineering: C*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.006>
- Zalasiewicz, J., Waters, C. N., Ivar do Sul, J. A., Corcoran, P. L., Barnosky, A. D., Cearreta, A., ... Yonan, Y. (2016). The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene*, 13, 4–17.
<https://doi.org/10.1016/J.ANCENE.2016.01.002>
- Zhang, Y.-Z., Liu, G.-M., Weng, W.-Q., Ding, J.-Y., & Liu, S.-J. (2015). Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. *Journal of Biotechnology*, 195, 82–88.
<https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2014.12.014>

Apéndices**Apéndice A. Composición química de los elementos traza usados en el medio de cultivo**

Tabla A.1.

Sustancias presentes en los elementos traza.

Sustancia	Concentración
Sulfato de hierro heptahidratado	10 g/l
Sulfato de zinc heptahidratado	2.25 g/l
Sulfato de cobre pentahidratado	1 g/l
Sulfato de manganeso tetrahidratado	0.5 g/l
Cloruro de calcio dihidratado	2 g/l
Ácido bórico	0.23 g/L
Molibdato de amonio	0.2 g/l
Ácido clorhídrico	10 ml

Apéndice B. Datos experimentales y desviaciones estándar para las curvas de crecimiento en las relaciones C/N 9.4 y 36.9, exceso y limitación de nitrógeno respectivamente

Tabla B.1

Datos experimentales de la curva de crecimiento de B. megaterium B2 en el medio de cultivo para la relación C/N 9.4.

Hora	# Colonias	Dilución	UFC/ml	Promedio UFC/ml	Desviación estándar
0	23	0	2,300	1,300	1,414
	3	0	300		
3	25	0	2,500	2,000	707
	15	0	1,500		
6	4	-1	4,000	3,500	707
	3	-1	3,000		
9	14	-2	140,000	75,000	91,924
	1	-2	10,000		
12	3	-4	3,000,000	3,000,000	0
	3	-4	3,000,000		
15	8	-4	8,000,000	6,500,000	2,121,320
	5	-4	5,000,000		
18	13	-4	13,000,000	7,250,000	8,131,728
	15	-3	1,500,000		
21	19	-4	19,000,000	15,000,000	5,656,854
	11	-4	11,000,000		
24	15	-4	15,000,000	19,000,000	5,656,854
	23	-4	23,000,000		

Tabla B.2

Datos experimentales de la curva de crecimiento de B. megaterium B2 en el medio de cultivo para la relación C/N 36.9.

Hora	# Colonias	Dilución	UFC/ml	Promedio UFC/ml	Desviación estándar
0	1	-1	1,000	1,500	707
	2	-1	2,000		
3	3	-1	3,000	2,500	707
	2	-1	2,000		
6	4	-1	4,000	3,000	1,414
	2	-1	2,000		
9	27	0	2,700	5,350	3,748
	8	-1	8,000		
12	15	-2	150,000	230,000	113,137
	31	-2	310,000		
15	24	-3	2,400,000	1,850,000	777,817
	13	-3	1,300,000		
18	5	-4	5,000,000	7,000,000	2,828,427
	9	-4	9,000,000		
21	10	-4	10,000,000	10,000,000	0
	10	-4	10,000,000		
24	19	-4	19,000,000	15,500,000	4,949,747
	12	-4	12,000,000		

Apéndice C. Datos experimentales y desviaciones estándar para las cinéticas de producción en las relaciones C/N 9.4 y 36.9, exceso y limitación de nitrógeno respectivamente.

Tabla C.1

Datos experimentales de biomasa residual de B. megaterium B2 para la relación C/N 9.4.

Hora	Concentración de biomasa residual [g/l]	Desviación Estándar
0	0.0102	0.0000
6	0.1267	0.0068
12	0.4675	0.0615
18	0.6114	0.0310
24	0.6027	0.0153
30	0.6055	0.0976
36	0.6308	0.1122
42	0.6109	0.0843
48	0.6339	0.0443

Tabla C.2

Datos experimentales de consumo de glicerol por B. megaterium B2 para la relación C/N 9.4.

Hora	Concentración de glicerol [g/l]	Desviación Estándar
0	19.6156	0.5865
6	19.2373	0.4812
12	18.4128	0.5845
18	17.4631	0.1216
24	16.9625	0.1059
30	16.5155	0.0433
36	16.5403	0.4731
42	16.4447	0.0979
48	16.2524	0.2541

Tabla C.3

Datos experimentales de consumo de nitrógeno por B. megaterium B2 para la relación C/N 9.4.

