

Mejoramiento del medio de cultivo en la producción de Polihidroxiбутирато por fermentación de
Bacillus Megaterium B2 a partir de residuos del cacao

Leidy Paola Angarita Parra y Sandra Paola González Palencia

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniera Química

Director:

Luis Enrique Lambis Benítez

Ingeniero químico. Mag. Ingeniería química

Codirector:

Mabel Juliana Quintero Silva

Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingeniería Físicoquímicas
Escuela de Ingeniería Química
Bucaramanga

2023

Agradecimientos

Agradecer al profesor Luis Lambis y a la profesora Mabel Quintero por su constante acompañamiento y apoyo durante todo el proceso. Su guía y conocimiento han sido fundamentales para nuestro crecimiento académico.

Reconocer y agradecer a la ingeniera Silvia Suarez su valioso tiempo, colaboración y dedicación en cada una de nuestras actividades, por toda la ayuda que nos brindó y la oportunidad de adquirir experiencias invaluable.

A la Universidad Industrial de Santander, a Guatiguará y al Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM) por brindarnos esta maravillosa oportunidad de aprendizaje y por permitirnos hacer uso de sus instalaciones.

- Leidy Angarita y Sandra González

Dedicatoria

A mis papás Wilson y Esperanza, quienes han sido mis pilares, mis guías y mis ejemplos a seguir. Han estado presentes en cada paso que he dado, brindándome su amor, sabiduría y aliento.

A mi hermana Kathalina, que desde pequeñas hemos compartido risas, lágrimas, aventuras y cuya presencia ha sido una fuente constante de alegría.

A Daniel, mi primo y casi un hermano para mí, por estar siempre dispuesto a tenderme una mano y ser una parte tan importante de mi vida.

A toda mi familia, quiero expresar mi gratitud por sus palabras de amor y apoyo. Su confianza en mí me ha impulsado a dar lo mejor en cada desafío.

A mis amigos quienes han llenado mi vida de momentos felices y risas que siempre recordaré. En especial, quiero agradecer a Kelly y Lynnette por esta amistad tan valiosa, que trasciende las distancias y el tiempo. Su apoyo y compañía han sido un regalo inmenso en mi vida.

a Sandra con quién no solo compartí este arduo trabajo de investigación, sino también grandes momentos de amistad. Su compromiso, dedicación y amistad han sido un regalo que valoro profundamente.

- Leidy Angarita

Dedicatoria

A mis padres, Luz y Jaime agradezco profundamente el amor incondicional, el apoyo que me han brindado y los sacrificios que han hecho para hacer posible mi educación. Gracias por enseñarme a afrontar las dificultades sin perder nunca la cabeza ni morir en el intento. Su confianza en mí, su constante aliento y su fe en mis habilidades me han dado la motivación de superar cada obstáculo. Este logro es también de ustedes.

A mis hermanos y cuñadas, por brindarme su apoyo desde la distancia y siempre creer y confiar en mí.

A mi sobrino, Máximo quien es mi motivación, inspiración y felicidad.

A mis primos, abuelos y tíos a quienes quiero y me brindaron momentos de gran ayuda a lo largo de mi carrera universitaria. Gracias por los momentos de diversión.

A Mariana y Mariano por llenarme de mucho amor y de muchos pelos de gato cada vez que voy a visitarlos, los amo mucho.

A mis amigos, gracias por su apoyo incondicional, palabras de aliento y por estar a mi lado en los momentos difíciles. Su compañía ha hecho que este camino sea más significativo y ameno.

A mi compañera de tesis, Leidy, juntas hemos recorrido este camino académico superando obstáculos y compartiendo logros. Tu dedicación, colaboración, paciencia y perseverancia han sido fundamentales para alcanzar este éxito. Gracias por ser mi compañera en esta travesía.

A Frank, gracias por tu incondicional y silencioso apoyo. Por tu comprensión, paciencia y motivación. Por estar allí en los momentos difíciles. Gracias por hacer más agradable mi estadía aquí.

- Sandra González

Tabla de contenido

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducción | 10 |
| 2. Objetivos | 12 |
| 2.1 Objetivo general | 12 |
| 2.2 Objetivos específicos | 12 |
| 3. Estado del arte..... | 13 |
| 3.1 Generalidades del cacao..... | 13 |
| 3.2 Generalidades de <i>Bacillus megaterium</i> B2 | 14 |
| 3.3 Generalidades del polihidroxitirato | 15 |
| 3.4 Alimentación Fedbatch..... | 21 |
| 4. Metodología | 25 |
| 4.1 Fase 1. Validación de la relación C/N presentada en la literatura en la producción de PHB. | 25 |
| 4.1.1 Actividad 1.1 Selección del medio de cultivo | 25 |
| 4.1.2 Actividad 1.2 Ensayo preliminar..... | 27 |
| 4.2 Fase 2. Diseño experimental para el mejoramiento de la producción de PHB..... | 31 |
| 4.2.1 Actividad 2.1 Definición del rango de la relación C/N para obtener la mejor producción de PHB | 31 |
| 4.2.2 Actividad 2.2 Desarrollo de los ensayos a partir del diseño experimental | 31 |
| 4.2.3 Actividad 2.3 Fijación de la relación C/N que favorece la producción de polihidroxitirato | 32 |
| 4.3 Fase 3. Cambio en la alimentación para la producción de PHB..... | 32 |
| 4.3.1 Actividad 3.1 Cultivo fed-Batch..... | 32 |
| 5. Análisis de resultados..... | 33 |
| 5.1 Fase 1. Comprobación de la relación C/N presentada en la literatura en la producción de PHB. | 33 |
| 5.1.1 Actividad 1.1 Selección del medio de cultivo | 33 |
| 5.1.2 Actividad 1.2 Ensayo preliminar..... | 34 |
| 5.2 Fase 2. Diseño experimental para el mejoramiento de la producción de PHB..... | 35 |
| 5.2.1 Actividad 2.1 Definición del rango de la relación C/N para obtener la mejor producción de PHB | 35 |
| 5.2.2 Actividad 2.2 Desarrollo de los ensayos a partir del diseño experimental | 35 |
| 5.2.3 Actividad 2.3 Fijación de la relación C/N que favorece la producción de polihidroxitirato | 38 |
| 5.3 Fase 3. Cambio en la alimentación para la producción de PHB..... | 41 |
| 5.3.1 Actividad 3.1 Cultivo fed-Batch..... | 41 |
| 6. Conclusiones | 45 |
| 7. Recomendaciones | 46 |
| 8. Referencias Bibliográficas..... | 47 |

Tabla de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Theobroma cacao L | 14 |
| Figura 2. Bacillus megaterium B2 | 14 |
| Figura 3. Estructura química del polihidroxiacetato | 16 |
| Figura 4. Publicaciones a través del tiempo en la producción de PHB | 17 |
| Figura 5. Publicaciones a través del tiempo en la producción de PHB en alimentación fed-batch | 22 |
| Figura 6. Fases metodológicas | 25 |
| Figura 7. Determinación de Biomasa..... | 28 |
| Figura 8. Consumo de sustrato..... | 29 |
| Figura 9. Extracción de PHB. | 30 |
| Figura 10. Formación de pellet en diferentes proporciones de mezcla | 33 |
| Figura 11. Curva de crecimiento de biomasa, producción de PHB y consumo de sustrato para la relación C/N 10..... | 34 |
| Figura 12. Curvas de crecimiento de biomasa, producción de PHB y consumo de sustrato para las relaciones C/N evaluadas..... | 36 |
| Figura 13. Tendencia de la formación de PHB variando la relación C/N..... | 39 |
| Figura 14. Curva de crecimiento de biomasa, producción de PHB y consumo de sustrato para la relación C/N 11.2064..... | 40 |
| Figura 15. Curva de crecimiento de biomasa, producción de PHB y consumo de sustrato para la relación C/N 11.2064 en alimentación fed-batch..... | 41 |

Lista de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Producción de PHB usando como fuente de carbono residuos agroindustriales..... | 18 |
| Tabla 2. Caracterización química de los residuos provenientes del cacao..... | 21 |
| Tabla 3. Producción de PHB usando alimentación Batch y Fedbatch..... | 23 |
| Tabla 4. Proporciones para el medio de cultivo. | 26 |
| Tabla 5. Medio nutritivo. | 27 |
| Tabla 6. Medio de sales..... | 27 |
| Tabla 7. Diseño experimental propuesto..... | 31 |
| Tabla 8. Parámetros de las relaciones C/N evaluadas | 38 |
| Tabla 9. Resultados en alimentación fed-batch para la producción de PHB a partir de revisión bibliográfica | 43 |
| Tabla 10. Parámetros batch y fed-batch..... | 43 |

Tabla de Apéndices

| | |
|---|----|
| Apéndice A. Composición de los elementos traza presentes en el medio de sales | 52 |
| Apéndice B. Líquido residual del proceso de celulosa bacteriana | 52 |
| Apéndice C. Mucílago. | 52 |
| Apéndice D. Medio nutritivo. | 53 |
| Apéndice E. Medio de sales | 53 |
| Apéndice F. Pre-inóculo del microorganismo..... | 54 |
| Apéndice G. Inóculo. | 54 |
| Apéndice H. proceso de fermentación | 55 |
| Apéndice I. Reactor de tanque agitado. | 55 |
| Apéndice J. Pellet formado durante el proceso de fermentación. | 56 |
| Apéndice K. PHB producido por bacillus megaterium B2 a partir de residuos líquidos del cacao. | 56 |

Resumen

Título: Mejoramiento del medio de cultivo en la producción de polihidroxibutirato por fermentación de *Bacillus Megaterium* B2 a partir de residuos del cacao. *

Autores: Leidy Paola Angarita Parra; Sandra Paola González Palencia.**

Palabras Clave: *Polihidroxibutirato, Bacillus megaterium B2, residuos líquidos de cacao, bioproceso, relación C/N.*

Descripción

En este trabajo de investigación se validan las condiciones nutricionales para la producción de polihidroxibutirato (PHB) en un medio de cultivo con una proporción de mezcla de fuente de carbono a partir de residuos líquidos del cacao (17% mucilago y 17% residuos de celulosa bacteriana), esto con el fin de evaluar la influencia que tiene la relación carbono-nitrógeno (C/N) en la producción del biopolímero, utilizando *Bacillus megaterium* B2 como microorganismo. Para evaluar esta influencia se desarrolló un diseño experimental variando la relación C/N llevando a cabo fermentaciones batch en un reactor de tanque agitado con un volumen de trabajo de 4L, temperatura de 34 °C, pH de 7, suministro de aire de 1 L/min y agitación entre 200 a 500 rpm. A partir de un modelamiento matemático se estimó el punto óptimo y al validarlo se obtuvo como máxima concentración de PHB el valor de 3.038 g/L, % de recuperación del 49.51% y PHB acumulado de 24.3967 g/L a lo largo del bioproceso (34 horas). Una vez determinado el punto óptimo se cambia de alimentación a fed-batch obteniendo como concentración máxima de PHB 2.9137 g/L, % de recuperación del 33.40% y PHB acumulado de 38.1447 g/L en 52 horas. Con este resultado se incrementa la producción de PHB acumulado en un 156%.

*Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química; Director y Codirector: Mag. Luis Enrique Lambis

Benitez, M.Sc. Mabel Juliana Quintero Silva

Abstract

Title: Improvement of the culture medium in the production of polyhydroxybutyrate by fermentation of *Bacillus Megaterium* B2 from cocoa wastes.*

Authors: Leidy Paola Angarita Parra ; Sandra Paola González Palencia.**

Keywords: *polyhydroxybutyrate, Bacillus megaterium B2, liquid cocoa wastes, bioprocesses, ratio C/N.*

Description:

This research work validates the nutritional conditions for the production of polyhydroxybutyrate (PHB) in a culture medium with a proportion of carbon source mixture from cocoa liquid residues (17% mucilage and 17% bacterial cellulose residues), in order to evaluate the influence of the carbon-to-nitrogen ratio (C/N) in the production of the biopolymer, using *Bacillus megaterium* B2 as microorganism. To evaluate this influence, an experimental design was developed by varying the C/N ratio and carrying out batch fermentations in a stirred tank reactor with a working volume of 4 L, temperature of 34 °C, pH of 7, air supply of 1 L/min and agitation between 200 to 500 rpm. Based on mathematical modeling, the optimum point was estimated and when validated, the maximum PHB concentration was 3.038 g/L, % recovery of 49.51% and accumulated PHB of 24.3967 g/L throughout the bioprocess (34 hours). Once the optimum point was determined, the feed was changed to fed-batch, obtaining a maximum PHB concentration of 2.9137 g/L, % recovery of 33.40% and accumulated PHB of 38.1447 g/L in 52 hours. With this result, the accumulated PHB production is increased by 156%.

