

Efecto de las concentraciones de fosfato ácido de sodio y elementos traza en la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol crudo

Anyely Carolina Bohada Orjuela, Julieth Paola Santana Alarcón

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniera Química

Director

Humberto Escalante Hernández

Doctor en Ingeniería Química

Codirectores

Víctor Alexis Lizcano González

Ingeniero Químico

Mabel Juliana Quintero Silva

Master en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físico-Químicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2017

Dedicatoria

En memoria de: mi padre Rafael y mis primas Ángela y Luz, por iluminar mi camino.

A Dios por bendecirme cada instante de mi vida.

A mi madre María Isabel por su amor, apoyo y paciencia.

A mis hermanos, Rafa y Cris, por su compañía y motivación.

A mis amigas Alexa, Yami, Jeimy, Diana y Osana que han estado desde siempre conmigo

As, Vane, Moni, Roshy gracias por tantas aventuras y momentos compartidos, por ser más que mis amigas ustedes son mis hermanas.

Juli por estos años de amistad y por ser especial conmigo.

Yiss por ser mi motivadora personal la quiero mi bff.

A mi sobrina Melania Shariq por ser mi sol y mi inspiración.

Con mucho amor Anyely Carolina Bohada Orjuela

Dedicatoria

A Dios, por iluminar cada uno de mis pasos para poder culminar esta etapa de mi vida profesional.

A mis padres José y Adela, quienes construyeron lo que ahora soy. Gracias por su confianza, por su apoyo incondicional, por sus consejos. A mis hermanas Johana y Laura, porque han sido mi motivación para cumplir con este logro, como hermana mayor soy su ejemplo. Luchen siempre por sus sueños, las quiero mucho. A mis amigos, pues en estos años hicieron parte de mi formación personal y profesional, soy afortunada de haberlos conocido; Karen, gracias por todos estos años de amistad, esta travesía no habría sido la misma sin tí. Shaki, gracias por estar ahí para mí en las buenas y en las malas. Stivens, compañero y amigo con quien recordaré lo que era estudiar hasta la madrugada. Anyely, gracias por los momentos compartidos, por esa amistad que este año hemos construido y por aguantarme. A Fabián, quien ha sido mi ejemplo a seguir. Gracias por estar en mi vida, por ver todas las buenas cosas que hay en mí, por su ánimo y excelentes consejos para ser una gran mujer.

Julietth Paola Santana Alarcón

Agradecimientos

Al Doctor Humberto Escalante Hernández, por su apoyo y guía.

*Al ingeniero Victor Lizcano, por su ayuda incondicional, paciencia y estar siempre
con nosotras.*

*A la ingeniera Karen Núñez por su valiosa colaboración y guía en la realización de
la investigación.*

A la microbióloga Mabel Quintero, por sus conocimientos dados.

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

*A los docentes de Ingeniería Química por brindarnos sus conocimientos en el
desarrollo de la carrera.*

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	16
2. Materiales y métodos	20
2.1. Microorganismo.....	20
2.2. Fuente de carbono.....	21
2.3. Medios de Cultivo.....	21
3. Producción de PHB.....	23
3.1. Diseño de experimentos central compuesto.....	23
3.2. Métodos analíticos	26
3.3. Análisis Estadístico.....	27
4. Resultados y discusión.....	27
4.1. Diseño de experimentos.....	27
4.1.1. Primer diseño central compuesto (DDC-1): Experimentos previos.	27
4.1.2. Experimento con un diseño central compuesto (DCC-2).	33
5. Conclusiones.....	41
Referencias Bibliográficas	42

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 Principales nutrientes cuya limitación da lugar a la producción de PHB en diferentes microorganismos.....	18
Tabla 2 Métodos y equipos utilizados en la caracterización del glicerol.	21
Tabla 3. Composición medio formulado	22
Tabla 4 Variables y niveles en la producción de PHB por B. megaterium B2 para el primer diseño central compuesto (DCC-1): Experimentos previos.....	24
Tabla 5. Variables y niveles en la producción de PHB por B. megaterium B2 para el segundo diseño central compuesto (DCC-2).....	24
Tabla 6. Resultados del DDC-1 de producción de PHB, biomasa residual, porcentaje acumulación intracelular de PHB, pH, glicerol consumido y rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido.....	27
Tabla 7. ANOVA de los resultados del DCC-1: Experimentos previos.....	29
Tabla 8. Resultados DCC-2 de PHB, biomasa residual, porcentaje de acumulación intracelular de PHB, pH, glicerol consumido y rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido.	33
Tabla 9. ANOVA de los resultados del DCC-2.....	35
Tabla 10. Valores punto óptimo de producción de PHB.	37
Tabla 11. Anova para biomasa residual del DCC-1.	48
Tabla 12 Anova para porcentaje de acumulación de PHB del DCC-1.....	49
Tabla 13. Anova para el pH del DCC-1.....	51
Tabla 14. Anova para glicerol consumido del DCC-1.....	53

Tabla 15. Anova para porcentaje de rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido del DCC-1..... 54

Tabla 16 Anova para biomasa residual del DCC-2. 55

Tabla 17. Anova para porcentaje de acumulación de PHB del DCC-2..... 56

Tabla 18. Anova para pH del DCC-2..... 58

Tabla 19. Anova para glicerol consumido del DCC-2..... 61

Tabla 20. Anova para porcentaje de rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido del DCC-2..... 62

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Metodología desarrollada.	20
Figura 2. Primer diseño central compuesto: Experimentos previos.	25
Figura 3. Diseño central compuesto.	25
Figura 4. Contornos de la superficie de respuesta del DCC-1: Experimentos previos.	30
Figura 5. Diagrama de Pareto de los resultados del DCC-1:	31
Figura 6. Superficie de respuesta del modelo DCC-2.	37
Figura 7. Contornos de la superficie de respuesta estimada del DCC-2.	38
Figura 8. Diagrama de Pareto de los resultados del DCC-2.	38
Figura 9. Diagrama de Pareto del porcentaje de acumulación del PHB del DCC-1.	50
Figura 10. Contornos de la superficie de respuesta para el porcentaje de acumulación de PHB del DCC-1.	51
Figura 11. Diagrama de Pareto para el pH del DCC-1.	52
Figura 12. Contornos de la superficie de respuesta para el pH del DCC-1.	53
Figura 13. Diagrama de Pareto para el porcentaje de acumulación de PHB del DCC-2.	57
Figura 14. Contornos de la superficie de respuesta para el porcentaje de acumulación de PHB del DCC-2.	58
Figura 15. Diagrama de Pareto para el pH del DCC-2.	59
Figura 16. Contornos de la superficie de respuesta para el pH del DCC-2.	60

Lista de apéndices

	Pág.
Apéndice A. Análisis estadístico del DCC-1.....	48
Apéndice B. Análisis estadístico biomasa residual DCC-2.....	55

Nomenclatura

PHB: Polihidroxibutirato

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

ET: Elementos Traza

FAS: Fosfato ácido de sodio

DCC: Diseño Central Compuesto

CEIAM: Centro de Estudios e investigaciones Ambientales

Resumen

Título: Efecto de las concentraciones de fosfato disódico y elementos traza en la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol crudo*

Autores: Anyely Carolina Bohada Orjuela - Julieth Paola Santana Alarcón**

Palabras clave: PHB, *Bacillus megaterium* B2, elementos traza, fosfato disódico, glicerol crudo.

Contenido: Actualmente, el plástico es usado ampliamente debido a que posee propiedades que lo hacen indispensable, sin embargo, la mayoría de ellos son de difícil degradación orgánica. Teniendo en cuenta el impacto ambiental generado por los plásticos producidos de fuentes no renovables como el petróleo, se han impulsado las investigaciones sobre la generación de bioplásticos como los polihidroxicanoatos (PHA), los cuales son poliésteres acumulados en diferentes bacterias y con propiedades similares a los plásticos, con un tiempo de degradación corto. Uno de los PHAs más estudiados es el PHB, producido entre otras por una bacteria denominada *Bacillus megaterium* B2. Hoy día, se han desarrollado gran cantidad de proyectos sobre la producción de PHB, estudiando múltiples factores nutricionales y de operación (relación carbono-nitrógeno, tasa de aireación, etc.) en diferentes microorganismos (bacterias gram negativas y gram positivas). Sin embargo, es notable la ausencia de estudios sobre la influencia de la concentración de fósforo y de elementos traza en la producción de PHB, por lo que éste proyecto tiene como propósito evaluar las concentraciones de estas dos variables en la producción de PHB utilizando *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol crudo como fuente de carbono. En este estudio, fueron utilizados dos Diseños Centrales Compuestos (DCC). Se hicieron los montajes de los experimentos a las condiciones establecidas durante 30 horas cuantificándose las concentraciones de biomasa residual y de PHB, el pH y finalmente del glicerol consumido a lo largo de la fermentación. Los resultados mostraron que la producción máxima de PHB se encuentra en una concentración de 1,59 g/L de fosfato disódico y 0,33 mL/L de elementos traza, en este punto el valor de la producción de PHB predicho por el modelo es de 0,65 g/L.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físico-químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Director Humberto Escalante Hernández Doctor en Ingeniería Química. Codirector Mabel Juliana Quintero Silva Master en Ciencias Básicas Biomédicas.

Abstract

Title: The effect of disodium phosphate and trace elements concentrations in the production of PHB (Polyhydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium* B2 from raw glycerol.*

Authors: Anyely Carolina Bohada Orjuela - Julieth Paola Santana Alarcón**

Keywords: PHB, *Bacillus megaterium* B2, trace elements, disodium phosphate, raw glycerol.

Content: Currently, the plastic is used thoroughly because it contains characteristics which made it indispensable. However, most of plastics have a hard-organic degradation. Taking into account the environmental impact generated by the plastics made of non-renewable sources as crude oil, some investigations have been impulsed about making organic plastic as the polyhydroxyalkanoate (PHA), which are polyesters accumulated in different bacteria. Those polyesters have some similar characteristics of the plastics with a short degradation time. One of the PHA's studied the most is the PHB, made by a bacterium called *Bacillus megaterium* B2. Today, many projects about production of PHB have been developed, studying numerous nutritional and operational factors (relation carbon-nitrogen, airing rate, etc.) in different microorganisms (gram positive and gram-negative bacteria). Nevertheless, it is remarkable the absence of studies about the influence of the concentration of phosphorus and trace elements in production rate of PHB, therefore this project is focused on evaluating concentrations of these two variables in the production of PHB using *Bacillus megaterium* B2 from crude glycerol as carbon source. In this research, two Central Composite Designs (CCD) were used. The assemblies of the experiments were made in the established conditions for 30 hours. The concentrations of residual biomass and of PHB, the pH and finally glycerol consumed over the fermentation were quantified. The results showed that the maximum production of PHB is in a concentration of 1,59 g/L de disodium phosphate y 0,33 mL/L de trace elements. In this point, the value of the production of PHB predicted by the model is 0,65 g/L.