Hora	Concentración de nitrógeno [g/l]	Desviación Estándar
0	0.8085	0.0115
6	0.7852	0.0214
12	0.7455	0.0115
18	0.7280	0
24	0.7140	0.0231
30	0.7210	0.0066
36	0.7000	0.0363
42	0.7000	0.0264
48	0.6615	0.0445

Tabla C.4

Datos experimentales de producción de PHB por B. megaterium B2 para la relación C/N 9.4

Hora	Concentración de PHB [g/l]	Desviación Estándar
0	0.0002	0
6	0.0083	0.0002
12	0.0925	0.0049
18	0.1836	0.0098
24	0.2223	0.0507
30	0.2695	0.0367
36	0.1992	0.0274
42	0.2241	0.0490
48	0.2111	0.0090

Tabla C.5

Datos experimentales de biomasa residual de B. megaterium B2 para la relación C/N 36.9.

Hora	Concentración de biomasa residual[g/l]	Desviación Estándar
0	0.0215	0
6	0.2881	0.0070
12	0.4657	0.0847
18	0.6867	0.0977
24	0.8616	0.0343
30	0.8881	0.0244
36	0.8550	0.0884
42	0.8336	0.0248
48	0.8424	0.0233

Tabla C.6

Datos experimentales de consumo de glicerol por B. megaterium B2 para la relación C/N 36.9.

Hora	Concentración de glicerol [g/l]	Desviación Estándar
0	19.5637	0.4229
6	19.5261	0.4747
12	19.2535	0.4167
18	17.2148	0.1110
24	17.1481	0.3218
30	16.6567	0.1777
36	16.4246	0.5229
42	16.3915	0.5272
48	16.3530	0.1860

Tabla C.7

Datos experimentales de consumo de nitrógeno por B. megaterium B2 para la relación C/N 36.9.

Hora	Concentración de nitrógeno [g/l]	Desviación Estándar
0	0.2074	0.0037
6	0.1974	0.0060
12	0.1913	0.0071
18	0.1347	0.0019
24	0.1369	0.0084
30	0.1332	0.0057
36	0.1300	0.0008
42	0.1291	0.0018
48	0.1258	0.0042

Tabla C.8

Datos experimentales de producción de PHB por B. megaterium B2 para la relación C/N 36.9.

Hora	Concentración de PHB [g/l]	Desviación Estándar
0	0.0001	0
6	0.0069	0.0001
12	0.0143	0.0001
18	0.1533	0.0013
24	0.2484	0.0060
30	0.3169	0.0315
36	0.3000	0.0177
42	0.3164	0.0531
48	0.3126	0.0445

Apéndice D. Datos experimentales y desviaciones estándar para los sistemas con y sin aireación en las relaciones C/N 9.4, 16.2, 23.1, 30.0, y 36.9.

Tabla D.1

Datos experimentales de biomasa residual de B. megaterium B2 en un sistema con aireación.

C/N [g/g]	Biomasa residual [g/l]	Promedio B. residual [g/l]	Desv. Estándar	Y_{x/s} [%]
9.4	$\frac{1.1667}{1.0036}$	1.0851	0.1153	54.4276
16.2	$\frac{0.9490}{1.2122}$	1.0806	0.1861	52.8010
23.1	$\frac{1.2522}{1.0625}$	1.1574	0.1341	49.3550
30	$\frac{1.1681}{1.2794}$	1.2238	0.0787	55.4249
36.9	$\frac{1.1253}{1.3566}$	1.2410	0.1636	61.2210

Tabla D.2

Datos experimentales de biomasa residual de B. megaterium B2 en un sistema sin aireación.

C/N [g/g]	Biomasa residual [g/l]	Promedio B. residual [g/l]	Desv. Estándar	Y_{x/s} [%]
9.4	$\frac{0.5226}{0.6882}$	0.6054	0.1171	19.5289
16.2	$\frac{0.6314}{0.6959}$	0.6636	0.0456	20.7704
23.1	$\frac{0.8299}{0.7827}$	0.8063	0.0333	30.324
30	$\frac{0.9266}{1.0589}$	0.9928	0.0935	30.2893
36.9	$\frac{0.9054}{0.8709}$	0.8881	0.0244	29.0372

Tabla D.3

Datos experimentales de consumo de glicerol por B. megaterium B2 en un sistema con aireación.

C/N [g/g]	Concentración 0 h [g/l]	Concentración 30 h [g/l]	Consumo glicerol [g/l]	Promedio consumo gli. [g/l]	Desv. Estándar consumo gli.
9.4	20.1098	18.3043	1.8054	1.9937	0.2663
	20.1860	18.0040	2.1821		
16.2	19.8986	17.9684	1.9302	2.0465	0.1645
	20.5176	18.3547	2.1628		
23.1	20.2108	17.6194	2.5913	2.3450	0.3484
	19.8188	17.7202	2.0987		
30	20.4064	18.1269	2.2795	2.2080	0.1011
	20.2341	18.0976	2.1365		
36.9	20.5935	18.2811	2.3124	2.0270	0.4036
	19.6530	17.9113	1.7417		

Tabla D.4

Datos experimentales de consumo de glicerol por B. megaterium B2 en un sistema sin aireación.