* Research Project.

** School of Physical-Chemical Engineering, School of Chemical Engineering; Director and Co-Director: Mag. Luis Enrique Lambis Benitez, M.Sc. Mabel Juliana Quintero Silva

1. Introducción

La producción mundial de cacao es de gran importancia para el comercio y progreso social debido a que contribuye en la economía nacional de la mayoría de los países subdesarrollados (Quintero R & Díaz Morales, 2004). Entre los principales países productores de cacao se encuentran Costa de Marfil (38,2%), Ghana (13,2%), Indonesia (12,8%), Nigeria (5,9%) y Ecuador (5,7%). Ocupando Colombia el puesto 11 con una participación del 1,1% (Axayacatl, 2020).

En Colombia existen alrededor de 65 mil familias productoras de cacao, y en varias de ellas, este cultivo ha sido utilizado como alternativa rentable para su manutención. Según FEDECACAO el año 2021 ha sido el de mayor producción y el año 2022 ha sido el de mayor exportación de cacao en la historia de Colombia (FEDECACAO, 2022, 2023), siendo el departamento de Santander el principal productor de cacao a nivel nacional (Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales, 2021).

Durante el proceso de transformación del grano de cacao, solo el 10% del fruto es utilizado, generando grandes cantidades de residuos orgánicos que ocasionan problemas ambientales (Rojas González, 2019; Nieto & Lahoz, 2022). Según su composición fisicoquímica estos residuos son ricos en fibras, antioxidantes y azúcares (Bernal, 2021; Gamboa Suarez, 2019) además, son de bajo costo, abundantes y poseen una alta disponibilidad; una de las mayores ventajas es que estos residuos se pueden convertir en materias primas no convencionales para generar productos de mayor valor agregado como los biopolímeros y de esta manera ser tratados hasta reducir su impacto negativo (Peñaranda et al., 2017)

La producción anual de plásticos en Colombia es aproximadamente de 1,2 millones de toneladas con un crecimiento del 22,2% con respecto al 2020 (Gutierrez Nuñez, 2021). Su lento

deterioro es responsable de la reducción de biodiversidad del ecosistema marino afectando a más de 530 especies, además, aproximadamente el 50% de los plásticos desechados después de su primer uso son los encargados de la formación de islas de basura (Roll'eat, 2022; The Nature Conservancy, 2021); por consiguiente, los bioplásticos pueden ser una alternativa más amigable con el ambiente reduciendo el impacto generado por el uso de plásticos de origen petroquímico destacando los polihidroxicanoatos (Chen, 2009). Dentro de esta familia resalta el polihidroxi-butarato (PHB), un biopolímero biodegradable, biocompatible y de origen renovable que ha cobrado gran importancia en el ámbito industrial, esto se debe a sus propiedades fisicoquímicas siendo considerado como posible sustituto de los plásticos convencionales en especial del polipropileno (Sudesh et al., 2000). Gracias a sus propiedades termoplásticas presenta muchas aplicaciones; entre las que se destacan las áreas de biomedicina, agricultura, productos desechables para la limpieza e higiene y empaquetado de productos (Lizcano Gonzalez, 2018).

El centro de estudios e investigaciones ambientales (CEIAM) de la Universidad Industrial de Santander, se ha caracterizado por el desarrollo de proyectos que involucran el aprovechamiento de residuos agroindustriales del cacao para la producción de PHB. La más reciente investigación buscó ajustar las condiciones nutricionales del medio del cultivo del microorganismo *Bacillus megaterium* B2 para la producción de este biopolímero (Mesa Beltran & Romero Isaza, 2021), en ese trabajo se identificó que aún existe potencial de mejoramiento del desempeño de producción de PHB.

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo de investigación busca aumentar el rendimiento de polihidroxi-butarato variando las condiciones nutricionales de carbono y nitrógeno, además, cambiar el sistema de alimentación a semicontinuo con el fin de obtener una mayor producción de PHB.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar las condiciones nutricionales que mejoran el desempeño de *Bacillus megaterium* B2 en el proceso de producción de PHB a partir de residuos agroindustriales del cacao como fuente de carbono.

2.2 Objetivos específicos

Evaluar la influencia de la relación carbono-nitrógeno (C/N) en la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 usando residuos líquidos de la industrial cacaotera como fuente de carbono, mediante un diseño experimental.

Determinar la relación C/N que maximiza la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2, cuando se varia la fuente de nitrógeno.

Estudiar el efecto de la alimentación semicontinua en la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2.

3. Estado del arte

3.1 Generalidades del cacao

El árbol de cacao o cacaotero recibe el nombre científico de *Theobroma cacao L.* Es un cultivo comercial con una plantación mundial de 8.2 millones de hectáreas con más de 58 países productores siendo los principales los países situados en los trópicos. En América latina, el cultivo de cacao estimula el crecimiento territorial y fomenta el desarrollo de la economía del sector agrícola (Arvelo et al., 2017). En Colombia, según FEDECACAO el año 2022 se produjeron 62158 toneladas y exportando 22231 toneladas para ese año (FEDECACAO, 2023). Siendo el departamento de Santander el principal productor a nivel nacional con un 41% del total de la producción.

El cacao, llamado comúnmente mazorca, se compone de una gruesa cáscara que contiene en su interior un diverso número de semillas ordenadas en filas rodeadas de una pulpa blanca viscosa rica en azúcares. (Braudeau, 1970). Durante el proceso de transformación del grano de cacao, solo el 10% de este fruto es utilizado, generando grandes cantidades de residuos orgánicos, aproximadamente 55942 toneladas para el 2021; causando problemas ambientales cómo las emisiones de gases de efecto invernadero, efluentes de lixiviados y enfermedades a partir de vectores como los mosquitos (Rojas González, 2019).

Figura 1.

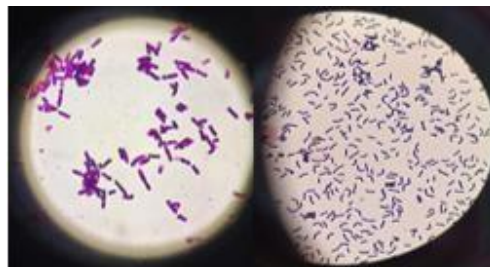
Theobroma cacao L.



Entre los residuos de la industria cacaotera se encuentra el mucílago, una pulpa blanca que rodea las semillas del cacao, parte de este es usado para la producción de alcohol en la fermentación de las semillas, mientras el resto se pierde durante el proceso de transformación del grano por desbabe natural y es desechado sin tratamiento previo (Hernández & Rojas, 2011). Esta pulpa posee sustancias de valor nutricional como la glucosa, fructosa, sacarosa, fibra, proteínas, ácidos acético y cítrico (Duran Riveros & Cabezas Calderon, 2019; Mesa Beltran & Romero Isaza, 2021).

3.2 Generalidades de *Bacillus megaterium* B2**Figura 2.**

Bacillus megaterium B2



Bacillus megaterium B2 se caracteriza por tener forma de bastón, es una de las bacterias más grandes ocupando 100 veces el volumen de *Escherichia coli* (Banacore, 2014; Tortoló & Bell,

2015). Hace parte de las bacterias grampositivas más conocidas en la actualidad, es una bacteria aerobia considerada interesante en la industria por tener un rápido crecimiento en sustratos económicos como son los residuos agroindustriales, tolerar altas temperaturas, mayor estabilidad genética, elevada producción, poseer un menor número de restricciones en condiciones de fermentación. (Moreno et al., 2015; Naranjo et al., 2013). Además de tener como característica principal el no poseer lipopolisacáridos en su membrana, es decir, no presentan endotoxinas pirógenas en su membrana exterior que causan reacciones inmunológicas en el ser humano (Astudillo Fajardo & Olmedo Garcia, 2021).

3.3 Generalidades del polihidroxiбутirato

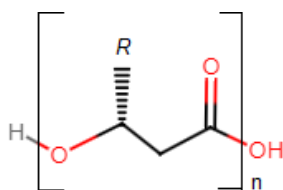
El consumo de plásticos en el mundo ha incrementado cuatro veces su producción en los últimos 30 años alcanzando casi 2000 millones de toneladas, el 22% de estos plásticos son desechados presentando problemáticas ambientales en cuerpos de agua y suelos al no ser biodegradables. También se generan impactos debido a que su materia prima es el petróleo que es una fuente no renovable, adicional a esto en su proceso de producción hay altos consumos de energía y emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera.(OCDE, 2022) En respuesta a los problemas causados por los materiales de origen petroquímico, se han investigado materiales alternativos que poseen propiedades similares como los bioplásticos entre los que destacan los polihidroxiácidoalcanoatos (PHAs) obteniéndose por medio de fermentación bacteriana a partir de sustratos definidos y produciendo polímeros de forma intracelular o extracelular.(Abdelrahman et al., 2022; Naranjo Vasco, 2010)

Dentro de la familia de PHAs se encuentra el poli-3-hidroxiбутirato (PHB) como se puede observar en la figura 1 dónde se presenta su estructura. Es un biopolímero que ha cobrado importancia debido a sus propiedades fisicoquímicas y ha sido considerado como sustituto de

plásticos de origen petroquímico como el polietileno y polipropileno. Es un termoplástico altamente cristalino y frágil, con un punto de fusión de 180 °C, usado en un amplio rango de temperaturas que va desde los -30°C a los 120°C, no es tóxico, tiene una barrera de permeabilidad al agua y gas, es estable a la radiación ultravioleta y puede ser procesado por extrusión, inyección, soplado y termoformado. El polihidroxibutirato es utilizado en diferentes industrias como biomedicina, agricultura, empaquetado y productos desechables para la limpieza e higiene. (Astudillo Fajardo & Olmedo Garcia, 2021; Lizcano Gonzalez, 2018).

Figura 3.

Estructura química del polihidroxibutirato.



| n | R | Nombre del polímero | Símbolo |
|-----|-----------|---------------------------|---------|
| 1 | Hidrógeno | Poli(3-hidroxipropionato) | PHP |
| | Metil | Poli(3-hidroxibutirato) | P3HB |
| 2 | Hidrógeno | Poli(4-hidroxibutirato) | P4HB |
| 3 | Hidrógeno | Poli(5-hidroxivalerato) | P5HV |

Nota. Adaptado de (Mesa Beltran & Romero Isaza, 2021) p.17

Los costos de producción de estos biopolímeros dependen de (Naranjo et al., 2013):

- La materia prima, ya que se utilizan sustratos como glucosa, fructosa o sacarosa
- El microorganismo, puesto que de él depende el rendimiento y la conversión de sustrato a producto
- El tipo de fermentación, donde se añaden factores que poseen alto consumo energético como es la aireación, el control de temperatura y de pH
- La extracción y purificación del producto.

Para ser viable y competitivo no sólo desde el punto de vista ambiental sino económico, la producción de PHB recurre al aprovechamiento de residuos agroindustriales como la melaza de

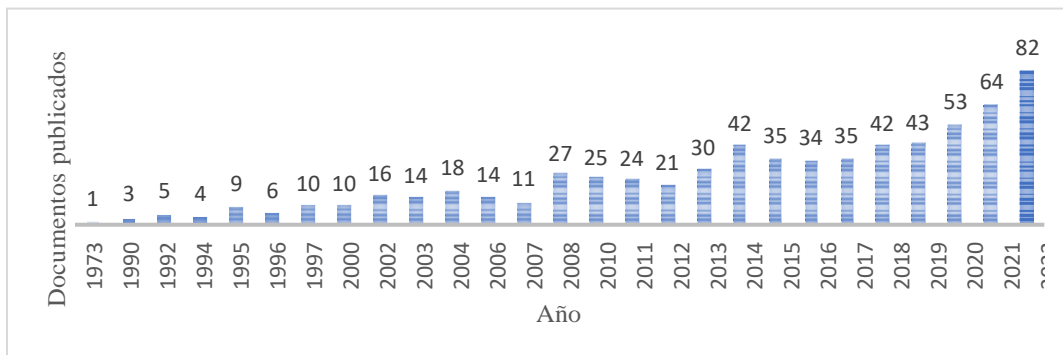
caña de azúcar, el glicerol residual y el mucílago proveniente del cacao debido a su bajo o nulo costo (Suarez Rodriguez, 2019).