* Bachelor Thesis

** Faculty of Engineering Physic-Chemical. School of Chemical Engineering. Director: Director Humberto Escalante Hernández Doctor en Ingeniería Química. Codirector Mabel Juliana Quintero Silva Master en Ciencias Básicas Biomédicas.

Introducción

El plástico satisface infinidad de necesidades del hombre en la vida cotidiana. Los plásticos son usados ampliamente por tener propiedades como: buena protección contra el deterioro, versátiles, no susceptibles a la fragmentación, buena relación coste/eficacia, seguros, ligeros y permiten obtener diferentes estructuras y diseños. Sin embargo, la mayoría de estos materiales son de difícil degradación orgánica y su uso masivo está causando graves problemas ambientales (Cuz, Martínez y López 2013).

Las tres formas más usadas para tratar los desechos plásticos son: pirólisis, bio fotodegradación y reciclaje. La pirólisis de los residuos permite disminuir el volumen de los desechos tratados hasta en un 90%. Sin embargo, ésta puede generar algunas emisiones tóxicas como las dioxinas (Koller, Salerno, Dias, Reiterer y Braunegg 2010). La bio fotodegradación que se da por la acción exclusiva o combinada de la luz produciéndose una reacción fotolítica donde es necesario que el contenido energético de la radiación sea suficientemente elevado como para provocar la ruptura de enlaces (San Andrés y De La Viña, 2004).

El reciclaje es buena opción para el problema de los plásticos. Sin embargo, el reciclaje es tedioso, lleva mucho tiempo y luego de varios ciclos los materiales siempre terminan en vertederos. Las botellas de plástico de PVC o PET tardan en degradarse de cien a mil años. Adicionalmente, la sociedad para la industria del plástico creó un sistema de identificación de envases plásticos con números: 2, 3, 4, 5 y 6 (Khanna y Srivastava. 2005) los cuales no se pueden reciclar para obtener nuevos envases (Comisión E. EC N° 282. 2008).

Por lo anterior, la nueva tendencia hacia los modelos socioeconómicos de desarrollo sostenible ha impulsado la investigación sobre la generación de bioplásticos (polihidroxialcanoatos - PHA) para la producción de plásticos a partir de productos biodegradables más amigables con el medio ambiente (Verlinden, Hill, Kenward, Williams, y Radecka, 2007).

Dentro de los polihidroxialcanoatos se destaca el polihidroxibutirato (PHB), el cual ha sido producido biotecnológicamente utilizando diferentes grupos de bacterias y diferentes fuentes de sustratos, por ejemplo a partir de la savia de maple la *Alcaligenes latus* lo produce (Yezza, A., Halasz, A., Levadoux, W., y Hawari, J. 2007. p. 60), usando salvado de trigo, la cepa *Halomonas boliviensis* obtiene un porcentaje de 61% de acumulación de PHB (Rivera et al. 2015, p. 420-428) y a partir de acetato de amonio y el microorganismo *Azotobacter chroococcum* se han reportado buenos resultados de producción de PHB (Quagliano, J. 1998 p 6-7).

La ruta metabólica para la bioproducción de PHB, está condicionada por la temperatura, pH, aireación, radio de alimentación de carbono/nitrógeno, la concentración de sustratos, la concentración de elementos trazas, la intensidad de agitación y el oxígeno disuelto. Diferentes investigaciones se han desarrollado para la producción de PHB estudiando: relación carbono-nitrógeno y tasa de aireación en algunos microorganismos (bacterias gram negativas y gram positivas) (Ver Tabla 1).

En este caso particular, el PHB es producido a partir de glicerol crudo, empleando una cepa nativa de *Bacillus megaterium*, aislada en la Universidad Industrial de Santander y denominada B2 (Moreno, et al, 2015, p. 682-689). El glicerol crudo es el principal subproducto de la industria

de biodiesel y se forma a razón de 10% en peso de éste. Debido a las impurezas que presenta el glicerol crudo y a la sobre producción actual, éste tiene un bajo valor comercial.

El fosfato ácido de sodio y los elementos traza son componentes del medio de cultivo de gran importancia para la producción de PHB. El fósforo es esencial para la síntesis de ácidos nucleicos y ATP; también forma parte de los fosfolípidos y polímeros de la pared celular. El fósforo se suministra como fosfato ácido de sodio. (Chávez y Mancilla, 2007, p. 29). En general, los requerimientos de elementos traza se conocen sólo cualitativamente ya que es difícil demostrar su requerimiento debido a que las cantidades necesarias se suelen encontrar a menudo como contaminantes en otros constituyentes del medio. Los elementos trazas permiten activar algunas enzimas. El zinc juega un papel importante en la inmunidad celular y también funciona como un agente antioxidante y anti-inflamatorio (Prasad, 2008, p. 370-377).

Tabla 1

Principales nutrientes cuya limitación da lugar a la producción de PHB en diferentes microorganismos

Microorganismos	Nutrientes limitantes	Referencia
<i>Ralstonia eutropha</i>	Relación carbono-nitrógeno	Barbosa, Espinosa, Malagón y Moreno (2005). p. 45-54.
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Tasa de aireación y de la relación carbono/nitrógeno	Quagliano, J. (1998) p. 6-7).
<i>Alcaligenes latus</i>	Relación carbono-nitrógeno	Yezza, A., Halasz, A.,

		Levadoux, W., y Hawari, J. (2007). p. 269-274.
<i>Escherichia coli</i>	Relación carbono-nitrógeno	Mahishi, Tripathi y Rawal. (2002). p. 19-27
<i>Halomonas boliviensis</i>	Relación carbono-nitrógeno	Rivera Et al. (2015). p. 1-9.
<i>Bacillus megaterium</i>	Relación carbono-nitrógeno	Gouda, Swellam, y Omar. (2001). p. 201-207.
<i>Bacillus megaterium B2</i>	Relación carbono-nitrógeno	Moreno, et al. (2015). p. 682-689

Dada la ausencia de estudios sobre la concentración de fósforo y concentración de elementos traza en la producción de PHB utilizado la cepa *Bacillus megaterium*, este estudio tiene como propósito evaluar las concentraciones de estos dos compuestos en la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol crudo obtenido de una empresa colombiana productora de biodiesel.

2. Materiales y métodos

En la Figura 1 se presenta la metodología empleada para el desarrollo de este trabajo de investigación.

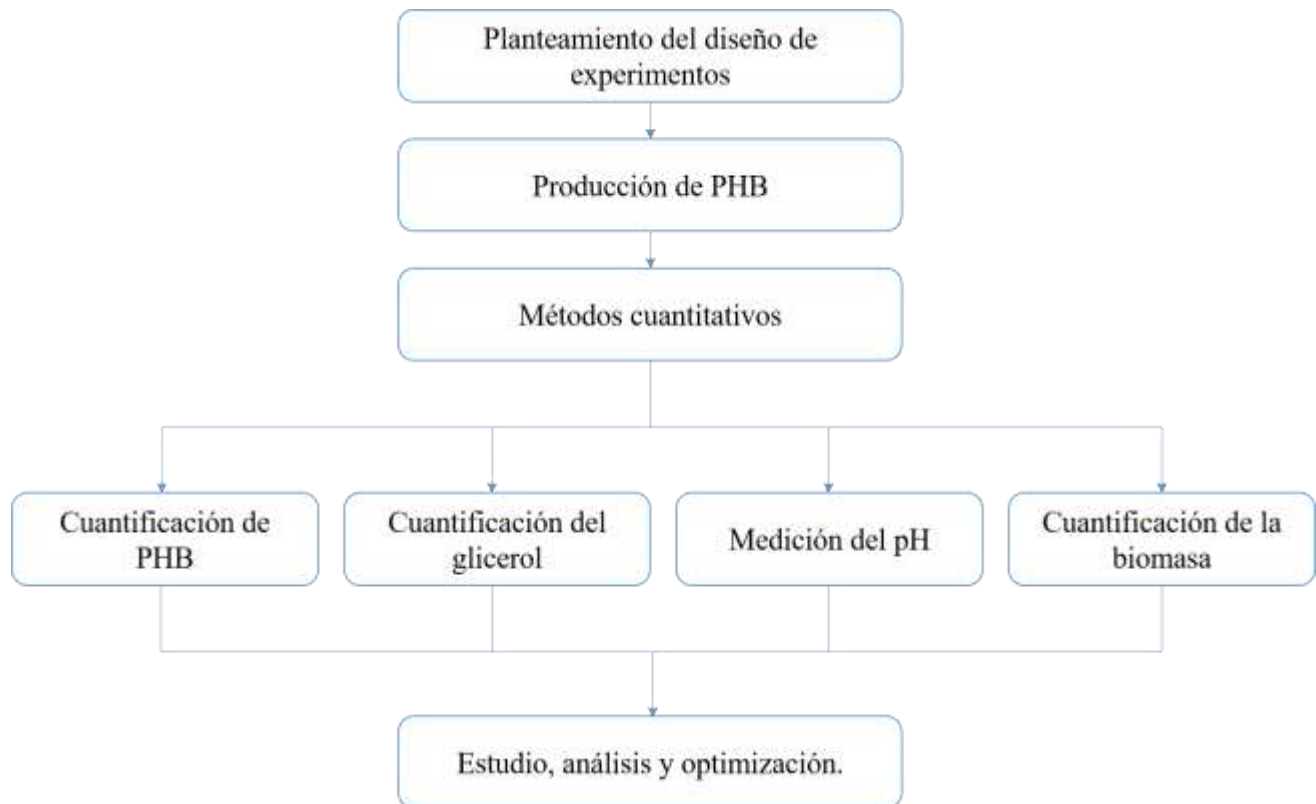


Figura 1. Metodología desarrollada.

2.1. Microorganismo.

Se utilizó la cepa nativa *Bacillus megaterium* B2. Esta bacteria fue aislada y adaptada al consumo de glicerol crudo de 20 g/L, para la producción de PHB en una investigación previa del Centro de Estudios e investigaciones Ambientales (CEIAM) de la UIS (Moreno, et al, 2015, p. 682-689). La cepa se almacenó a -21°C en una solución de 16% de glicerol crudo y 84% de medio de cultivo.

2.2. Fuente de carbono.

Se usó glicerol crudo, proveniente de una planta de producción de biodiesel a partir de aceite de palma y cuya caracterización fue reportada en un trabajo anterior (Moreno et al, 2015, p. 682-689).

En la Tabla 2, se muestran los métodos y equipos empleados en la caracterización y los valores obtenidos para cada parámetro. El glicerol se mantuvo en el laboratorio en recipientes de vidrio a 4°C.