C/N [g/g]	Concentración 0 h [g/l]	Concentración 30 h [g/l]	Consumo glicerol [g/l]	Promedio consumo gli. [g/l]	Desv. Estándar consumo gli.
9.4	19.2008	16.2910	2.9098	3.1001	0.2691
	20.0303	16.7399	3.2904		
16.2	19.6554	16.5582	3.0972	3.1951	0.1384
	19.9589	16.6659	3.2929		
23.1	19.8821	16.9656	2.9165	2.6590	0.3642
	19.6271	17.2256	2.4014		
30	20.1956	16.6846	3.5109	3.2777	0.3299
	19.8709	16.8264	3.0444		
36.9	19.8145	16.5787	3.2358	3.0585	0.2507
	19.6342	16.7529	2.8812		

Tabla D.5

Datos experimentales de consumo de nitrógeno por B. megaterium B2 en un sistema con aireación.

C/N [g/g]	Concentración 0 h [g/l]	Concentración 30 h [g/l]	Consumo nitrógeno [g/l]	Promedio consumo N. [g/l]	Desv. Estándar consumo N.
9.4	0.8022	0.5810	0.2212	0.2278	0.0094
	0.8084	0.5740	0.2344		
16.2	0.4620	0.2590	0.2030	0.2000	0.0042
	0.4480	0.2509	0.1971		
23.1	0.3080	0.1372	0.1708	0.1724	0.0022
	0.3069	0.1330	0.1739		
30	0.2562	0.1050	0.1512	0.1474	0.0054
	0.2520	0.1084	0.1436		
36.9	0.1968	0.0840	0.1128	0.1156	0.0039
	0.2000	0.0817	0.1183		

Tabla D.6

Datos experimentales de consumo de nitrógeno por B. megaterium B2 en un sistema sin aireación.

C/N [g/g]	Concentración 0 h [g/l]	Concentración 30 h [g/l]	Consumo nitrógeno [g/l]	Promedio consumo N. [g/l]	Desv. Estándar consumo N.
9.4	0.8003	0.7163	0.0840	0.0875	0.0049
	0.8167	0.7257	0.0910		
16.2	0.4452	0.3570	0.0882	0.0756	0.0178
	0.4725	0.4095	0.0630		
23.1	0.3248	0.2772	0.0476	0.0546	0.0099
	0.3234	0.2618	0.0616		
30	0.2510	0.1700	0.0810	0.0905	0.0134
	0.2550	0.1550	0.1000		
36.9	0.2100	0.1292	0.0808	0.0741	0.0094
	0.2047	0.1373	0.0675		

Tabla D.7

Datos experimentales de producción de PHB por B. megaterium B2 en un sistema con aireación.

C/N [g/g]	Concentración 30 h [g/l]	Promedio concentración PHB [g/l]	Desv. Estándar	Y _{p/s} [%]
9.4	0.1400 0.1630	0.1515	0.0163	7.6000
16.2	0.1710 0.1878	0.1794	0.0119	8.7673
23.1	0.2411 0.2308	0.2360	0.0073	10.0626
30	0.2185 0.2272	0.2229	0.0061	10.0941
36.9	0.1880 0.2167	0.2024	0.0203	9.9830

Tabla D.8

Datos experimentales de producción de PHB por B. megaterium B2 en un sistema sin aireación.

C/N [g/g]	Concentración 30 h [g/l]	Promedio concentración PHB [g/l]	Desv. Estándar	Y _{p/s} [%]
9.4	0.2574 0.2818	0.2696	0.0172	8.6961
16.2	0.2286 0.2341	0.2314	0.0039	7.2416
23.1	0.2901 0.2773	0.2837	0.0091	10.6693
30	0.3734 0.3311	0.3522	0.0299	10.7459
36.9	0.2946 0.3391	0.3169	0.0315	10.3609

Tabla D. 9

Datos de medición de pH en el medio de cultivo con B. megaterium B2 en un sistema con aireación.

C/N [g/g]	pH 30 h	Promedio pH 30 h	Desv. Estándar
9.4	4.68	4.65	0.05
	4.61		
16.2	4.52	4.54	0.02
	4.55		
23.1	4.46	4.48	0.02
	4.49		
30	4.40	4.41	0.01
	4.41		
36.9	4.37	4.38	0.01
	4.39		

Tabla D. 10

Datos de medición de pH en el medio de cultivo con B. megaterium B2 en un sistema sin aireación.

C/N [g/g]	pH 30 h	Promedio pH 30 h	Desv. Estándar
9.4	5.32	5.34	0.02
	5.35		
16.2	5.22	5.24	0.02
	5.25		
23.1	5.10	5.09	0.02
	5.07		
30	4.76	4.78	0.02
	4.79		
36.9	4.95	4.95	0.01
	4.94		