Los primeros estudios de producción de PHB a partir de residuos agroindustriales datan de los años 1973 y 1974 (Wallen, 1973; Wallen & Rohwedder, 1974) donde a partir de una planta de procesamiento de cereales se obtuvo este nuevo polímero microbiano presente en lodos activados. A través del tiempo ha surgido un gran interés progresivo en este biopolímero, utilizando como fuente de carbono diversos residuos reflejándose en las publicaciones reportadas.

La herramienta Scopus en su base de datos presenta el número de publicaciones por año relacionadas con la producción de PHB por residuos agroindustriales entre 1973 hasta la actualidad.

Figura 4.

Publicaciones a través del tiempo en la producción de PHB.



Nota. Adaptado de la base de datos de Scopus

En la Figura 4 se observa el mayor porcentaje de publicaciones en los últimos 9 años demostrando que este tema sigue llamando la atención para ser el mejor sucesor de los plásticos convencionales.

Una vez se determinó que los residuos agroindustriales funcionan como fuente de carbono para la producción de PHB, artículos en diferentes partes del mundo han evaluado el posible mejoramiento en la concentración de polihidroxibutirato a partir de variables como las condiciones nutricionales, el suministro de oxígeno, el tiempo de fermentación, entre otras. En la tabla 1 se presentan diversas publicaciones de producción de PHB usando como fuente de carbono residuos agroindustriales en microorganismos grampositivos y gramnegativos.

Tabla 1.

Producción de PHB usando como fuente de carbono residuos agroindustriales.

| Microorganismo | Sustrato | PHB (g/L) | País | Referencia |
|---|-----------------------------------|-----------|----------|--|
| <i>Bacillus wiedmannii</i> AS-02 OKA576278(+) | Residuos de cascara de naranja | 0,423 | Egipto | (Danial et al., 2021) |
| <i>Bacillus subtilis</i> (+) | Residuos sólidos del pescado | 3,09 | India | (Mohapatra et al., 2017) |
| <i>Cupriavidus necator</i> H16 (-) | Hojas de banano | 1,3 | Malasia | (Low et al., 2021) |
| <i>Bacillus megaterium</i> (+) | Glicerol residual | 1,324 | Ecuador | (Astudillo Fajardo & Olmedo Garcia, 2021) |
| <i>Azotobacter</i> <i>chroococcum</i> (-) | Vinaza | 1,97 | Perú | (Malqui Saavedra, 2018) |
| <i>Bacillus megaterium</i> (+) | Glicerol residual | 4,8 | Colombia | (Campuzano, 2015) |

Nota. En la tabla se muestran estudios usando residuos agroindustriales para la producción de PHB a partir de diferentes microorganismos. (+) son los microorganismos correspondientes al grupo grampositivo y (-) aquellos del grupo gramnegativo.

Danial et al., 2021 seleccionó entre diferentes cepas de *bacillus wiedmannii* la mayor acumuladora de PHB y determinó las condiciones nutricionales para producir la mayor concentración de este. Obteniendo como variables óptimas un pH de 7, temperatura a 35°C y periodo de incubación de 72 horas (Danial et al., 2021).

India por su parte evaluó la producción de PHB limitando la concentración de fuente de nitrógeno, puesto que el exceso de este genera subproductos que reducen la acumulación de polihidroxibutirato. Se demostró que *bacillus subtilis* tiene la capacidad de crecer en sustratos económicos (Mohapatra et al., 2017).

Low et al., 2021 demostró el efecto de la concentración de hojas de banano (del 10% al 50%) en la producción de PHB donde el 40% presentó la mayor concentración, a su vez se comparó el resultado de la fermentación entre un sustrato crudo y pretratado indicando que se generó mayor producción en la materia prima pretratada (Low et al., 2021).

En Ecuador para la producción de PHB (Astudillo Fajardo & Olmedo Garcia, 2021), modificaron el proceso de extracción y purificación de polihidroxibutirato logrando obtener un porcentaje de recuperación del 98% al 99% usando como fuente de carbono glicerol residual resultado de la transesterificación del aceite de palma.

En Perú a partir de concentraciones de 25% y 50% de un mismo sustrato se realizó el proceso de fermentación con *Azotobacter chroococcum* para obtener PHB, determinando que el medio con la concentración del 50% de sustrato generó mayor producción de polihidroxibutirato, sin embargo, la concentración de 25% de vinaza tuvo mayor porcentaje de acumulación (Malqui Saavedra, 2018).

Colombia en 2015 presentó 3 alternativas de fuente de carbono para la producción de PHB, obteniendo la mayor concentración con glicerol, sin embargo, se obtuvo el mayor porcentaje de acumulación con lactosa, donde se confirmó que para lograr los mejores rendimientos es necesario controlar el pH y la aireación (Campuzano, 2015).

Adicional a esto, en Colombia en el año 2015 en la universidad Industrial de Santander, el grupo CEIAM aisló la cepa *Bacillus megaterium* B2; esta fue capaz de producir PHB a partir de glicerol a temperatura de 37°C y pH de 7 (Moreno et al., 2015). En posteriores investigaciones, se adaptó esta cepa a nuevas condiciones nutricionales como un medio de cultivo basado en oligoelementos y una relación carbono-nitrógeno de 10, obteniendo una concentración de 1.6 g/L (Lizcano Gonzalez, 2018).

Más adelante, se cambió la fuente de carbono por residuos líquidos del cacao que corresponden al mucílago lixiviado y a los residuos provenientes del proceso de producción de celulosa. Este mucílago posee sustancias de valor nutricional como la glucosa, fructosa, sacarosa, fibra, proteínas, ácidos acético y cítrico (Duran Riveros & Cabezas Calderon, 2019; Mesa Beltran & Romero Isaza, 2021) por lo que el CEIAM, desarrolló investigaciones en el año 2019 para la producción de celulosa por fermentación con *Gluconacetobacter xylinus*, utilizando como fuente de carbono mucílago, cuando finaliza el proceso de fermentación se realiza un proceso de limpieza y el líquido residual es desechado (Duran Riveros & Cabezas Calderon, 2019), sin embargo este desecho aun presenta altas concentraciones de fibras, glucosa, fructosa, grasas, ácidos orgánicos, proteínas y algunos minerales esenciales. Por esta razón este líquido residual de la producción de celulosa se consideró como materia prima para un subsecuente bioproceso. (Gamboa Suarez, 2019; Rojas González, 2019). Adicional al cambio en la fuente de carbono, se realizó un ajuste en la temperatura a 34°C obteniendo una concentración de 4 g/L de polihidroxibutirato. (Suarez Rodriguez, 2019). En la tabla 2 se refleja la caracterización de las sustancias que presenta el mucílago y los residuos líquidos de celulosa bacteriana en concentraciones adecuadas para el desempeño metabólico microbiano.

Tabla 2.*Caracterización química de los residuos provenientes del cacao.*

| | Mucilago [g/L] | Líquido residual del proceso de celulosa [g/L] |
|---------------|---------------------------|---|
| Glucosa | 25,22 | 35,38 |
| Fructosa | 32,97 | 46,46 |
| Sacarosa | 9,96 | 4,6 |
| Ácido cítrico | 3,81 | - |
| Ácido láctico | - | 6,21 |
| Ácido acético | 5,13 | 3,69 |

Nota. Adaptado de (Suarez Rodríguez, 2019) p.34

Realizado el proceso de adaptación del microorganismo a la nueva fuente de carbono; se establecieron las condiciones nutricionales, demostrando que la concentración de oligoelementos no corresponde a una variable significativa mientras que la concentración de polihidroxibutirato se ve afectada por la relación carbono-nitrógeno; Mesa & Beltrán demostraron que a partir de una relación carbono-nitrógeno mayor a 15 la concentración de PHB se ve afectada negativamente y se presenta una región entre las relaciones de 5 a 15 con un posible punto máximo, por tal razón se continua con una concentración de sales estándar, existiendo condiciones de mejoramiento (relación carbono-nitrógeno, método de alimentación) para aumentar el desempeño de producción de PHB.

3.4 Alimentación Fedbatch

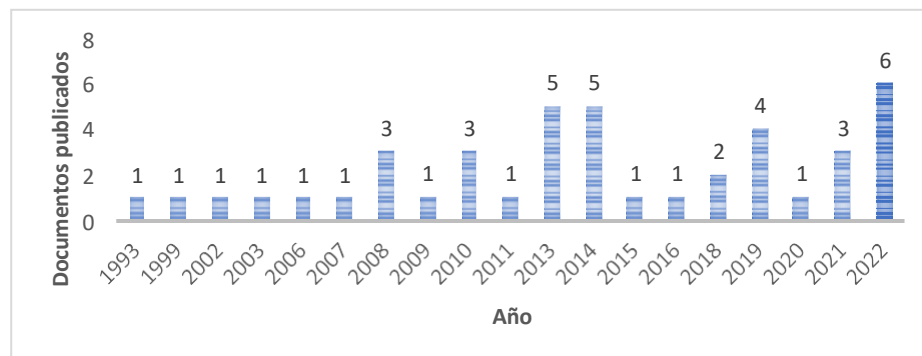
El cultivo en Fedbatch es una mejora del proceso batch, es el modo de operación más usada en la industria, en este tipo de fermentación los microorganismos son inoculados y crecen bajo un régimen batch por cierta cantidad de tiempo, para luego ser alimentados durante el proceso de

fermentación con el fin de aumentar el crecimiento celular (Ochoa, 2019). Una de sus ventajas es que permite el escalamiento del proceso a un nivel industrial y reduce la formación de metabolitos secundarios debido al exceso de sustrato, su principal desventaja es que requiere equipo adicional para su control o se debe determinar con anterioridad su flujo de alimentación (Macauley-Patrick & Finn, 2008).

Este modo de alimentación en la producción de PHB a partir de residuos agroindustriales es un tema tratado en los últimos 30 años según la base de datos Scopus, su primera publicación data del año 1993 donde usando peptona de pescado como fuente de carbono se obtiene un mejor resultado de concentración de PHB comparado con el modo batch. (Page & Cornish, 1993).

Figura 5.

Publicaciones a través del tiempo en la producción de PHB en alimentación fed-batch.



Nota. Adaptado de la base de datos de Scopus

En la figura 5 se observan las publicaciones realizadas en la producción de polihidroxibutirato utilizando como fuente de carbono residuos agroindustriales, comparado con la figura 4, es posible notar que el modo de alimentación fed-batch es un tema desarrollado 20 años después y que hoy en día el número de publicaciones no alcanza el 7% de los artículos reportados en alimentación batch.

Si bien estos artículos son limitados, existe la información necesaria para demostrar que el cambio de alimentación de batch a fed-batch presenta una mejoría con respecto a la producción de PHB. En la tabla 3 se compara su producción en estos modos de cultivos, corroborando que este último presenta mejores resultados aumentando la concentración de polihidroxibutirato.

Tabla 3.

Producción de PHB usando alimentación Batch y Fedbatch.

| Microorganismo | Sustrato | Concentración de PHB en batch [g/L] | Concentración de PHB en fed batch [g/L] | Referencia |
|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>Bacillus megaterium SRKP-3</i> | Desechos lácteos | 6,37 | 11,32 | (RamKumar Pandian et al., 2010) |
| <i>Bacillus megaterium BA-019</i> | Melaza de caña* | 8.8 | 41.6 | (Kanjachumpol et al., 2013) |
| <i>Azotobacter vinelandii OPNA</i> | Sacarosa y extracto de levadura | 4 | 5,6 | (García et al., 2014) |
| <i>Bacillus megaterium LVNO1</i> | Glicerol residual | 0,92 | 1,96 | (Gómez-Cardozo et al., 2020) |
| <i>Bacillus megaterium B2</i> | Glicerol crudo | 1,20 | 2,06 | (Moreno Yañez, 2015) |

Nota. En la tabla 3 se presentan las concentraciones producidas de PHB por diferentes microorganismos en dos métodos de alimentación, *los datos presentados para *Bacillus megaterium BA-019* se dan en términos de acumulados

En la tabla anterior, las fermentaciones fedbatch se dieron en un tiempo mayor a 50 horas y con un volumen de trabajo entre 1 y 5 L. En cuanto al tipo de alimentación usada en la mayoría de las investigaciones fue por pulsos, sin embargo, en Colombia y Mexico se usó una alimentación exponencial obteniendo también un mayor resultado en términos de concentración de PHB (García et al., 2014; Moreno Yañez, 2015).