Tabla 2

Métodos y equipos utilizados en la caracterización del glicerol.

Parámetro	Método/Equipo	Valor
pH	pH metro	3,41± 0,12
Densidad	Picnómetro	1,04 ± 0,01
% Glicerol	HPLC-RI	47,42 ± 0,23
% Humedad	Titulación Karl Fisher	45,42 ± 0,02
% Cenizas	Calcinación	2,85 ± 0,25
% Metanol	HPLC-RI	3,57 ± 0,05
% Jabones	Titulación colorimétrica	1,34 ± 0,17

Tomada de: Moreno et. al., 2015, p. 82

2.3. Medios de Cultivo.

En la Tabla 3, se presenta el medio de cultivo empleado en el proceso de producción de PHB. Este medio fue seleccionado con base en experimentos previos realizados en el grupo de

investigación CEIAM, en dónde se compararon diferentes medios de sales obteniéndose mayor producción de PHB para la siguiente composición:

Tabla 3.

Composición medio formulado

Reactivo	Formula química	Concentración
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g/L
Fosfato diácido de potasio	KH_2PO_4	1,5 g/L
Glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	20 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
Solución de elementos traza	-	0,1 mL/L
Fosfato ácido de sodio	Na_2HPO_4	3 g/L

Tabla 3.

Composición del medio formulado

Solución elementos trazas	Formula química	Concentración
Sulfato de hierro heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g/L
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,25 g/L
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1 g/L
Sulfato de manganeso tetrahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/L
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 g/L
Ácido bórico	H_3BO_4	0,23 g/L

Molibdato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,2 g/L
Ácido clorhídrico 35%	HCl	10 mL

3. Producción de PHB

Los experimentos se realizaron en erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de trabajo de 50 mL de medio, una agitación constante de 200 rpm y una temperatura de 34°C. El tiempo de fermentación fue de 30 horas, tiempo identificado con el de mayor producción de PHB en erlenmeyer (Moreno, et al, 2015, p. 682-689).

3.1. Diseño de experimentos central compuesto

Se realizaron dos diseños centrales compuestos (DCC) con el fin de evaluar la influencia de la concentración de fosfato ácido de sodio (FAS) y elementos traza (ET) (ver Tabla 4 y 5) sobre la producción de PHB por *B. megaterium* B2. Se realizó un experimento previo con el fin de explorar los rangos de las variables y luego un segundo diseño de experimentos central compuesto, con el fin de identificar regiones óptimas para la producción de PHB. Los puntos del diseño de experimentos fueron calculados con ayuda del software Statgraphics Centurion 16.2.

Los dos diseños cuentan con 9 experimentos (ver Figura 2 y Figura 3) de los cuales, 8 puntos son axiales y un punto central, repetido 4 veces, cada uno con duplicado.

Tabla 4

Variables y niveles en la producción de PHB por B. megaterium B2 para el primer diseño central compuesto (DCC-1): Experimentos previos.

Tipo de variable	Variable-Unidades	Variable codificada	Niveles	Niveles codificados
Nutricional	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O - g/L$	A	2	Bajo
			8	Alto
	Solución de elementos traza – mL /L	B	0,2	Bajo
			0,8	Alto

Tabla 5.

Variables y niveles en la producción de PHB por B. megaterium B2 para el segundo diseño central compuesto (DCC-2).

Tipo de variable	Variable-Unidades	Variable codificada	Niveles	Niveles codificados
Nutricional	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O - g/L$	A	2	Bajo
			4	Alto
	Solución de elementos traza – mL /L	B	0,1	Bajo
			0,3	Alto

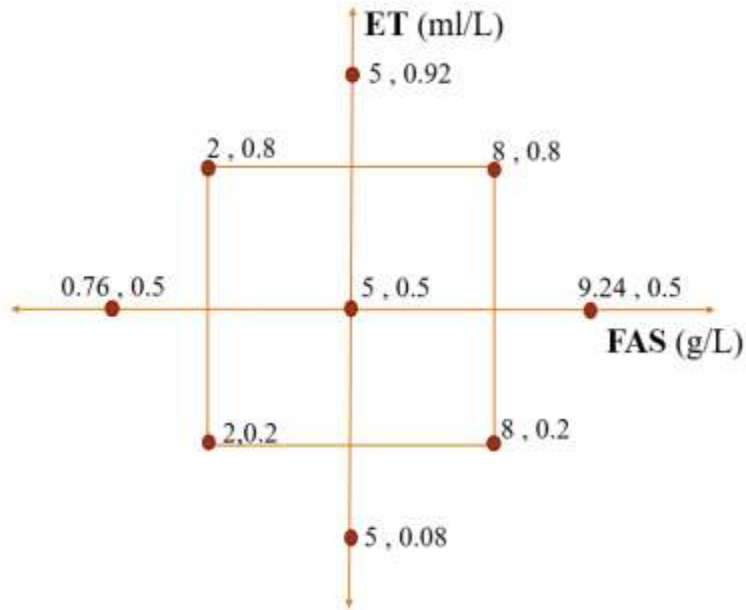


Figura 2. Primer diseño central compuesto: Experimentos previos. Nota: Datos calculados en el software Statgraphics Centurion 16.2.

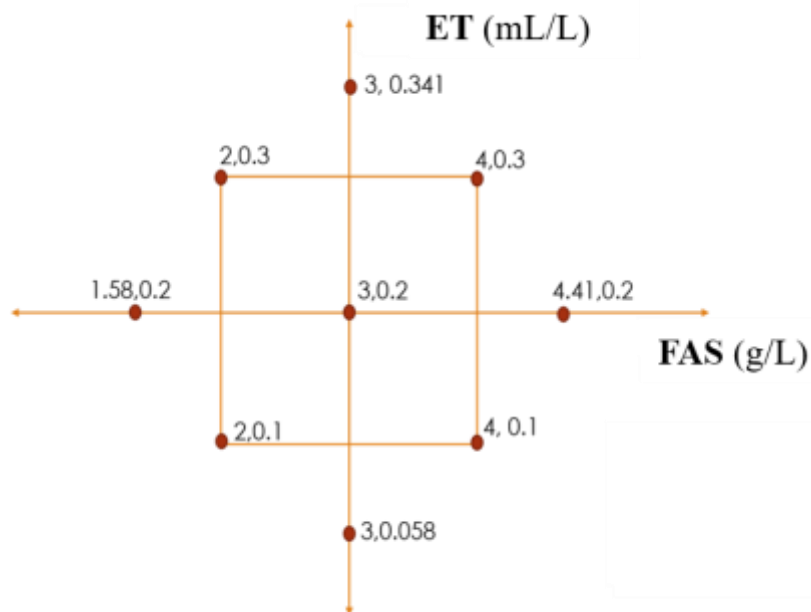


Figura 3. Diseño central compuesto. Nota: Datos calculados en el software Statgraphics Centurion 16.2.

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Biomasa. La biomasa fue medida mediante peso seco. Se utilizaron muestras de 15 mL, las cuales fueron recolectadas en un tubo centrífuga falcon previamente secado y pesado. Luego se centrifugaron a 8000 rpm por 8 min, a una temperatura de 4°C. El sobrenadante resultante se conservó para análisis posteriores. La biomasa precipitada se congeló a 4°C, posteriormente fue pesada después de un secado por 24 h a 60°C.

3.2.2. Cuantificación de PHB. Se tomaron 2mL de muestra en un tubo de vidrio. La muestra se centrifugaron a 8000 rpm por 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y se llevó el pellet a congelación. Se liofilizó la muestra durante 48 horas. Posteriormente, se agregó 1 ml de ácido sulfúrico, llevándolo a digestión a 96°C durante 30 min. El digerido se diluyó 50 veces y se almacenó 1 mL de la dilución para cuantificación por HPLC.

Las concentraciones de PHB fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para la determinación del PHB se usó un detector de UV-VIS empleando una longitud de onda de 210 nm. La columna empleada para el análisis, es una SUPELCOGEL C-610H, con un flujo isocrático de 0.6 mL/min y una temperatura de 60 °C en la columna.

3.2.3. Cuantificación del glicerol. Se tomaron 2 mL de sobrenadante obtenido en la cuantificación de biomasa. La concentración de glicerol se determinó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para la detección de glicerol se empleará un detector de índice de refracción. La columna a empleada para el análisis, es una SUPELCOGEL C-610H, con un flujo isocrático de 0.6 mL/min y una temperatura de 60 °C en la columna.

3.2.4. Cuantificación de la Biomasa Residual. La biomasa residual corresponde a la concentración de biomasa menos la concentración de PHB. La biomasa residual está relacionada con la acumulación de PHB intracelular

3.2.5. Porcentaje de acumulación de PHB. El porcentaje de acumulación de PHB está referido a la cantidad de PHB almacenado en la célula, este se calcula usando la Ecuación 1

$$\%Acumulación\ PHB = \frac{[PHB\ intracelular]}{[Biomasa\ total]} * 100\% \quad \text{Ecuación 1.}$$

3.3. Análisis Estadístico

Los datos experimentales se evaluaron de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) y la metodología de superficie de respuesta (RSM). Los análisis estadísticos se desarrollaron empleando el software Statgraphics Centurion® (Versión de prueba 16.2, Statpoint Inc., Herndon, Virginia, USA), con un nivel de confianza de 95% ($P < 0.05$).

4. Resultados y discusión

4.1. Diseño de experimentos

4.1.1. Primer diseño central compuesto (DDC-1): Experimentos previos.

En la Tabla 6, se muestra la producción de PHB, acumulación intracelular de PHB, biomasa residual, pH final, glicerol consumido y rendimiento de PHB respecto al glicerol para el DCC-1.

Tabla 6.

Resultados del DDC-1 de producción de PHB, biomasa residual, porcentaje acumulación intracelular de PHB, pH, glicerol consumido y rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido.

Exp. No.	Variables		PHB (g/L)	Biomasa residual (g/L)	% Acumulación PHB	pH final	Glicerol consumido (g/L)	% Y _{p/s}
	FAS (g/L)	ET (mL/L)						
1	5	0.5	0.33	3.44	8.82	6.57	2.71	12.31
2	5	0.5	0.30	2.69	9.89	6.79	0.57	52.28
3	5	0.5	0.29	4.31	9.01	6.84	1.01	28.59
4	5	0.5	0.28	2.90	8.16	6.80	1.40	20.22
5	2	0.2	0.61	3.06	14.68	5.04	2.20	27.80
6	8	0.2	0.31	3.15	6.77	6.97	1.12	40.35
7	2	0.8	0.24	4.44	6.15	7.40	1.34	17.70
8	8	0.8	0.27	3.59	8.77	6.79	1.00	36.62
9	9.24	0.5	0.17	3.97	4.55	7.06	1.60	10.59
10	0.76	0.5	0.46	2.72	13.66	5.72	1.87	25.14
11	5	0.92	0.14	1.60	3.07	7.83	2.97	4.84
12	5	0.08	0.25	1.46	7.87	6.34	3.51	7.22

Nota: Datos suministrados por el Software Statgraphics Centurion 16.2.