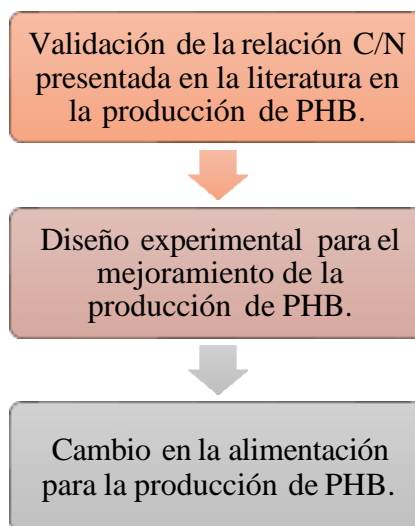
En la actualidad se desconocen resultados de cómo afecta el cambio de alimentación en la producción de polihidroxitirato usando como fuente de carbono residuos líquidos del cacao por lo tanto este trabajo de investigación busca a partir de la variación en las condiciones nutricionales, especialmente la relación carbono-nitrógeno, mejorar la concentración final de PHB aumentando el rendimiento de *Bacillus megaterium* B2, además de modificar el sistema de alimentación de Batch a Fedbatch para evaluar el efecto de éste en la producción del biopolímero.

4. Metodología

En la figura 6, se presenta la metodología empleada para el desarrollo de los objetivos propuestos en el trabajo de investigación.

Figura 6.

Fases metodológicas



4.1 Fase 1. Validación de la relación C/N presentada en la literatura en la producción de PHB.

En la primera fase de este trabajo de investigación se determinaron las condiciones nutricionales iniciales para la producción de polihidroxibutirato. Se seleccionó el medio de cultivo siendo esta la actividad fundamental de la metodología y se verificó en un ensayo preliminar con una relación C/N reportada por literatura.

4.1.1 Actividad 1.1 Selección del medio de cultivo

El objetivo de esta actividad fue determinar la mejor proporción de mezcla para el medio de cultivo. Teniendo en cuenta antecedentes de trabajos de generación de polihidroxibutirato a partir de *Bacillus megaterium* B2 (Suarez Rodriguez, 2019), se probaron diferentes proporciones de mezcla en función de dos variables: mucílago y residuos de celulosa bacteriana, identificando

como determinantes los medios de cultivo que presentan la mayor producción de PHB (ver tabla 4).

Tabla 4.

Proporciones para el medio de cultivo.

| Medio de Cultivo | Medio básico de sales * | Sustrato (% v/v) | |
|------------------|-------------------------|------------------|------------------------------------|
| | | Mucílago | Residuos celulosa bacteriana (RCB) |
| 1 | 66 | 17 | 17 |
| 2 | 33 | 33 | 33 |

Para la validación de estas proporciones se realizaron dos ensayos con la relación carbono-nitrógeno 10, su acondicionamiento consta de las siguientes etapas:

Pre-inóculo

Como primer paso, se activó el microorganismo en un medio nutritivo (ver tabla 5). Este medio inoculado se llevó a incubación a temperatura de 34°C, agitación de 200 rpm y un tiempo de crecimiento de 8 a 10 horas (Lizcano Gonzalez, 2018).

Inóculo

Posteriormente, se agregó el pre-inóculo en un medio de cultivo el cual contiene medio de sales (ver tabla 6) y la proporción de mezcla seleccionada. Se incubó a las mismas condiciones de temperatura y agitación por un tiempo determinado para garantizar el crecimiento y reproducción del microorganismo.

Para evaluar cualitativamente la mejor proporción de mezcla y evidenciar el crecimiento bacteriano se utilizó como variable de respuesta la formación de pellet.

Tabla 5.*Medio nutritivo.*

| Sustancia | Concentración (g/L) |
|----------------------|---------------------|
| Peptona | 15 |
| Extracto de levadura | 3 |
| Cloruro de sodio | 6 |
| Mucilago* | |

Nota *porcentaje dependiendo de acuerdo con la proporción elegida. Adaptado de (Naranjo et al., 2013).

Tabla 6.*Medio de sales.*

| Sustancia | Concentración (g/L) |
|-----------------------------|---------------------|
| Fosfato di ácido de potasio | 1,5 |
| Fosfato ácido de sodio | 3 |
| Sulfato de magnesio | 0,2 |
| Elementos traza* | 0,1 |
| Sulfato de amonio** | |

Nota. *La composición química de los elementos traza se encuentra en el apéndice A, Tabla A.1. **A partir de la relación C/N

4.1.2 Actividad 1.2 Ensayo preliminar

Una vez se determinó la proporción de mezcla adecuada, fue necesario corroborar la relación C/N de 10 presentada en la literatura como un buen punto para la obtención de PHB (Carrillo Martinez, 2017; Lizcano Gonzalez, 2018).

Es válido recordar que todas las preparaciones implican una etapa de pre-inóculación, inoculación y fermentación. Las dos primeras fueron presentadas en la actividad 1.1.

Fermentación Batch

Luego de 16 horas de incubación el inóculo se agregó a un biorreactor de 7.5 L de capacidad con un volumen de trabajo de 4L. Las condiciones de trabajo fueron: 34°C, pH de 7, suministro de aire de 1 L/min y agitación entre 200 a 500 rpm. Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras de 30 mL cada dos horas en un lapso de 34 horas. Estas muestras se tomaron de forma

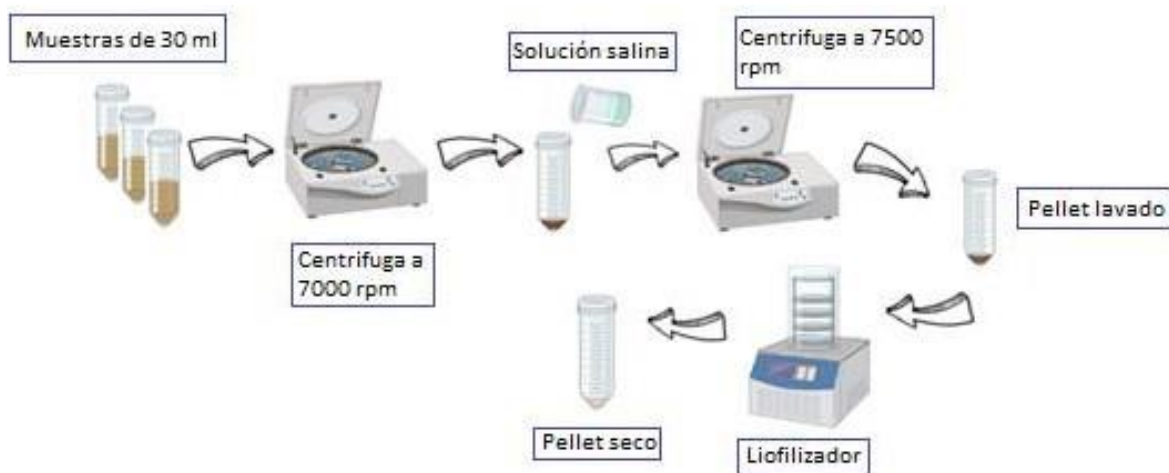
triplicada para luego ser analizadas y obtener datos de biomasa, consumo de sustrato y concentración de PHB (Moreno et al., 2015).

Actividad 1.2.1 Biomasa

Para obtener la curva de crecimiento microbiano fue necesario determinar la cantidad de biomasa formada a partir de la técnica de peso seco. Las muestras que se obtuvieron durante el proceso de fermentación se centrifugaron a 7000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se guardó en tubos falcón, esto con el fin de observar el consumo del sustrato. Al pellet depositado en los tubos falcón se le realizaron dos lavados cada uno a 7000 rpm por 10 minutos con solución salina de 8,5 g/L con el fin de eliminar restos celulares, luego el pellet ya lavado se liofilizó durante 24 horas para obtener el peso de la biomasa.

Figura 7.

Determinación de Biomasa.



Actividad 1.2.2 Consumo de sustrato

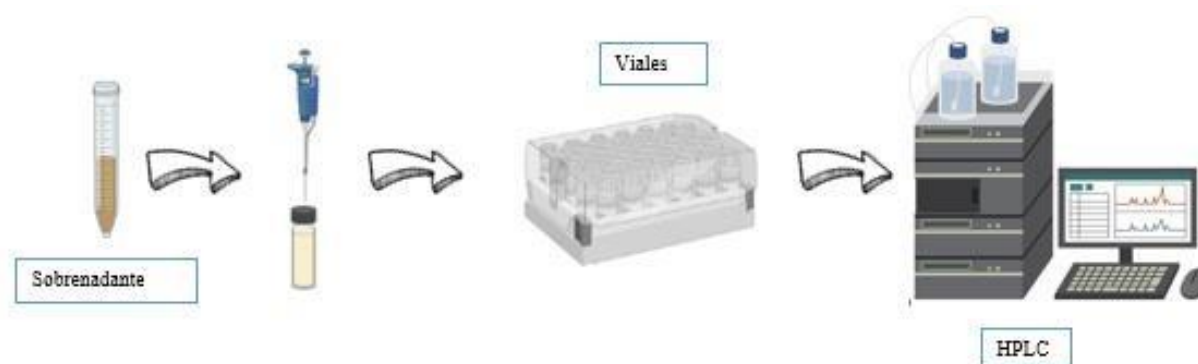
Se empleó la cromatografía líquida de alta eficacia en columna (HPLC) con el fin de caracterizar la cantidad de azúcares consumidos a lo largo del bioproceso. Se utilizó la columna Agilent Hi-plex Pb 300 x 7,7 mm, a un flujo de 0,6 mL/min, temperatura de la columna de 78°C y una inyección de 15 µL. La fase móvil consistió en agua tipo I, una vez estable el equipo se inyectaron las muestras y con ayuda de un detector RID se evidenciaron las sustancias de interés que componen la muestra, en este caso, sacarosa, fructosa y glucosa (Borowiak,n.d.).

Para la curva de calibración del equipo se preparó una solución madre de 5 g/L de azúcar (Sacarosa, Fructosa, Glucosa) realizando patrones de 1, 2, 3, 4, y 5 g/L, esto con el fin de determinar la concentración de las muestras a partir del área bajo la curva mostrada en el cromatograma obtenido. Para la preparación de la solución madre se utilizó agua tipo I.

Para la preparación de las muestras, se utilizó el sobrenadante obtenido de cada muestra tomada durante el proceso de fermentación. Se usó una proporción de 1:2 con fase móvil en las muestras presentes en la etapa de adaptación y al iniciar la etapa exponencial las muestras se enviaron concentradas. Luego de esto, la dilución se filtró y se agregó a viales para ser llevados al equipo. El tiempo de retención para el análisis de cada una de las muestras fue de 25 minutos.

Figura 8.

Consumo de sustrato.



Actividad 1.2.2 Extracción de PHB

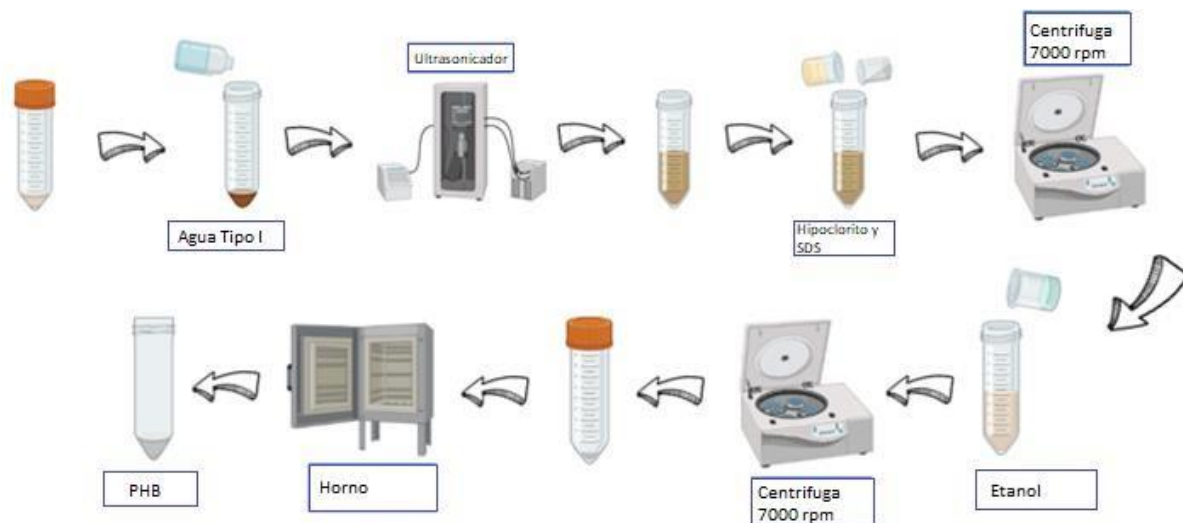
Para iniciar el proceso de extracción de PHB, al pellet seco obtenido de la cuantificación de la biomasa se le adicionó agua tipo I dependiendo del peso obtenido de biomasa (por cada 0,1 g de biomasa se requieren 10 mL de agua), esta mezcla se sometió a ultrasonificación para romper las células y liberar el PHB intracelular por alrededor de 5 minutos con un sistema de refrigeración para evitar un sobrecalentamiento.

Después de la ultrasonificación, se centrifugó cada muestra con hipoclorito de sodio al 10% y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,5% p/v a 7000 rpm y 15 minutos de manera que el PHB insoluble se logre concentrar en forma de pellet nuevamente. El sobrenadante se descartó y al pellet formado se le realizó dos o tres lavados de hipoclorito de sodio al 10% y por último un lavado con etanol en una proporción 7:1 (Uribe Ribero, 2022).

El pellet lavado se llevó a un horno a 50°C por 24 horas, luego de esto se tomó el peso del tubo. La diferencia de este con el tubo vacío es el peso del PHB obtenido.

Figura 9.

Extracción de PHB.



4.2 Fase 2. Diseño experimental para el mejoramiento de la producción de PHB.

En la segunda fase de este trabajo de investigación se determinó el punto óptimo de la relación C/N con el fin de obtener la máxima producción de PHB. Se establecieron los límites de la relación C/N y se desarrolló un diseño experimental de una variable.

4.2.1 Actividad 2.1 Definición del rango de la relación C/N para obtener la mejor producción de

PHB Para obtener la mejor producción de PHB se definió un rango de la relación carbono-nitrógeno basándose en reportes de otros autores que implementaron *Bacillus megaterium* como microorganismo productor de polihidroxibutirato.

4.2.2 Actividad 2.2 Desarrollo de los ensayos a partir del diseño experimental

Una vez se estableció el rango de la relación C/N, los puntos ubicados dentro de la relación mínima y máxima se separaron equiespacialmente obteniendo así el diseño experimental mostrado en la tabla 7.

Tabla 7.

Diseño experimental propuesto.

| # | Relación |
|---|----------|
| 1 | 5 |
| 2 | 6,25 |
| 3 | 7,5 |
| 4 | 8,75 |
| 5 | 10 |
| 6 | 11,25 |
| 7 | 12,5 |
| 8 | 13,75 |
| 9 | 15 |

Nota: El paso entre cada punto es de 1,25.

4.2.3 Actividad 2.3 Fijación de la relación C/N que favorece la producción de polihidroxibutirato.

Una vez se desarrolló el diseño experimental, se obtuvieron resultados de concentración máxima de PHB. A partir de esta variable se realizó un modelamiento matemático para predecir la tendencia de producción de PHB variando la relación C/N.

Actividad 2.3.1 Validación punto óptimo

Finalmente, con ayuda del modelo matemático se obtuvo el punto óptimo, es decir, la relación C/N en la que se alcanza la máxima producción de PHB. Para validar el resultado se realizó el ensayo de forma triplicada.

4.3 Fase 3. Cambio en la alimentación para la producción de PHB.

El propósito de esta fase fue cambiar la forma de alimentación de Batch a Fed-Batch. Estudios anteriores demostraron que la alimentación semicontinua presentó mayores concentraciones de PHB (ver tabla 3), por lo tanto, se buscó validar esta información a partir de la relación C/N óptima establecida.

4.3.1 Actividad 3.1 Cultivo fed-Batch

El proceso de fermentación partió de un cultivo batch hasta la hora 16, a partir de esta hora fueron suministrados 3 pulsos a lo largo del bioproceso. Los pulsos fueron preparados con fuente de carbono y fuente de nitrógeno correspondiente a la relación C/N óptima. El reactor inició con un volumen de trabajo de 3L y con el sistema de alimentación se llevó el volumen de trabajo a 4L. La cuantificación de biomasa, consumo de sustrato y extracción de PHB se realiza del mismo modo que en la actividad 1.2.

5.1 Fase 1. Comprobación de la relación C/N presentada en la literatura en la producción de PHB.

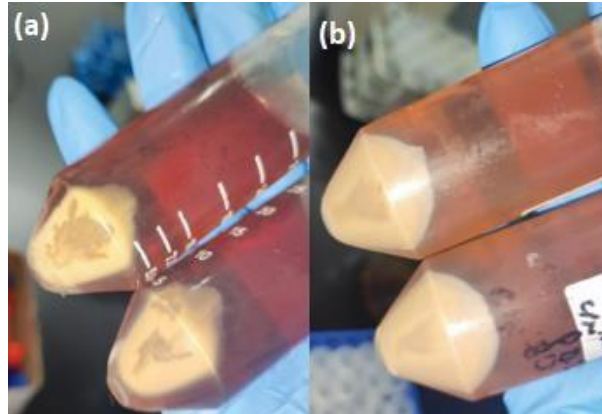
5.1.1 Actividad 1.1 Selección del medio de cultivo

Se examinó el crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 cualitativamente a partir de dos

proporciones de mezcla (17% y 33%). En la figura 7 se observa la formación de pellet para cada proporción de mezcla, donde se evidencia que en la proporción del 17% se da mayor crecimiento de biomasa, siendo este un parámetro determinante para la selección del medio de cultivo.

Figura 10.

Formación de pellet en diferentes proporciones de mezcla.



Nota. (a) proporción de mezcla del 33%, (b) proporción de mezcla del 17%

En la figura anterior se evidencia que la formación de pellet en la proporción de mezcla del 17% es mayor y presenta menor cantidad de restos celulares, es decir, el pellet posee mayor homogeneidad. Este ensayo se realizó por duplicado, manteniendo en cada replica los mismos resultados para cada proporción de mezcla.

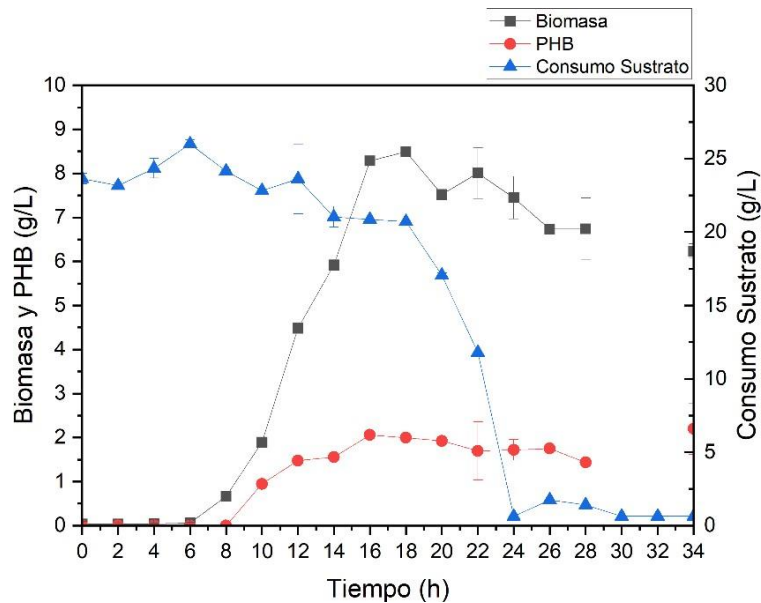
A partir de estos resultados se estableció que la proporción de mezcla a trabajar en los ensayos posteriores será la del 17%.

5.1.2 Actividad 1.2 Ensayo preliminar

En esta actividad se presentan los resultados obtenidos de concentración de biomasa y PHB junto al consumo de sustrato para la relación C/N de 10 en un lapso de 34 horas.

Figura 11.

Curva de crecimiento de biomasa, producción de PHB y consumo de sustrato para la relación C/N 10.



En la gráfica anterior, con respecto al crecimiento de biomasa, se observa una fase de latencia de aproximadamente 6 horas en donde el microorganismo empieza a adaptarse al medio, después de esto inicia su fase exponencial que tiene una duración de 10 horas, alcanzando su máxima concentración (8.5 g/L) en la hora 18 e inmediatamente comienza la fase estacionaria que se prolonga hasta finalizar el ensayo. El PHB inicia su producción a la misma hora en la que inicia la fase exponencial del microorganismo, sin embargo, logró su máxima concentración (2.20 g/L) y el máximo porcentaje de acumulación (35.3%) en la hora 34. En cuanto al consumo de sustrato, se evidencia como disminuye la concentración de azúcares al iniciar la fase estacionaria,

sugiriendo que *Bacillus megaterium* B2 empieza a consumir estos hasta agotar la fuente de carbono.

5.2 Fase 2. Diseño experimental para el mejoramiento de la producción de PHB.

5.2.1 Actividad 2.1 Definición del rango de la relación C/N para obtener la mejor producción de PHB

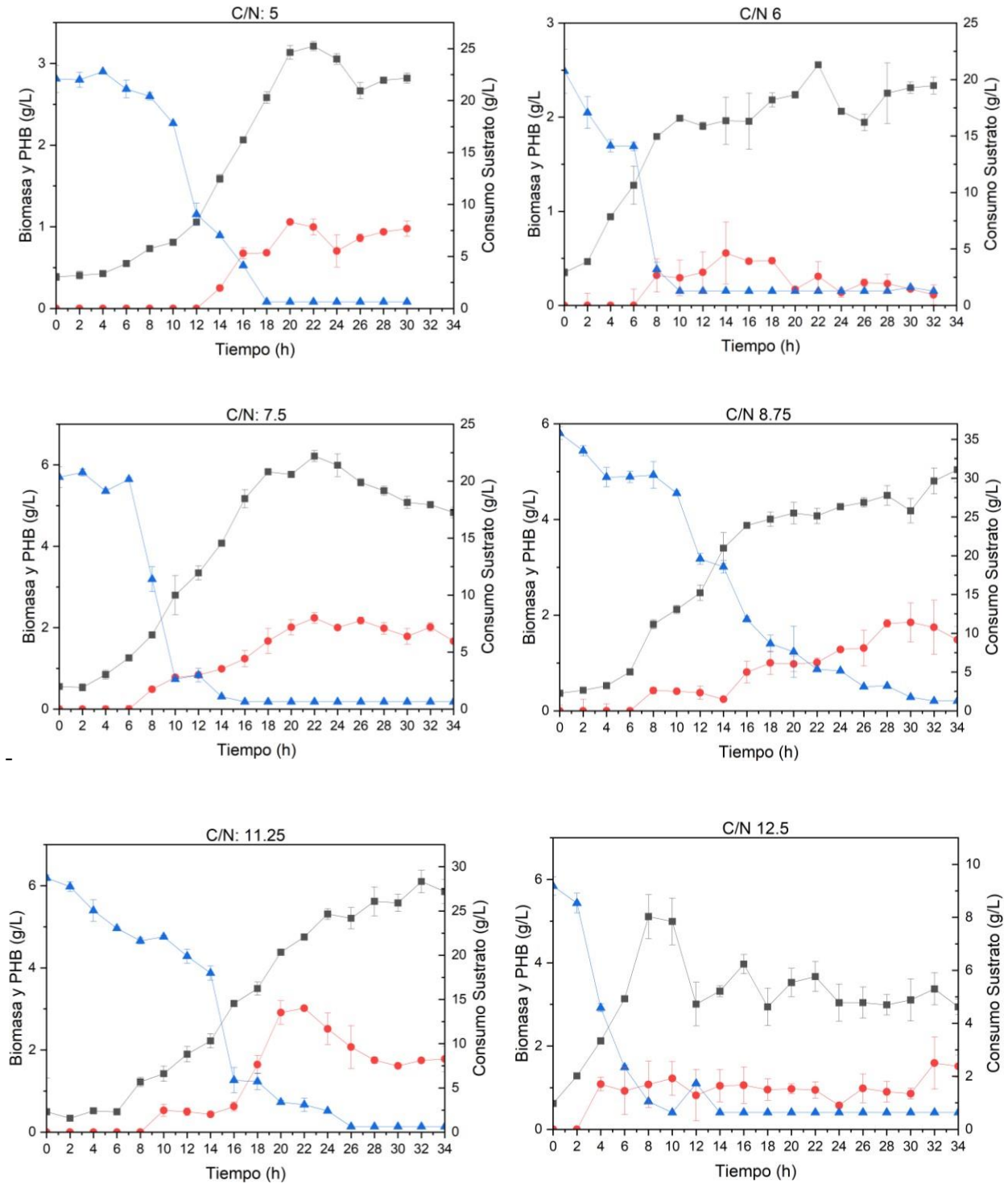
Estudios realizados por el CEIAM establecieron la relación mínima de C/N con un valor de 5 y la relación máxima de 25. Zhang et al., 2013 presentó en su artículo el efecto de la relación C/N en la producción de PHB, demostrando que por debajo de una relación C/N de 5 la concentración de PHB es mínima en comparación con relaciones C/N entre 5 y 15 (Zhang et al., 2013). Por otra parte, la influencia de la limitación de nitrógeno en la producción de polihidroxibutirato se reporta en artículos donde se comparan relaciones C/N entre 10 y 40 validando que la máxima concentración alcanzada de PHB fue registrada en la relación C/N de 10 y estableciendo como punto máximo la relación C/N de 25 ya que en este se observa limitaciones en el crecimiento del microorganismo por el agotamiento de la fuente de nitrógeno. Estudios realizados posteriormente indicaron que la relación en exceso pudo ser acotada a un valor de 15 (Mesa Beltran & Romero Isaza, 2021) ya que después de este valor la producción de PHB usando como fuente de carbono residuos provenientes del cacao reflejó valores insignificantes para ser tomados en cuenta en el diseño experimental.