La producción y el porcentaje de acumulación intracelular de PHB, dependen del efecto de las concentraciones de FAS y ET evaluadas en cada experimento. Para los experimentos 5 y 10 se

muestra que bajo las condiciones evaluadas, los valores más altos para producción y acumulación intracelular de PHB son de: 0.61 (g/L) y 14.68%, 0.46 (g/L) y 13.66% respectivamente. Los datos de producción de PHB alcanzados por *B. megaterium* B2 son mayores, mientras que los porcentajes de acumulación intracelular de PHB son inferiores comprados con valores reportados por Moreno (Moreno et al, 2015, p. 682-689) y Shangkharak (Shangkharak, K., y Prasertsan, P. 2012. p. 173-182) de: 0.43 (g/L) y 34% con *B. megaterium* B2; 0.35 (g/L) y 18.9% con *B. subtilis* PHA012 respectivamente, a partir de glicerol.

Así mismo, en la Tabla 7, se presenta el análisis de varianza (ANOVA) del DCC-1.

Tabla 7.

ANOVA de los resultados del DCC-1: Experimentos previos.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A:FAS	0.112	1	0.112	27.53	0.0001
B: ET	0.078	1	0.078	19.21	0.0004
AA	0.013	1	0.013	3.23	0.0899
AB	0.055	1	0.055	13.42	0.0019
BB	0.008	1	0.008	1.97	0.1784
Error total	0.069	17	0.004		
Total (corr)	0.344	23			

Nota: Datos suministrados por el Software Statgraphics Centurion 16.2.

Los resultados de la Tabla 7, indican que el FAS, los ET y la interacción entre estas dos variables tienen efecto significativo en la producción del PHB por *B. megaterium* B2, ya que

$P < 0.05$, mientras que los efectos de curvatura de el FAS y ET no tienen un efecto significativo en la producción de PHB ($P > 0.05$).

Como se observa en el ANOVA, los efectos de curvatura no se tienen en cuenta para construir el modelo de regresión del DCC-1 (Ecuación 2)

$$PHB(g/L) = 0.791608 - 0.0741084 * A - 0.69493 * B + 0.0921983 * A * B \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde: A= Fosfato acido de sodio (g/L)

B=Elementos traza (mL/L)

La Ecuación 2, representa el 72.04% de la variabilidad de los datos, éste porcentaje es aceptable ya que explica más de un 70% el comportamiento de la respuesta (Pulido, H., De la Vara, R., Cano, A., y Osorio, M. 2008. p. 394).

En la Figura 4, se muestran los contornos de la superficie de respuesta obtenida de la ecuación 2, evaluando los ET y el FAS para el DCC-1.

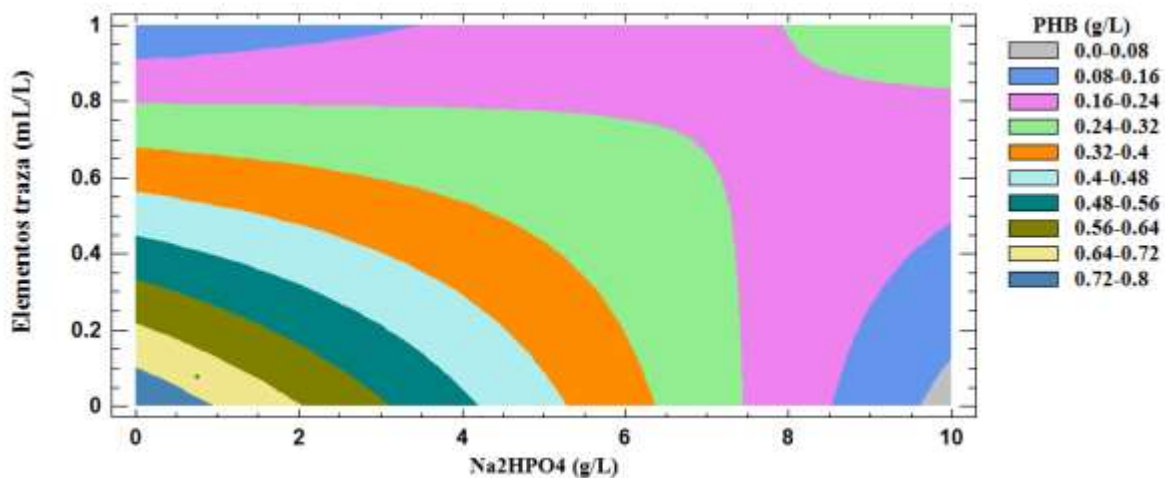


Figura 4. Contornos de la superficie de respuesta del DCC-1: Experimentos previos. Nota: Gráfica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

Se observa que la disminución de las dos variables aumenta la producción de PHB. Sin embargo, éste diseño experimental no es determinante para la localización del punto óptimo, ya que este se encuentra un punto silla como se observa en la Figura 4. Por lo anterior, para encontrar los valores óptimos en la producción de PHB por *B. megaterium* B2 es necesario el planteamiento de un nuevo diseño de experimentos dónde el rango a evaluar será de: 0.1 a 0.3 (mL/L) para los ET y 2 a 4 (g/L) de FAS. Los valores de los rangos del nuevo DCC-2 se asumieron teniendo en cuenta la región que cubre un producción de PHB entre 0.56 a 0.8 g/L mostrada en el diagrama de contornos (ver Figura 4).

En la Figura 5, se muestra el diagrama de Pareto ilustrando las variables que tienen un efecto positivo o negativo en la producción de PHB en el experimento DCC-1.

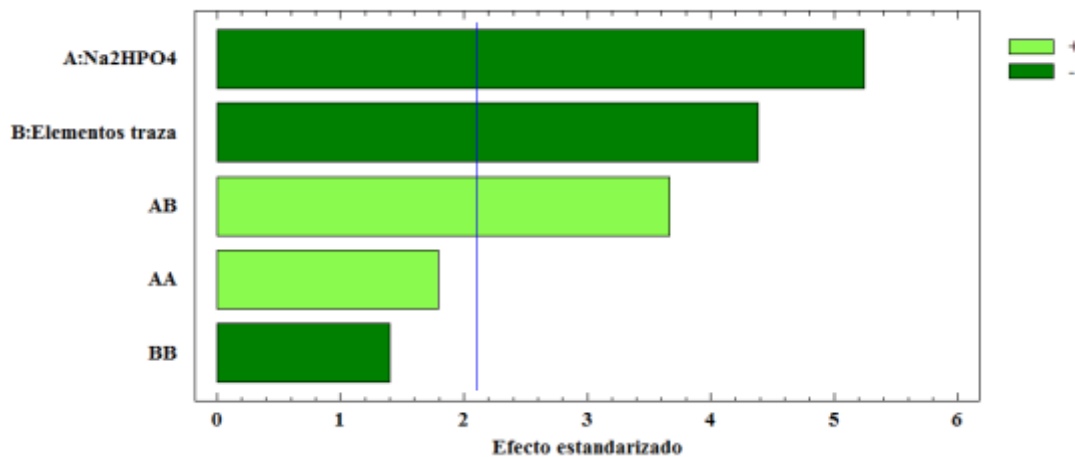


Figura 5. Diagrama de Pareto de los resultados del DCC-1: Experimentos previos. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

Se observa que el FAS y ET tienen un efecto negativo sobre la producción de PHB, mientras que su interacción tiene un efecto positivo. La fuente de fósforo estudiada tiene un efecto negativo, lo que significa que la limitación de este nutriente tiene un impacto directo en la

producción de PHB, (Cavaillé, et al. 2013, p. 301-309), este mismo efecto se presenta con los ET, donde su limitación es indispensable. Mientras que, la interacción de las dos variables estudiadas presenta un efecto positivo indicando que la limitación de estos nutrientes son cruciales para la producción de PHB por *B. megaterium* B2.

Adicionalmente, se analizaron estadísticamente otras variables: biomasa residual, porcentaje de acumulación intracelular, pH final, glicerol consumido y rendimiento de PHB respecto al glicerol. Se presentan a continuación.

El análisis estadístico de los factores evaluados: FAS y ET sobre la biomasa residual, indica que no es posible analizar el efecto que tienen estos factores sobre la biomasa residual, ya que los datos ajustados representan un estadístico de R^2 correspondiente a 30.11%, el cual muy bajo para explicar la variabilidad en biomasa residual (Ver Apéndice A.1).

El porcentaje de acumulación intracelular es afectado por el FAS y los ET, describiendo un comportamiento similar al mostrado en la producción de PHB, en el cuál la limitación de FAS y la reducción de los ET lo aumentan. El análisis estadístico muestra que el ajuste de los datos reporta un R^2 de 84.76% para la variabilidad de los datos. (Ver Apéndice A.2.)

La variación de pH en el medio de cultivo guarda relación con el metabolismo del microorganismo, por lo tanto sería un indicador del grado de formación producto (Priyanka, S., y Bijender, K. 2015). El análisis estadístico muestra que con bajos valores de pH hay mayor producción de PHB, como se observa en los experimentos 5 y 10 se encuentran los valores más altos de producción de PHB de 0.61 y 0.46 (g/L), para los cuales les corresponde un pH final de 5.04 y 5.72 respectivamente, siendo estos los valores de pH más bajos. De acuerdo con la literatura, el pH disminuye a medida que hay mayor producción de PHB, mostrando que hay

actividad en el proceso (Liu, Y., Huang, S., Zhang, Y., y Xu, F. 2014). El ajuste de los datos para pH representan un R^2 de 85.20% para la variabilidad de los datos, lo cual es significativo para este análisis. (Ver Apéndice A.3.)

Según el análisis estadístico para el glicerol consumido y el porcentaje de rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido, no es posible determinar el efecto que tienen el FAS y los ET sobre estas variables, ya que el ajuste de los datos tienen el estadístico R^2 de 41.93% y 14.43% de la variabilidad en glicerol consumido y porcentaje de rendimiento de producto sobre sustrato respectivamente. (Ver Apéndice A.4. y A.5)

En este experimento, se evaluaron las condiciones preliminares del diseño, el cual, sirvió para definir los rangos del experimento posterior, en donde se evaluaron la influencia de ET y FAS en la producción de PHB por *B. megaterium* B2.

4.1.2. Experimento con un diseño central compuesto (DCC-2).

En la Tabla 8, se presentan los resultados del PHB, el porcentaje de acumulación intracelular de PHB, biomasa residual, pH final, glicerol consumido y rendimiento de PHB respecto al glicerol por *B. megaterium* B2 en el DCC-2.

Tabla 8.

Resultados DCC-2 de PHB, biomasa residual, porcentaje de acumulación intracelular de PHB, pH, glicerol consumido y rendimiento de PHB respecto al glicerol.

Exp. N°	Variables		PHB (g/L)	Biomasa residual (g/L)	% Acumulación de PHB	pH final	Glicerol consumido (g/L)	% Y _{p/s}
	FAS (g/L)	ET (mL/L)						
1	3	0.2	0.59	1.31	31	6.54	5.95	11.78
2	3	0.2	0.55	1.49	27	6.67	5.31	10.34
3	3	0.2	0.56	1.61	25.81	6.53	4.96	11.35
4	3	0.2	0.50	1.34	27.22	6.83	4.88	10.28
5	3	0.06	0.42	2.14	16.25	6.17	6.96	7.95
6	4.41	0.2	0.34	1.80	15.70	6.22	13.61	2.62
7	1.59	0.2	0.62	1.99	23.60	6.22	4.68	13.18
8	4	0.3	0.38	0.90	29.37	6.90	2.38	16.56
9	2	0.1	0.48	1.95	19.60	6.30	14.97	3.22
10	4	0.1	0.56	3.42	13.96	6.08	6.67	9.01
11	3	0.34	0.52	1.85	21.97	6.20	2.85	18.16
12	2	0.3	0.57	1.29	30.43	5.29	10.47	5.42

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 8, se observa que la máxima producción de PHB es 0.62 g/L, este valor de producción de PHB es mejor que el obtenido por Dhangdhariya con la cepa *B. megaterium* JK4h de 0.34 g/L (Dhangdhariya, et al, 2015, p. 254-261), siendo esta producción similar a los estudios reportados por Israni con *Bacillus* sp. Ti₃ de 0.6 g/L (Israni, N., y Shivakumar, S. 2015

p. 290-295) y por Gouda *B. megaterium* con una producción de 0.69 g/L (Gouda, M. K., Swellam, A. E., y Omar, S. H. 2001 p. 201-207).

Según la Tabla 8, no se observa inhibición por pH para las condiciones estudiadas, debido a que su rango varía entre 6.08 y 6.90. Si se compara con el pH reportado por Franco (Franco, Y., Gómez, G., Núñez, R., y Martínez, J. 2008, p. 53-57), quién obtuvo un valor de $6,58 \pm 0,2$ se puede decir que es bueno, ya que el rango encontrado en este diseño asegura la mayor producción de PHB.

Además, en la Tabla 9, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el diseño central compuesto, en donde es posible determinar los efectos principales de cada variable, los efectos de interacción entre las variables y los efectos de curvatura.

Tabla 9.

ANOVA de los resultados del DCC-2.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A: FAS (g/L)	0.062	1	0.062	21.00	0.0003
B: ET (mL/L)	0.0007	1	0.0007	0.25	0.6216
AA	0.013	1	0.013	4.38	0,0516
AB	0.036	1	0.036	12.13	0.0028
BB	0.017	1	0.017	5.85	0.0271
Error total	0.050	17	0.002		
Total (corr)	0.175	23			

Nota: Datos suministrados por el Software Statgraphics Centurion 16.2.

De los resultados obtenidos en la Tabla 9, se muestra que la variable estudiada FAS y la interacción de los ET y el FAS tienen un efecto significativo en la producción de PHB por *B. megaterium* B2, ya que P es menor a 0,05 por lo tanto se tienen en cuenta para realizar el modelo de regresión, los ET también se incluyen debido a que son esenciales en los bioprocesos. (Ecuación 3)

$$PHB (g/L) = -0,113097 + 0,263326 * A + 3,55779 * B - 0,0319143 * A^2 - 0,67158 * A * B - 3,68627 * B^2$$

Ecuación 3.

Dónde: A= Fosfato acido de sodio (g/L)

B=Elementos traza (mL/L)

La Ecuación 3 representa el 71.2% de la variabilidad de los datos. En la Figura 6, se presenta la superficie de respuesta obtenida del modelo DCC-2, que permite inferir la producción óptima de PHB a partir de FAS y ET.

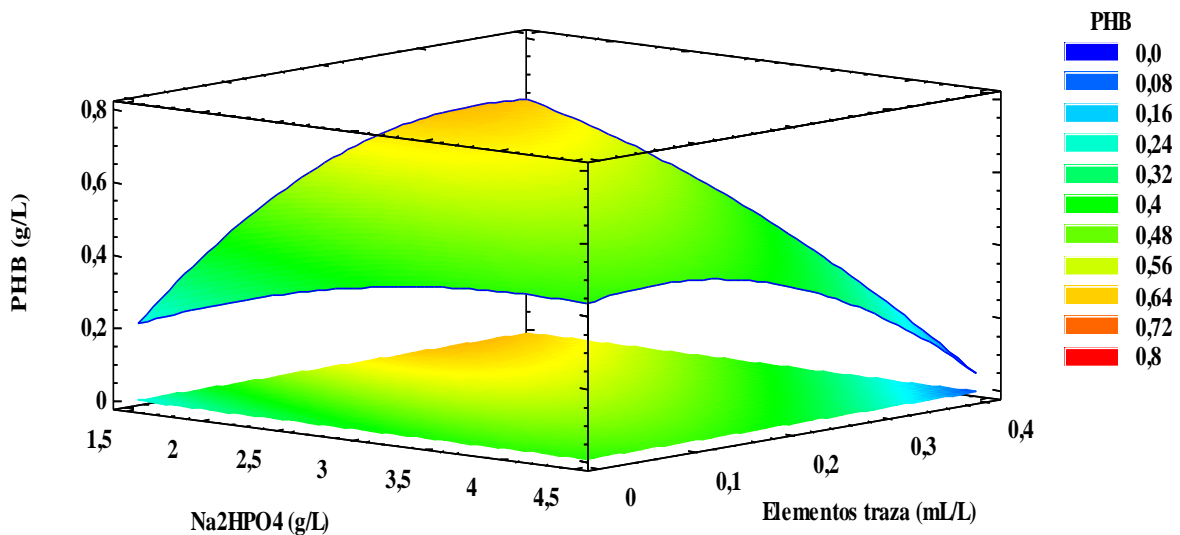


Figura 6. Superficie de respuesta del modelo DCC-2. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Figura 6 se observa que la mejor condición de PHB se encuentra con una concentración de 1.59 g/L de FAS y 0.34 mL/L de ET y en la Tabla 10 se reportan estos valores.

Tabla 10.

Valores para la mejor condición de producción de PHB.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
FAS (g/L)	1.59	4.41	1.59
ET (mL/L)	0.06	0.34	0.34
%Acumulación PHB			38.9% p/p

Nota: Datos suministrados por el Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 10, se muestra un porcentaje de acumulación de PHB del 38.9% p/p. Este porcentaje fue mayor al reportado en el estudio de Obruca (Obruca, I., Marova, S., Melusova, y Mravcova, L. 2011, p. 947–953), quienes utilizaron una cepa de *B. megaterium* CCM-2037, la cual presentó una acumulación máxima de PHB del 27,36% p/p en condiciones normales de cultivo. Por otra parte, Álvarez (Álvarez, 2015, p. 11) presenta un análisis de PHB usando como materias primas el glicerol, lactosa y lactosuero, obteniéndose porcentajes de acumulación de PHB del 62%, 76% y 70%, respectivamente. Otro estudio demuestra que usando *Ralstonia eutropha* ATCC 17697 para la producción de PHAs, se obtuvo un 66.2% de acumulación en peso seco (Barbosa, M., Espinosa, A., Malagón, D., y Moreno, N. 2005, p. 45-50).

Según los valores de la Tabla 10, en este punto el valor de la producción de PHB predicho por el modelo es 0.65 g/L a las 30 horas de fermentación. Este valor óptimo se puede observar en la

Figura 7, la cual presenta el contorno de la superficie de respuesta estimada para la producción de PHB a partir de la ecuación 3.

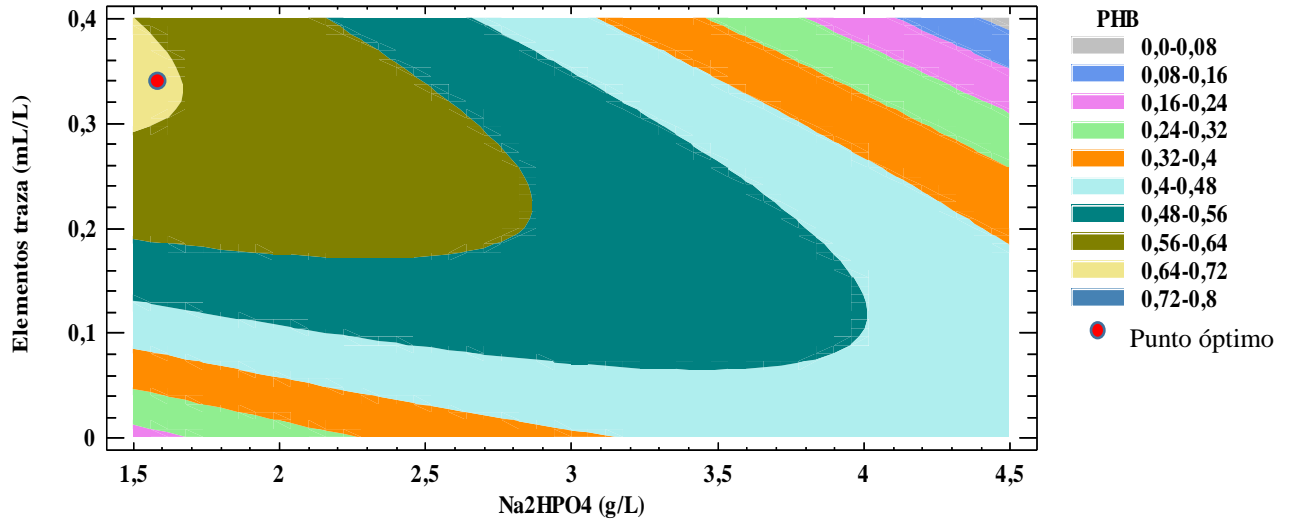


Figura 7. Contornos de la superficie de respuesta estimada del DCC-2. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

Adicionalmente, en la Figura 8 se observa el diagrama de Pareto, el cual, muestra las variables que tienen un efecto positivo o negativo en la producción de PHB en el DCC-2.