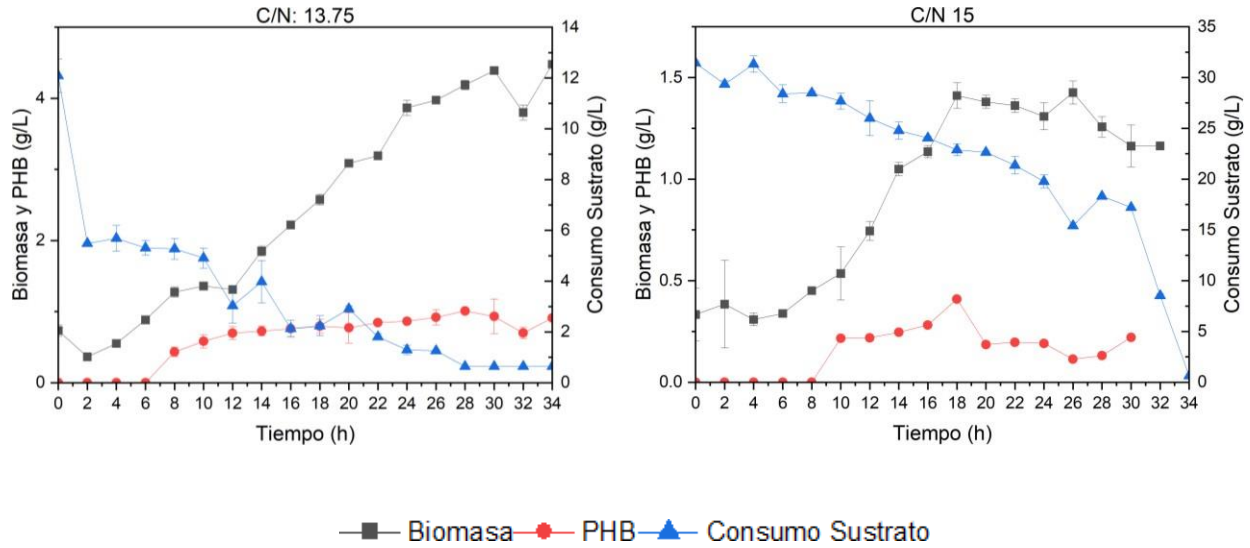
5.2.2 Actividad 2.2 Desarrollo de los ensayos a partir del diseño experimental

En la figura 15 se reportan los resultados de las curvas de crecimiento de biomasa, producción de PHB y consumo de sustrato para cada una de las relaciones C/N presentes en el diseño experimental.

Figura 12.

Curvas de crecimiento de biomasa, producción de PHB y consumo de sustrato para las relaciones C/N evaluadas.





Las relaciones C/N presentes en el diseño experimental presentan una fase de latencia corta (menor a 6 horas), debido a que las condiciones en que fue inoculado el microorganismo se mantienen a su vez en el proceso de fermentación.

Se puede evidenciar que las relaciones C/N de 5 y 15 presentan la menor formación de biomasa, PHB y producto acumulado, validando que los límites fueron establecidos correctamente, sin embargo, se analiza que en 6.25 y 13.75 las concentraciones de PHB y PHB acumulado también son bajas en comparación al resto de relaciones, por lo tanto, se pueden considerar estos puntos como un nuevo rango en la obtención de PHB a partir de residuos líquidos del cacao.

El tiempo de formación de PHB en la mayoría de las relaciones C/N se da en promedio a las 9 horas de iniciar el proceso, exceptuando las relaciones de 5 y 12.5 que inician su formación a la hora 14 y 4 respectivamente.

En la mayoría de los ensayos se cumple la correlación entre el consumo de sustrato y crecimiento de biomasa, es decir, una vez inicia la fase exponencial, la pendiente del consumo de sustrato incrementa, y al finalizar esta fase se evidencia que el microorganismo consumió en

totalidad la fuente de carbono. Además, entre el comportamiento de formación de biomasa y producción de PHB se cumple la cinética de metabolito primario, estos metabolitos se generan justo cuando inicia la fase exponencial del microorganismo.

En la tabla 8 se resumen los máximos valores de concentración de biomasa, PHB, el porcentaje de recuperación y el PHB acumulado para cada relación C/N

La relación C/N de 10 presentó la mayor concentración de biomasa en la hora 18 con un valor de 8.49 g/L, por otra parte, la máxima concentración de PHB fue de 3.02 g/L en la relación C/N de 11.25 a las 22 horas y el mayor porcentaje de recuperación fue del 63.52% en el mismo ensayo (este porcentaje se calculó tomando la máxima concentración de PHB y dividiéndola sobre la biomasa formada en esa hora).

Tabla 8.

Parámetros de las relaciones C/N evaluadas

| N | Relación | Máxima biomasa (g/L) | Máximo PHB (g/L) | % Acumulación | PHB acumulado (g/L) |
|---|----------|----------------------|------------------|---------------|---------------------|
| 1 | 5 | 3.212 | 1.0581 | 33.75 | 7.1437 |
| 2 | 6.25 | 2.5572 | 0.5567 | 28.37 | 3.8442 |
| 3 | 7.5 | 6.2156 | 2.24 | 36.04 | 21.8984 |
| 4 | 8.75 | 5.0411 | 1.8496 | 44.23 | 14.7591 |
| 5 | 10 | 8.491 | 2.201 | 35.30 | 18.766 |
| 6 | 11.25 | 6.1019 | 3.0178 | 63.52 | 21.1478 |
| 7 | 12.5 | 5.1078 | 1.5915 | 47.20 | 16.5331 |
| 8 | 13.75 | 4.4789 | 1.01 | 24.12 | 10.9476 |
| 9 | 15 | 1.426 | 0.4096 | 29.03 | 2.4122 |

5.2.3 Actividad 2.3 Fijación de la relación C/N que favorece la producción de polihidroxibutirato

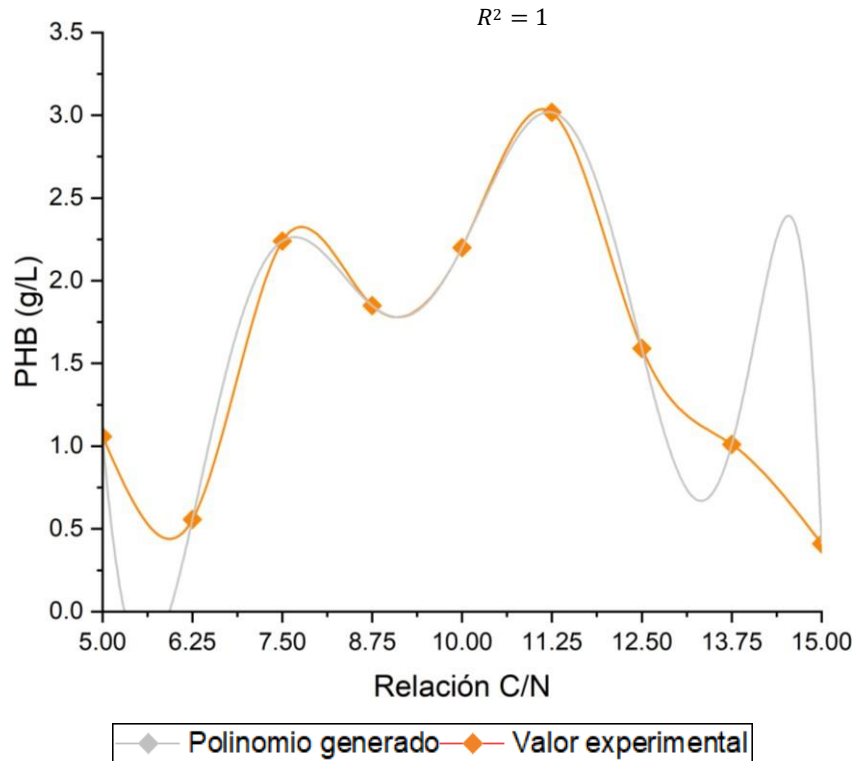
Una vez finalizado el diseño experimental se tomaron los máximos resultados de PHB en cada relación C/N (ver tabla 8) para obtener el modelo matemático del proceso con el fin de

predecir el comportamiento del microorganismo frente a la relación C/N. Con ayuda de Matlab se generó el polinomio de grado 8 con correlación de 1 presentado a continuación.

Figura 13.

Tendencia de la formación de PHB variando la relación C/N.

$$y = -9.27E^{-0.5}x^8 + 0.0068x^7 - 0.213x^6 + 3.67x^5 - 38.11x^4 + 241.85x^3 - 908.58x^2 + 1820.45x - 1450.44$$



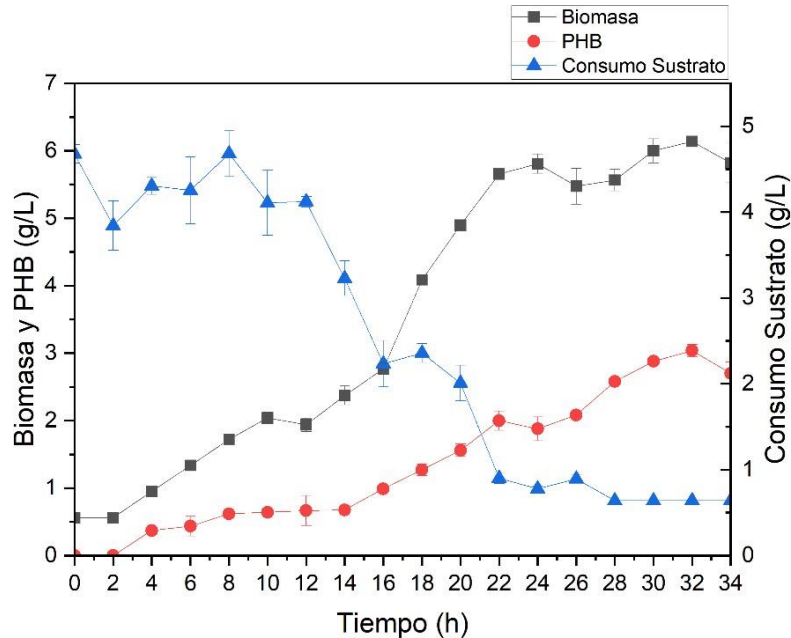
Optimizando el polinomio se obtienen 6 raíces dentro del rango de las relaciones C/N, entre las cuales se toma el punto máximo de 11.2064 observado en la gráfica 16. Al evaluar esta relación en el polinomio se predice una producción de PHB de 3.019 g/L.

Actividad 2.3.1 Validación punto óptimo

En esta actividad se comprueba la predicción del polinomio, los resultados se presentan en la siguiente gráfica:

Figura 14.

Curva de crecimiento de biomasa, producción de PHB y consumo de sustrato para la relación C/N 11.2064.



En la gráfica 17 se observa un buen crecimiento de biomasa en donde el microorganismo se adaptó rápidamente al medio de fermentación obteniendo un valor máximo de 6.14 g/L en la hora 32. En cuanto al PHB se evidencia un comportamiento de metabolito primario, obteniendo 3.04 g/L de concentración máxima a la misma hora en la que se obtuvo la máxima biomasa, este resultado en comparación con el evaluado en el polinomio presenta una desviación estándar del 0,6% demostrando que la estimación entre el polinomio y el valor experimental es mínima. El porcentaje máximo de recuperación fue del 49.51% y una acumulación de PHB de 24.3967 g/L siendo el máximo valor reportado en este trabajo en alimentación batch.

A partir de estos resultados se valida la información recopilada del polinomio demostrando que este modelo matemático predice de forma correcta el comportamiento del microorganismo frente a las relaciones C/N.