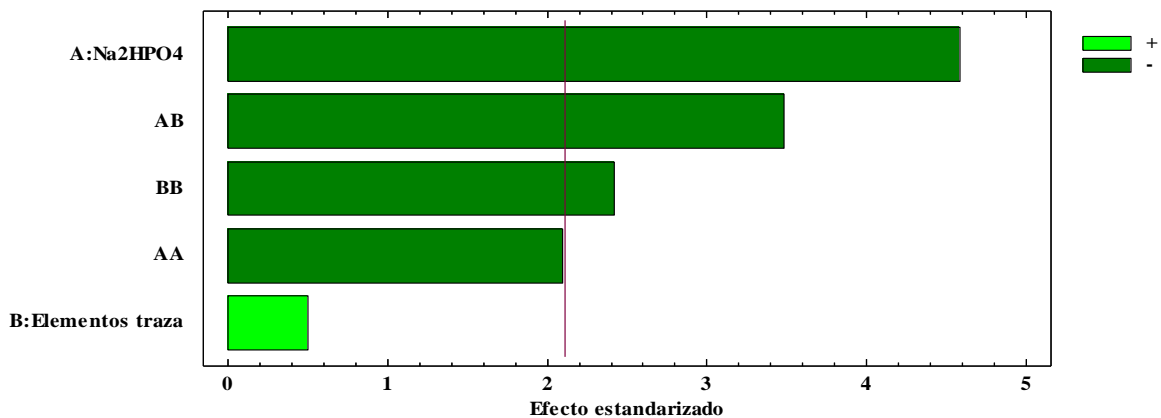


Figura 8. Diagrama de Pareto de los resultados del DCC-2. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

Según el diagrama de Pareto, los ET en bajas cantidades tienen un efecto positivo en la producción de PHB; mientras que, a mayores concentraciones de FAS la producción presentada de PHB disminuye.

El efecto negativo del fosfato ácido de sodio estudiado indica que la limitación de este nutriente es crítica para la producción de PHB. Este mismo resultado fue reportado por Vijayendra et al (Vijayendra et al. 2007p. 47) en una cepa nativa de *Bacillus*.

Además se analizaron estadísticamente otras variables: biomasa residual, porcentaje de acumulación intracelular de PHB, pH final, glicerol consumido y rendimiento de PHB respecto al glicerol.

Al realizar el análisis estadístico de biomasa residual indica que no es posible analizar el efecto que tienen estos factores, ya que los datos ajustados representan un estadístico de R^2 correspondiente a 67,33 %, el cual es un valor bajo para explicar la variabilidad en biomasa residual (ver Apéndice B.1).

Para el porcentaje de acumulación de PHB, los datos representan los ET tienen un efecto positivo, por su parte el FAS, los efectos de curvatura del FAS y los ET tuvieron un efecto negativo. El punto máximo para el porcentaje de acumulación de PHB se da con un valor de FAS de 2,8 g/L y ET de 0,26 mL/L. El análisis estadístico muestra que el ajuste de los datos reporta un R^2 de 71,09% para la variabilidad de los datos, lo cual es aceptable para describir el efecto del FAS y los ET sobre el porcentaje de acumulación de PHB (ver Apéndice B.2)

En el caso del pH este disminuye a medida que disminuye la concentración de FAS y en 0,2 mL/L de ET se encuentra el valor mínimo para esta variable, dependiendo el pH directamente de

la variación de la concentración de ET. El estadístico R^2 sobre el ajuste de los datos explica el 74,86% de la variabilidad en pH, lo cual es aceptable para describir el efecto del FAS y los ET sobre el pH. (Ver Apéndice B.3)

Para el glicerol consumido como el indicador R^2 explica el 32.07% de la variabilidad de los datos no es posible encontrar una relación de efecto entre el glicerol consumido y las variables del diseño. (Ver Apéndice B.4). Lo mismo sucede con el porcentaje de rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido en donde se obtuvo un R^2 de 42.91%.

5. Conclusiones

El efecto negativo que tiene el aumento de la fuente de fósforo indica que la limitación de este nutriente es crucial para la producción de PHB por *B. megaterium* B2, es por ello que al disminuir la concentración de fosfato ácido de sodio la producción de PHB se eleva.

Al reducir la proporción de elementos traza a un valor menor a 0.2 mL/L la producción del biopolímero se afecta negativamente pero a medida que este valor aumenta y se acerca a 0.33 mL/L se registra la máxima producción.

La máxima producción de polihidroxibutirato (PHB) se obtiene cuando se tienen las siguientes condiciones: 1.59 g/L de FAS y 0.33 mL/L de ET, en este punto el valor de la producción predicho por el modelo es de 0.65 g/L a las 30 horas de fermentación.

Referencias Bibliográficas

- Álvarez, C. (2015). Análisis de la producción de polihidroxibutirato usando lactosuero como materia prima (tesis de maestría). Universidad Nacional, Bogotá. 11.
- Barbosa, M., Espinosa, A., Malagón, D., y Moreno, N. (2005). Producción de poli-b-hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 10*, 45-54.
- Braunegg, G., Sonnleitner, B., y Lafferty, R. M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 6(1), 29.
- Cavaillé, L., Grousseau, E., Pocquet, M., Lepeuple, AS., Uribelarrea, JL., Hernandez, G., y Paul E. (2013). Polyhydroxybutyrate production by direct use of waste activated sludge in phosphorus-limited fed-batch culture. *Bioresource Technology*, 149, 301-309.
- Chávez, O., y Mancilla, H. (2007). Microorganismos De Interes Industrial Profesor, 3,29.
- Commision E. EC N° 282. (2008). On recycled plastic materials and articles intended to come into contact with foods and amending. *Official Journal of the European Union*. Recuperado de <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/282/oj>.
- Cuichán, G., y Remigio, I. (2015). Obtención de ácido poli láctico a partir de lactosuero para la fabricación de empaque primarios, 14.
- Cuz-M., Martinez, T., y Lopéz V. (2013). Biopolímeros y su integración con polímeros convencionales como alternativa de empaque de alimentos, 43.

- Dhangdhariya, J. H., Dubey, S., Trivedi, H. B., Pancha, I., Bhatt, J. K., Dave, B. P., y Mishra, S. (2015). Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's Dry Sea Mix as a novel growth medium. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 76, 254-261. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.009
- Duque, C., Oliveira, I., Carmo, A., Gouveia, F., Pardelha, A., Ramos, M., y Reis M. (2014). Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: Impact on polymer composition. *Biotechnol*, 31(0), 276–288.
- Franco, Y., Gómez, G., Núñez, R., y Martínez, J. (2008). Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de polihidroxibutirato por *Rhizobium tropici*, *Revista CENIC*, 40(1), 53-57.
- Gahlawat, G. y A.K. Srivastava. (2013). Development of a mathematical model for the growth associated Polyhydroxybutyrate fermentation by *Azohydromonas australica* and its use for the design of fed-batch cultivation strategies. *Bioresource Technology*, 137(0), 98-105.
- Khanna y Srivastava. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, *Process Biochemistry*, 40, 607-619.
- Gouda, M. K., Swellam, A. E., y 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, 201-207. doi:10.1078/0944-5013-00104
- Israni, N., y Shivakumar, S. (2015). Evaluation of Upstream Process parameters influencing the growth associated PHA accumulation in *Bacillus* sp. Ti3. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 74, 290-295.

- Kim, B., Lee, S., Lee, S., Chang, H., Chang y Seong Ihl, W. (1994). Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed- batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(9), 892-898.
- Koller M, Salerno A, Dias M, Reiterer A, Braunegg G. (2010). Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 255-269.
- Liu, Y., Huang, S., Zhang, Y., 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 (Elsevier)*, 26(7), 1453-1462. doi:10.1016/j.jes.2014.05.011
- Mahishi, Tripathi y Rawal. (2002). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: Effect of various carbon and nitrogen sources. Microbiological Research. *Plant Tissue Culture Division, National Chemical Laboratory*, 158, 19-27.
- Moreno, P., Yañez C., Cardozo, NS., Escalante, H., Combariza, MY., y Guzmán, 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. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. *New Biotechnology*, 32. Disponible en doi: <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.04.003>. 682-689.
- Naranjo, J., Posada, J., Higueta, J., y Cardona, C. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, 133, 38-45.

- Obruca, I., Marova, S., Melusova, y Mravcova, L. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037, *Ann. Microbiol.*, 61, 947–953.
- Pais, I., Farinha, F., Freitas, L., Serafim, S., Martínez, V., Martínez, J.,... Reis, M. (2014). Improvement on the yield of polyhydroxyalkanoates production from cheese whey by a recombinant *Escherichia coli* strain using the proton suicide methodology, 55, 151–158.
- Palazzo, G., y Eisenberg, P. (2014). Producción de PHB y evaluación del comportamiento térmico de compuestos con fibras de bagazo de caña de azúcar. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Industria. Plástica, Instituto Nacional de Tecnología Industrial. 13.
- Priyanka, S., y Bijender, K. (2015). Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PS 10. *The Journal of General and Applied Microbiology.* 81, 241-248.
- Prasad, A. S. Clinical. (2008). Immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc, 43, 370-377.
- Pulido, H., De la Vara, R., Cano, A., y Osorio, M. (2008). Análisis y diseño de experimentos. *McGraw-Hill.* 2, 394.
- Quagliano, J. (1998). Producción microbiológica del poliéster biodegradable poli-3-hidroxibutirato (PHB) a partir de *Azotobacter chroococcum* 6B, 6-7.
- Rivera, P., Claros, T., Torrico, E., S., Carballo, S., Van-Thuoc, D., y Quillaguamán, J. (2015). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis* in an air-lift reactor, 1-9.

- San Andrés, M., y De La Viña. (2004). Fundamentos de Química y Física para la Conservación y Restauración. Madrid: Síntesis, 293.
- Sayed, G., y Chincholkar. (2009). Hypochlorite digestion method for efficient recovery of PHB from *Alcaligenes faecalis*, *Indian J. Microbiol*, 49, 230-232.
- Shangkharak, K., y Prasertsan, P. (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(3), 173-182.
- Singh, G., Kumari, A., Mittal, A., Yadav, A., y Aggarwal, N. K. (2013). Poly β -Hydroxybutyrate Production by *Bacillus subtilis* NG220 Using Sugar Industry Waste Water. *BioMed Research International*, 1-10.
- Thirumala, M., Reddy, S., y Mahmood, S. (2008). Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus spp.* isolated from soil and activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37, 271-278.
- Verlinden, R. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., y Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal Of Applied Microbiology*, 102(6), 1437-1449.
- Vijayendra, S. N., Rastogi, N. K., Shamala, T. R., Anil Kumar, P. K., Kshama, L., y Joshi, G. J. (2007). Optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus sp.* CFR 256 with corn steep liquor as a nitrogen source. *Indian Journal Of Microbiology*, 47(2), 170-175. doi:10.1007/s12088-007-0033-7

Yezza, A., Halasz, A., Levadoux, W., y Hawari, J. (2007). Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 77(2), 269-274.

Apéndice A. Análisis estadístico del DCC-1

Apéndice A.1. Análisis estadístico biomasa residual del DCC-1.

Tabla 11.

Anova para biomasa residual del DCC-1.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A:ET (mL/L)	0.02551	1	0.02551	0.08	0.7823
B: FAS (g/L)	0.00709	1	0.00709	0.02	0.8841
AA	1.53643	1	1.53643	4.75	0.0437
AB	0.72401	1	0.72401	2.24	0.1530
BB	0.22120	1	0.22120	0.68	0.4198
Error total	5.50093	17	0.32358		
Total (corr.)	7.87085	23			

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 11, se muestra el Anova para biomasa residual del DCC-1, dónde observa que el efecto de curvatura de los ET es el único que tiene efecto sobre la biomasa residual ($P < 0.05$). El indicador R^2 explica el 30.11% de la variabilidad de biomasa residual, al ser tan bajo no es posible encontrar una relación de efecto entre la biomasa residual y las variables del diseño.

Apéndice A.2. Análisis estadístico porcentaje de acumulación de PHB del DCC-1.

Tabla 12

Anova para porcentaje de acumulación de PHB del DCC-1.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A: FAS(g/L)	83.9098	1	83.9098	36.92	0.0000
B: ET (mL/L)	44.6586	1	44.6586	19.65	0.0004
AA	3.3940	1	3.3940	1.49	0.2384
AB	54.9145	1	54.9145	24.16	0.0001
BB	21.5271	1	21.5271	9.47	0.0068
Error total	38.6351	17	2.2727		
Total (corr.)	7.8709	23			

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 12 se muestra el Anova para el porcentaje de acumulación de PHB del DCC-1, se observa que el efecto FAS, los ET, el efecto de interacción entre estos dos factores y el efecto de curvatura de los ET, son significativos para la acumulación intracelular de PHB ($P < 0.05$), mientras que el efecto de curvatura del FAS no es significativo ($P > 0.05$).

En la Figura 9 se muestra el diagrama de Pareto del porcentaje de acumulación del PHB del DCC-1, en el cual se representa la comparación de estos efectos. El FAS, los ET y el efecto de curvatura de los ET, tuvieron un efecto negativo sobre el porcentaje de acumulación intracelular de PHB, por su parte la interacción de estos dos factores y el efecto de curvatura del FAS tuvieron un efecto positivo.

La limitación de FAS y la reducción de los ET favorecen la acumulación de PHB en el interior de la bacteria, igualmente como pasa con la producción de PHB.

El R^2 ajustado para estos valores explica 84.76% de la variabilidad de los datos, lo cual es aceptable (Pulido et al., 2008), para describir el efecto que tiene el FAS y los ET sobre el porcentaje de acumulación intracelular de PHB.

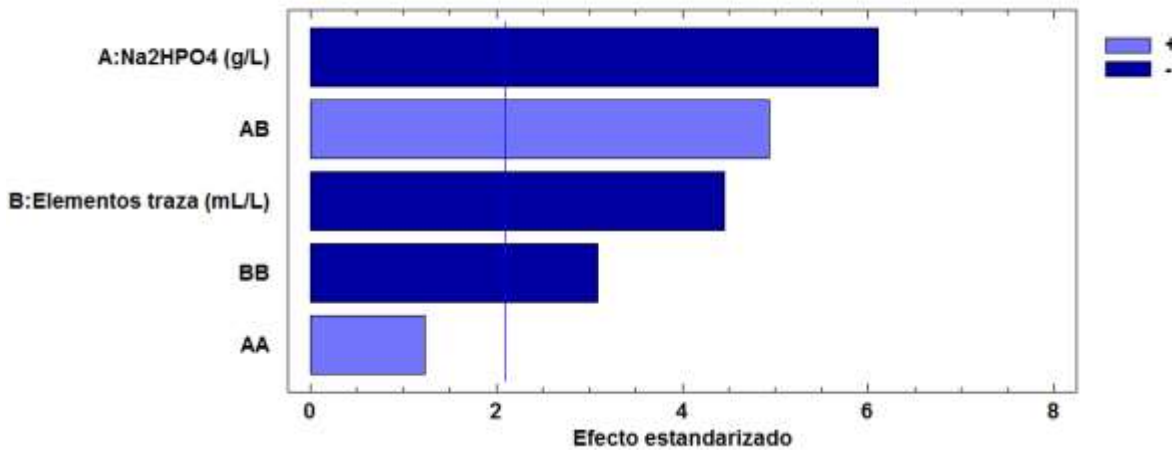


Figura 9. Diagrama de Pareto del porcentaje de acumulación del PHB del DCC-1. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Figura 10 se presentan los contornos de la superficie de respuesta para el porcentaje de acumulación de PHB. Se puede apreciar que a bajas concentraciones de FAS y ET se favorece la acumulación intracelular de PHB, como también lo describe el diagrama de Pareto. Se muestra una tendencia similar con la producción de PHB evaluando los efectos del FAS y los ET

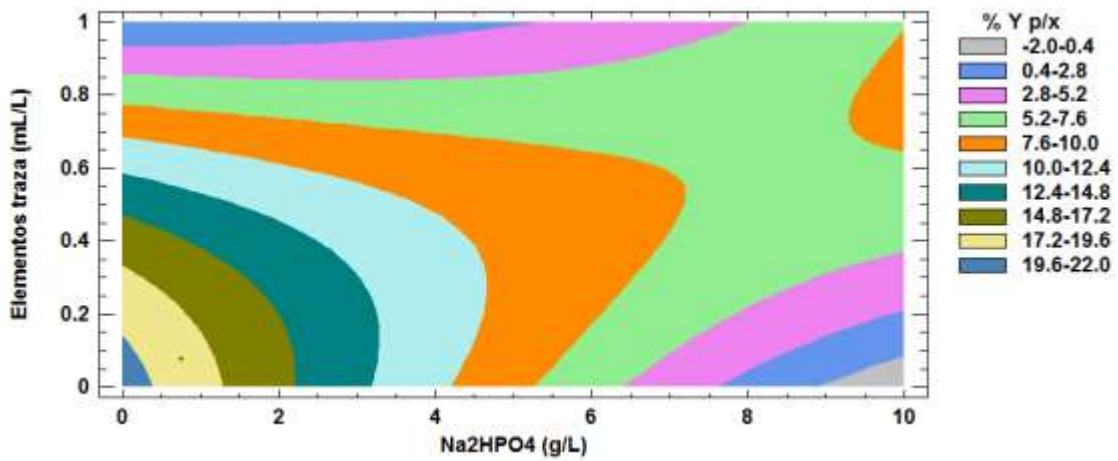


Figura 10. Contornos de la superficie de respuesta para el porcentaje de acumulación de PHB del DCC-1. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

Apéndice A.3. Análisis estadístico pH del DCC-1.

Tabla 13.

Anova para el pH del DCC-1.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A:FAS (g/L)	3.0573	1	3.0573	29.09	0.0000
B: ET(mL/L)	3.2633	1	3.2633	31.05	0.0000
AA	1.2288	1	1.2288	11.69	0.0033
AB	1.7233	1	1.7233	16.40	0.0008
BB	0.5427	1	0.5427	5.16	0.0363
Error total	1.7867	17	0.1051		
Total (corr.)	12.0729	23			

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 13 se muestra el Anova para el pH del DCC-1, se observa que el FAS, los ET, la interacción entre estos dos factores, el efecto de curvatura de los ET y el efecto de curvatura del FAS, tienen efecto sobre la acumulación intracelular de pH ($P < 0.05$).

En la Figura 11 se muestra el diagrama de Pareto en el cual se representa la comparación de estos efectos. El FAS, los ET y el efecto de curvatura del FAS tuvieron un efecto positivo sobre el pH, por su parte la interacción de estos dos factores y el efecto de curvatura de los ET tienen un efecto negativo.

El R^2 ajustado para la tendencia de estos valores explica el 85.20% de la variabilidad en pH. Este valor es confiable ya que es mayor al 70% (Pulido et al., 2008).

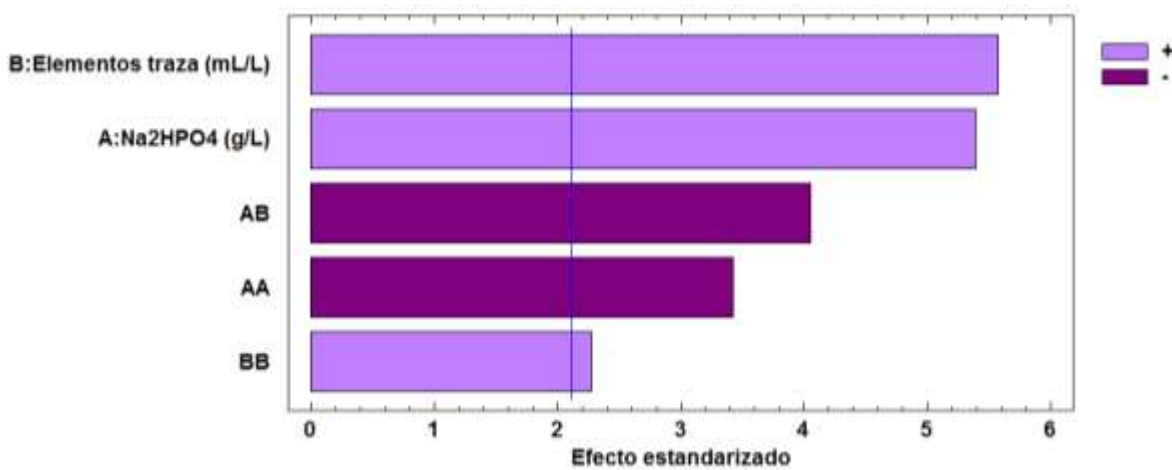


Figura 11. Diagrama de Pareto para el pH del DCC-1. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Figura 12 se presentan los contornos de la superficie de respuesta para el pH del DCC-1. Se puede apreciar que a bajas concentraciones de FAS y ET el pH disminuye, como también lo

describe el diagrama de Pareto. Como es de apreciar, hay una concordancia entre la mayor producción de PHB y los valores más bajos de pH alcanzados

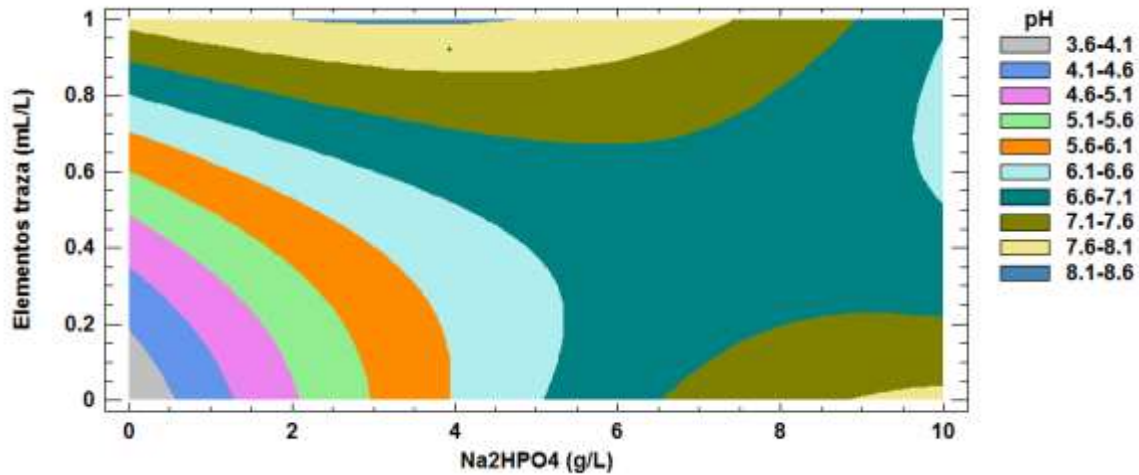


Figura 12. Contornos de la superficie de respuesta para el pH del DCC-1. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

Apéndice A.4 Análisis estadístico glicerol consumido del DCC-1

Tabla 14.