5.3 Fase 3. Cambio en la alimentación para la producción de PHB.

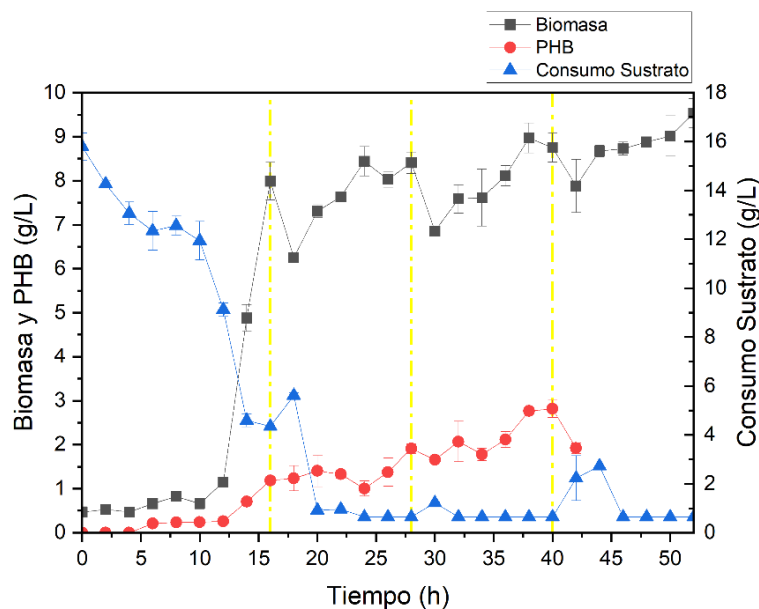
Una vez se establece el punto óptimo de la relación C/N se realiza el cambio de alimentación.

5.3.1 Actividad 3.1 Cultivo fed-Batch

A partir de la relación C/N de 11.2064 se realiza la fermentación en modo fed-batch, los resultados se presentan en la gráfica 18.

Figura 15.

Curva de crecimiento de biomasa, producción de PHB y consumo de sustrato para la relación C/N 11.2064 en alimentación fed-batch.



Nota: las líneas amarillas representan los pulsos alimentados a lo largo del bioproceso

La fermentación Fed-batch se alimentó a partir de pulsos distribuidos cada 12 horas iniciando en la hora 16 ya que en este punto se observa que en alimentación batch comienza la fase exponencial y el consumo de sustrato incrementa.

En la gráfica se evidencia el comportamiento del microorganismo con cada pulso agregado, al adicionar medio en la fermentación el microorganismo obtiene nueva fuente de carbono

para mantener la fase exponencial y seguir produciendo PHB.

Se observa un buen crecimiento de biomasa alcanzando una máxima concentración de 9.5293 g/L a la hora 52, una máxima producción de PHB de 2.9137 g/L, con un porcentaje de recuperación del 33.40% y una acumulación de PHB de 38.1447 g/L. El rendimiento producto-sustrato máximo alcanzado fue de 0.19 g/g y el rendimiento producto-sustrato del proceso fue de 0.14 g/g. Estos rendimientos se obtienen a partir de la siguiente ecuación:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad [\text{Ec. 1}]$$

Donde ΔP es lo que se produce, ΔS lo que se consume.

En el estudio realizado por Moreno (2015) utilizando como fuente de carbono glicerol crudo y a partir de tres tipos de alimentación fed-batch (pulsos ascendentes, pulsos y constante), obtuvo máximas concentraciones de PHB entre 1.18 a 2.06 g/L, con un porcentaje de acumulación promedio de 31% y PHB acumulado entre 10.98 y 18.7 g/L. En García (2014) a partir de sacarosa y extracto de levadura, *Azoctobacter vinelandii mutant* recuperó un 38% de PHB, una concentración máxima de 5.6 g/L y una acumulación de 9.1 g/L. La más reciente investigación Yadav (2023) utilizando como fuente de carbono glucosa alcanzó una máxima concentración de PHB de 1.42 g/L, con un porcentaje de recuperación del 86% y un PHB acumulado de 13.7 g/L. En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos de la revisión bibliográfica.

Tabla 9.

Resultados en alimentación fed-batch para la producción de PHB a partir de revisión bibliográfica.

| | Bacteria | Sustrato | Duración (h) | Máximo PHB (g/L) | $Y_{p/s}$ Global (g/g) | $Y_{p/s}$ máximo (g/g) | % Acumulación | PHB acumulado (g/L) | Tipo alimentación |
|-----------------------|---------------------------------------|----------------------------|--------------|------------------|------------------------|------------------------|---------------|---------------------|--------------------|
| (Moreno Yañez, 2015) | <i>Bacillus mgaterium B2</i> | Glicerol Crudo | 20 | 2.06 | 0.075 | 0.68 | 31.38 | 18.7 | Pulsos ascendentes |
| | | | | 1.38 | 0.3 | 0.28 | 23 | 14 | Pulsos |
| | | | | 1.18 | 0.20 | 0.18 | 21 | 10.98 | Constante |
| (García et al., 2014) | <i>Azoctobacter vinelandii mutant</i> | Sacarosa | 38 | 5.6 | 0.33 | - | 70 | 9.1 | Pulsos |
| (Yadav & Patra, 2023) | <i>Bacillus subtilis</i> | Glucosa | 34 | 1.22 | 0.14 | 0.18 | 86 | 13.7 | Constante |
| Este trabajo | <i>Bacillus mgaterium B2</i> | Residuos líquidos de cacao | 52 | 2.91 | 0.14 | 0.19 | 33.40 | 38.14 | Pulsos |

En la tabla 9 se presentan los rendimientos máximos y globales reportados en bibliografía, donde se observa que este trabajo se posiciona entre los valores de otros autores, por lo que se demuestra que el modo fed-batch utilizado en este trabajo de investigación es un buen punto de partida para posteriores investigaciones, sin embargo, al comparar el modo batch y fed-batch los resultados no muestran una variación favorable en el cambio de alimentación (ver tabla 10).

Tabla 10.

Parámetros batch y fed-batch.

| | Duración (h) | Máximo PHB (g/L) | $Y_{p/s}$ Global (g/g) | $Y_{p/s}$ máximo (g/g) | % Acumulación | PHB acumulado (g/L) |
|------------------|--------------|------------------|------------------------|------------------------|---------------|---------------------|
| <i>Batch</i> | 34 | 3.0389 | 0.67 | 0.75 | 49.51 | 24.4 |
| <i>Fed-batch</i> | 52 | 2.91 | 0.14 | 0.19 | 33.40 | 38.14 |

Se observa que el valor de PHB acumulado en alimentación fed-batch es mayor que en batch debido a que se prolonga el tiempo de fermentación de 34 a 52 horas, así mismo, se cumple con el objetivo de mantener la fase estacionaria del microorganismo por un mayor tiempo, con el fin de acumular mayor concentración de producto. Respecto a los rendimientos producto-sustrato se debe tener en cuenta que al poseer una mayor cantidad de azúcares iniciales disminuye el rendimiento, es por esto que en fed-batch al iniciar con una concentración mayor a la alimentación en batch pero manteniendo una concentración de PHB similar, el rendimiento disminuye significativamente.

Este trabajo de investigación se enfoca en la acumulación de PHB donde se reporta un mayor valor que los resultados presentados anteriormente. Resaltando que existen pocos artículos utilizando fuentes de carbono de residuos agroindustriales en alimentación fed-batch e inexistente información con respecto a residuos líquidos del cacao, el presente trabajo de investigación sirve como precursor a futuras investigaciones con respecto a los diferentes tipos de alimentación en modo fed-batch.

6. Conclusiones

Se evaluó la influencia de la relación C/N en la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 usando residuos líquidos del cacao como fuente de carbono mediante un diseño experimental el cual a las mismas condiciones de fermentación varió las concentraciones de biomasa y PHB, así mismo el porcentaje de recuperación y el PHB acumulado demostrando que a diferentes relaciones C/N el valor de estos cambia. La mayor concentración de PHB fue de 3.0389 g/L en la relación C/N de 11.2064 el cual fue determinado como punto óptimo a partir de modelamiento matemático.

El efecto de la modificación del modo de alimentación de batch a fed-batch incrementó el PHB acumulado al 156% estableciendo un buen punto de partida para estudios posteriores que utilicen como sustrato residuos del cacao.

7. Recomendaciones

Se recomienda ampliar el tiempo del pre y del inóculo con el fin de que el microorganismo se adapte más rápido al medio agregado en el fermentador.

Se recomienda usar mucilago del mismo proceso de transformación del grano para poder comparar de manera más efectiva y precisa los parámetros obtenidos en cada fermentación. Esto se debe a que la concentración de azúcares es inherente en este sustrato y depende de las condiciones de cultivo del cacao.

Se recomienda evaluar otra estrategia de alimentación en fed-batch (flujo constante) para seguir estudiando el efecto y determinar la mejor forma de alimentación con el fin de obtener la mayor producción de PHB.

8. Referencias Bibliográficas

- Abdelrahman, S. A., Barakat, O. S., & Elsayed, T. R. (2022). Biopolymer production by some marine bacterial strains isolated from Egypt. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(7), 513–523. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.105848.4875>
- Arvelo, M. A., González, D., Delgado, T., Maroto, S., & Montoya, P. (2017). *CACAO EN AMÉRICA*.
- Astudillo Fajardo, M. C., & Olmedo Garcia, L. E. (2021). *Obtención de polihidroxibutirato (PHB) a partir del subproducto glicerol procedente de la transformación de aceites usados de palma a biodiesel*.
- Axayacatl, O. (2020, November 1). *Estadísticas mundiales de producción de cacao*. <https://blogagricultura.com/estadisticas-cacao-produccion/>
- Banacore, A. (2014). *Estudio de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por Bacillus sp. utilizando glicerol como fuente de carbono*.
- Bernal, T. (2021). *Revalorización de residuos de la Industria de Chocolate para la obtención de biomoléculas de interés industrial a partir de la cascarilla de cacao*. Universidad de Cuenca.
- Borowiak, A. (n.d.). *Agilent Hi-Plex Ligand Exchange Columns*.
- Braudeau, J. (1970). *El cacao: técnicas agrícolas y producciones tropicales*. Blume.
- Campuzano, C. Á. (2015). *ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO USANDO LACTOSUERO COMO MATERIA PRIMA*. Universidad Nacional de Colombia.
- CARRILLO MARTINEZ, D. P., & PARRA LOPEZ, M. P. (2017). *EFEECTO DE LA RELACION CARBONO-NITROGENO EN LA PRODUCCION DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR BACILLUS MEGATERIUM B2 A PARTIR DE GLICEROL CRUDO BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE AIREACION Y PH [recurso electronico]*. UIS.
- Chen, G.-Q. (2009). Introduction of Bacterial Plastics PHA, PLA, PBS, PE, PTT, and PPP. In *Plastics from Bacteria* (pp. 1–16). Springer Berlin Heidelberg.
- Danial, A. W., Hamdy, S. M., Alrumman, S. A., Gad El-Rab, S. M. F., Shoreit, A. A. M., & El-Latif Hesham, A. (2021). *microorganisms Bioplastic Production by Bacillus wiedmannii AS-02 OK576278 Using Different Agricultural Wastes*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112395>
- Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. (2021). *CADENA DE CACAO*. 7–8.
- Duran Riveros, D. R., & Cabezas Calderon, J. T. (2019). *EVALUACION DEL MUCILAGO DE CACAO COMO FUENTE DE CARBONO PARA PRODUCCION DE CELULOSA BACTERIANA [recurso electronico]*. UIS.

- FEDECACAO. (2022). *La producción cacaotera nacional sigue creciendo: en 2021 logra un nuevo récord histórico*. Oficina de Comunicaciones - FEDECACAO. <https://www.fedecacao.com.co/post/la-producción-cacaotera-nacional-sigue-creciendo-en-2021-logra-un-nuevo-récord-histórico>
- FEDECACAO. (2023). *FEDECACAO*. Oficina de Comunicaciones- FEDECACAO. <https://www.fedecacao.com.co/>
- Gamboa Suarez, M. A. (2019). *PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) GENERADOS A PARTIR DE RESIDUOS PROVENIENTES DE LA AGROINDUSTRIA DEL CACAO USANDO UNA CEPA NATIVA [recurso electronico]*. UIS.
- García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., & Peña, C. (2014). High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 117–123. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2013.10.020>
- Gómez-Cardozo, J. R., Velasco-Bucheli, R., Marín-Pareja, N., Ruíz-Villadiego, O. S., Correa-Londoño, G. A., & Mora-Martínez, A. L. (2020). Fed-batch production and characterization of polyhydroxybutyrate by *Bacillus megaterium* LVN01 from residual glycerol • *Revista DYNA*, 87(214), 111–120. <https://doi.org/10.15446/dyna.v87n214.83523>
- Gutierrez Nuñez, A. (2021). *La industria del plástico creció 22,2% frente a 2020 en el primer semestre*. <https://www.larepublica.co/especiales/la-revolucion-del-plastico/la-industria-del-plastico-crecio-222-frente-a-2020-en-el-primer-semestre-3233461>
- Hernández, R., & Rojas, P. (2011). *ESTUDIO DEL MUCÍLAGO DE CACAO (Theobroma cacao L.) CON FINES DE APROVECHAMIENTO INDUSTRIAL Y ARTESANAL, EN BARLOVENTO, ESTADO MIRANDA*.
- Kanjanachumpol, P., Kulpreecha, S., Tolieng, V., & Thongchul, N. (2013). *Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of Bacillus megaterium BA-019*. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0885-7>
- Lizcano Gonzalez, V. A. (2018). *EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE NITROGENO Y OXIGENO EN LA PRODUCCION DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR BACILLUS MEGATERIUM B2 A PARTIR DE GLICEROL [recurso electronico]*. UIS.
- Low, T. J., Mohammad, S., Sudesh, K., & Baidurah, S. (2021). Utilization of banana (*Musa* sp.) fronds extract as an alternative carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* H16. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 34, 102048. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2021.102048>
- Macauley-Patrick, S., & Finn, B. (2008). *Practical Fermentation Technology* (B. McNeil & L. Harvey, Eds.). <https://www.ifsc.usp.br/~ilanacamargo/FFI0740/4.pdf>

- Malqui Saavedra, M. T. (2018). *Producción de polihidroxibutirato por Azotobacter chroococcum en un medio de cultivo a base de vinaza a concentraciones de 25% y 50%*. Universidad Nacional de Trujillo.
- Mesa Beltran, E. S., & Romero Isaza, S. P. (2021). *AJUSTE DE LAS CONDICIONES NUTRICIONALES DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCION DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) POR BACILLUS MEGATERIUM B2 A PARTIR DE RESIDUOS LIQUIDOS DE CACAO [recurso electrónico]*. UIS.
- Mohapatra, S., Sarkar, B., Samantaray, D. P., Daware, A., Maity, S., Pattnaik, S., & Bhattacharjee, S. (2017). Bioconversion of fish solid waste into PHB using *Bacillus subtilis* based submerged fermentation process. *Environmental Technology*, 38(24), 3201–3208. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1291759>
- Moreno, P., Yañez, C., Cardozo, N. S. M., Escalante, H., Combariza, M. Y., & Guzman, C. (2015). 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. *New Biotechnology*, 32(6), 682–689.
- Moreno Yañez, P. A. (2015). *ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) POR BACILLUS SP. UTILIZANDO GLICEROL RESIDUO DE LA INDUSTRIA DEL BIODIESEL COMO FUENTE DE CARBONO [recurso electrónico]*. UIS.
- 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>
- Naranjo Vasco, J. M. (2010). *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales*.
- Nieto, D., & Lahoz, O. (2022, January 17). *Residuos de pesticidas en cacao - Merieux Nutrisciences*. Contaminantes y Residuos. <https://www.merieuxnutrisciences.com/es/contaminantes-y-residuos/residuos-de-pesticidas-en-cacao/>
- OCDE. (2022, February 22). *La contaminación por plástico crece sin cesar, en tanto que la gestión de residuos y el reciclaje se quedan cortos, dice la OCDE. - OECD*. <https://www.oecd.org/centrodemexico/medios/perspectivas-globales-del-plastico.htm>
- Ochoa, S. (2019). Fed-Batch Fermentation – Design Strategies. *Comprehensive Biotechnology*, 586–600. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00093-8>
- Page, W. J., & Cornish, A. (1993). Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in Fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly-, -Hydroxybutyrate. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 59, Issue 12). <https://journals.asm.org/journal/aem>

- Peñaranda, L., Montenegro, S., & Giraldo, P. (2017). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales Exploitation of agroindustrial waste in Colombia Exploração de resíduos agroindustriais na Colômbia*.
- Quintero R, M. L., & Díaz Morales, K. M. (2004). El mercado mundial del cacao. *Agroalimentaria*, 9(18), 47–59.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-03542004000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- RamKumar Pandian, S., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Rameshkumar, N., Jeyaraj, M., & Gurunathan, S. (2010). Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. *Bioresource Technology*, 101(2), 705–711. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.08.040>
- Rojas González, L. M. (2019). *Aprovechamiento de la cáscara de cacao para la elaboración de un biocomposito con aplicación en la construcción sostenible*. Universidad El Bosque.
- Roll'eat. (2022, October 28). *Impacto Medioambiental Del Plástico: Causas Y Efectos*. Consumo Sostenible. <https://rolleat.com/es/impacto-ambiental-del-plastico/>
- Suarez Rodriguez, S. J. (2019). *PRODUCCION DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE RESIDUOS DE LA FERMENTACION DEL CACAO USANDO BACILLUS MEGATERIUM B2*. UIS.
- 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)
- The Nature Conservancy. (2021, July 19). *Contaminación por plásticos*. Ciudades Saludables. <https://www.nature.org/es-us/que-hacemos/nuestras-prioridades/ciudades-saludables/detener-residuos-plasticos/>
- Tortoló, K., & Bell, A. (2015). Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 49,22–26. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223136961004>
- Uribe Ribero, D. C. (2022). *Extracción y caracterización de polihidroxibutirato (PHB) producido por Bacillus megaterium B2 usando como fuente de carbono residuos provenientes de la agroindustria de cacao*. Universidad Industrial de Santander.
- Wallen, L. L. (1973). POLY- beta -HYDROXYALKANOATE FROM ACTIVATED SLUDGE. *Am Chem Soc Div Environ Chem Prepr*, 13(2), 30 – 31.
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0015756495&partnerID=40&md5=aefebdf422ee93a4afc6b19f8cc2c5a5>
- Wallen, L. L., & Rohwedder, W. K. (1974). Poly-β-hydroxyalkanoate from Activated Sludge. *Environmental Science and Technology*, 8(6), 576 – 579.
<https://doi.org/10.1021/es60091a007>

Yadav, J., & Patra, N. (2023). Modeling of poly- β -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* and its use for feed-forward bioreactor studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *107*(1), 57 – 69. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12266-6>

Zhang, Y., Sun, W., Wang, H., & Geng, A. (2013). Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresource Technology*, *147*, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.029>

Apéndices

Apéndice A.

Composición de los elementos traza presentes en el medio de sales.

| Sustancia | Composición |
|----------------------|-------------|
| Sulfato de hierro | 10 g/L |
| Molibdato de amonio | 0,2 g/L |
| Ácido clorhídrico | 10 mL |
| Sulfato de zinc | 2,25 g/L |
| Sulfato de cobre | 1 g/L |
| Sulfato de manganeso | 0,5 g/L |
| Cloruro de calcio | 2 g/L |
| Ácido bórico | 0,23 g/L |

Apéndice B.

Líquido residual del proceso de celulosa bacteriana



Apéndice C.

Mucilago.



Apéndice D.

Medio nutritivo.



Nota: en la imagen de la izquierda se observa el medio nutritivo y en la derecha el pre-inóculo

Apéndice E.

Medio de sales.



Nota: en la imagen de la izquierda se observa el medio de sales y en la derecha el inóculo

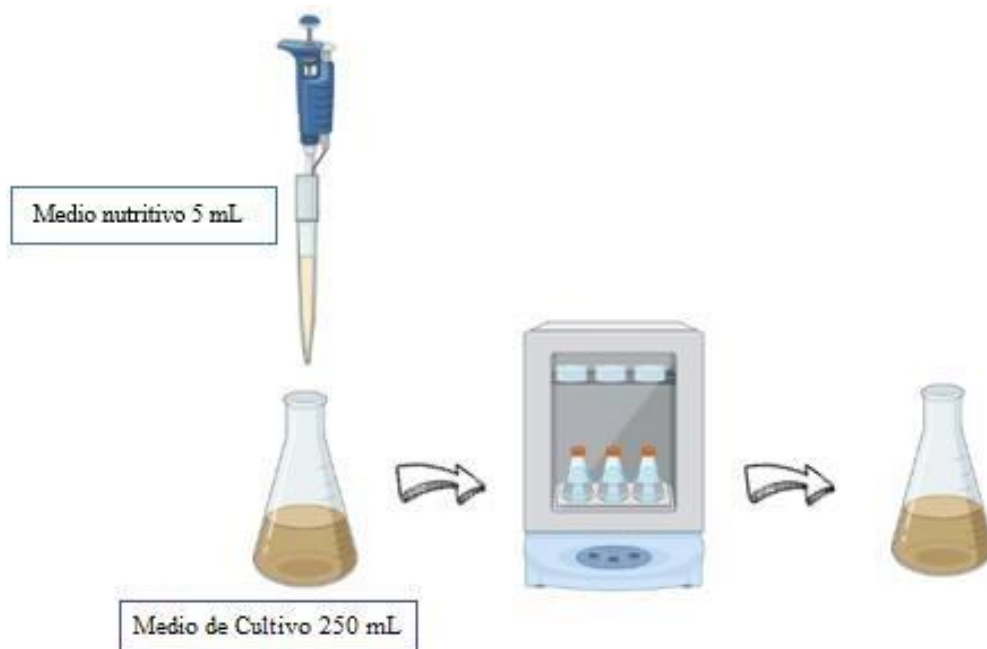
Apéndice F.

Pre-inóculo del microorganismo.



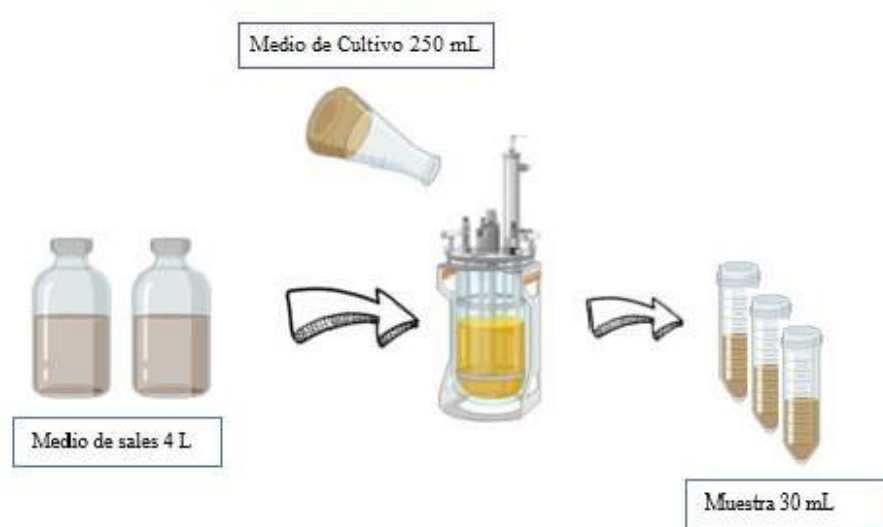
Apéndice G.

Inóculo.



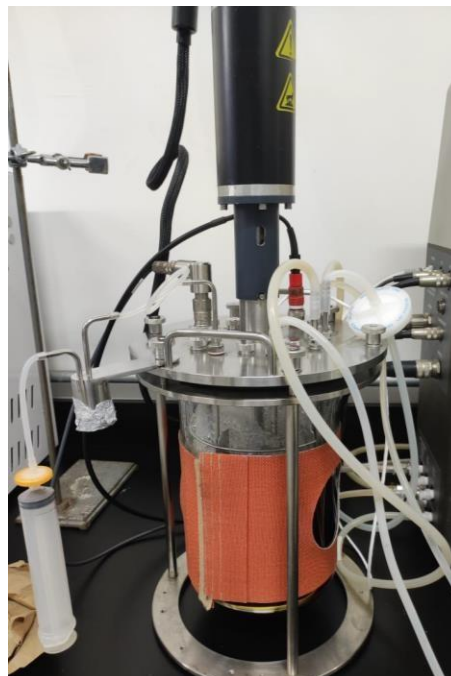
Apéndice H.

proceso de fermentación



Apéndice I.

Reactor de tanque agitado.



Apéndice J.

Pellet formado durante el proceso de fermentación.



Nota: en la imagen de la izquierda se observa el pellet durante el proceso de fermentación y en la imagen de la derecha se encuentra el pellet liofilizado.

Apéndice K.

PHB producido por bacillus megaterium B2 a partir de residuos líquidos del cacao.