Anova para glicerol consumido del DCC-1.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A: FAS (g/L)	0.80927	1	0.80927	1.20	0.2880
B: ET(mL/L)	0.76402	1	0.76402	1.14	0.3014
AA	0.15096	1	0.15096	0.22	0.6417
AB	0.27246	1	0.27246	0.41	0.5330

BB	5.2332	1	5.23325	7.78	0.0126
Error total	11.4342	17	0.67260		
Total (corr.)	19.6918	23			

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 14, se muestra el Anova para glicerol consumido del DCC-1, donde muestra que el efecto de curvatura de los ET es el único que tiene efecto significativo sobre el glicerol consumido ($P < 0.05$). El indicador R^2 explica el 41.93% de la variabilidad de glicerol consumido y no es posible analizar el glicerol consumido afectado por los ET y el FAS.

Apéndice A.5. Análisis estadístico rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido del DCC-1

Tabla 15.

Anova para porcentaje de rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido del DCC-1.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A:FAS (g/L)	29.6551	1	29.6551	0.09	0.7620
B: ET (mL/L)	73.9255	1	73.9255	0.24	0.6332
AA	4.2334	1	4.2334	0.01	0.9088
AB	20.2824	1	20.2824	0.06	0.8021
BB	539.6100	1	539.6100	1.72	0.2066
Error total	5320.1400	17	312.9500		
Total (corr.)	6217.2200	23			

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 15, se muestra el Anova para el porcentaje de rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido (% Yp/s) del DCC-1, dónde muestra que las variables evaluadas no tienen efecto significativo sobre el % Yp/s ($P > 0.05$). El indicador R^2 explica el 14.43% de la variabilidad en % Yp/s y no es posible analizar el % Yp/s afectado por los ET y el FAS.

Apéndice B. Análisis estadístico biomasa residual DCC-2

Apéndice B.1. Análisis estadístico biomasa residual DCC-2

Tabla 16

Anova para biomasa residual del DCC-2.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A:FAS (g/L)	0.16589	1	0.16589	0.91	0.3530
B: ET (mL/L)	3.21302	1	3.21302	17.67	0.0006
AA	0.59417	1	0.59417	3.27	0.0884
AB	1.73559	1	1.73559	9.54	0.0067
BB	0.90471	1	0.90471	4.97	0.0395
Error total	3.09207	17	0.18189		
Total (corr.)	9.46476	23			

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 17, se muestra el Anova para la biomasa residual del DCC-1, dónde los ET, la interacción entre los ET y el FAS y el efecto de curvatura de los ET tienen efecto sobre la

biomasa residual ($P < 0.05$), mientras que el FAS y su efecto de curvatura no tienen un efecto significativo ($P > 0.05$).

El estadístico R^2 sobre el ajuste de los datos explica el 67.33% de la variabilidad en la biomasa residual, el cual es bajo para describir el efecto del FAS y los ET sobre la biomasa residual.

Apéndice B.2. Análisis estadístico porcentaje de acumulación de PHB DCC-2

Tabla 17.

Anova para porcentaje de acumulación de PHB del DCC-2.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A: FAS (g/L)	83.2092	1	83.2092	6.05	0.0243
B: ET (mL/L)	292.7660	1	292.7660	21.28	0.0002
AA	122.2480	1	122.2480	8.89	0.0080
AB	10.1363	1	10.1363	0.74	0.4020
BB	145.0700	1	145.0700	10.54	0.0045
Error total	247.6580	18	13.7588		
Total (corr.)	856.7370	23			

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 17, se muestra el Anova para el porcentaje de acumulación de PHB del DCC-2, dónde el FAS, los ET, el efecto de curvatura del FAS y de los ET, tienen efecto sobre el

porcentaje de acumulación de PHB ($P < 0.05$). Se observa también que la interacción entre el FAS y los ET no tienen un efecto significativo sobre el porcentaje de acumulación de PHB. ($P > 0.05$)

En la Figura 13, se muestra el diagrama de Pareto para el porcentaje de acumulación de PHB, en el cual se representa la comparación de estos efectos. Los ET, tuvieron un efecto positivo sobre el porcentaje de acumulación de PHB, por su parte el FAS, los efectos de curvatura del FAS y los ET tuvieron un efecto negativo.

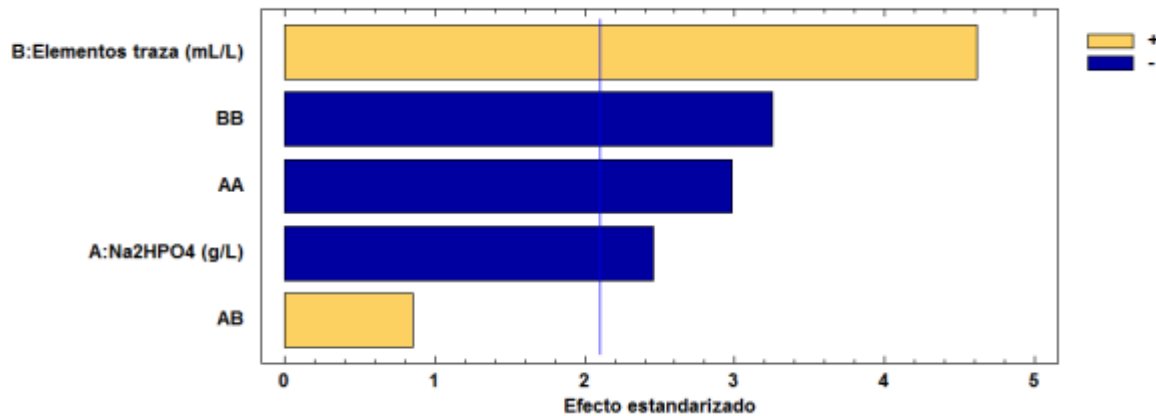


Figura 13. Diagrama de Pareto para el porcentaje de acumulación de PHB del DCC-2. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

En Figura 14, se muestran los contornos de la superficie de respuesta para el porcentaje de acumulación de PHB del DCC-2, se puede apreciar un máximo para el porcentaje de acumulación de PHB con FAS de 2.8 g/L y ET de 0.26 mL/L.

El estadístico R^2 sobre el ajuste de los datos explica el 71.09% de la variabilidad en el porcentaje de acumulación de PHB, lo cual es aceptable para describir el efecto del FAS y los ET sobre el porcentaje de acumulación de PHB.

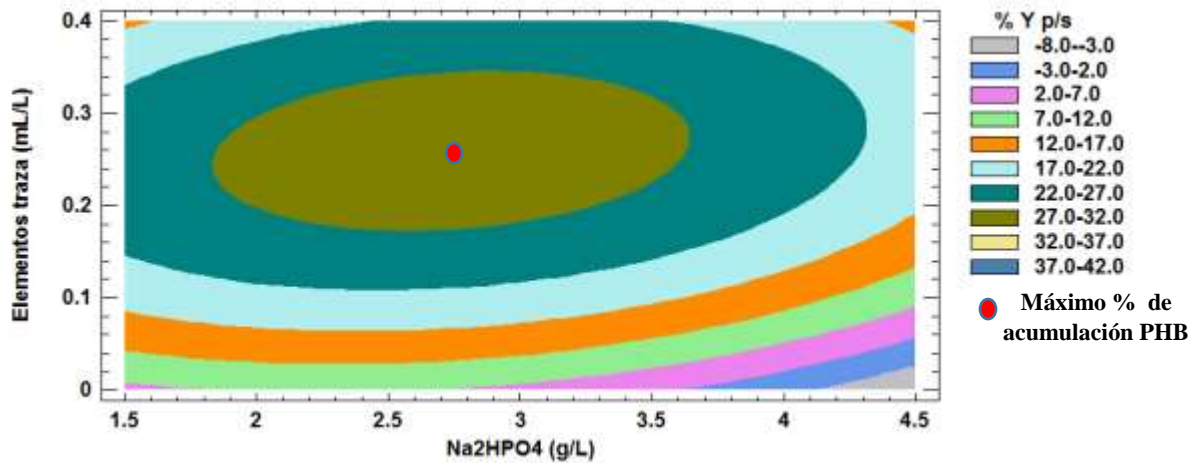


Figura 14. Contornos de la superficie de respuesta para el porcentaje de acumulación de PHB del DCC-2. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

Apéndice B.3. Análisis estadístico pH del DCC-2

Tabla 18.

Anova para pH del DCC-2.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A: FAS (g/L)	2.8334	1	2.8334	40.54	0.0000
B: ET (mL/L)	0.0483	1	0.0483	0.69	0.4175
AA	0.0512	1	0.0512	0.73	0.4042
AB	0.0843	1	0.0843	1.21	0.2875
BB	0.3733	1	0.3733	5.34	0.0336
Error total	1.1882	17	0.0699		

Total (corr.)	4.7267	23			
----------------------	--------	----	--	--	--

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 18, se muestra el Anova para el pH del DCC-2, dónde se aprecia que el FAS y el efecto de curvatura de los ET, tienen efecto sobre el pH ($P < 0.05$). Se observa también que los ET, la interacción entre el FAS y los ET y el efecto de curvatura del FAS no tienen un efecto significativo sobre el pH ($P > 0.05$).

En la Figura 15, se muestra el diagrama de Pareto para el pH, en el cual se representa la comparación de estos efectos. El FAS, los ET, los efectos de curvatura de los ET y la interacción entre el FAS y los ET, tuvieron un efecto positivo sobre el pH, por su parte el efecto de curvatura del FAS tuvo un efecto negativo.

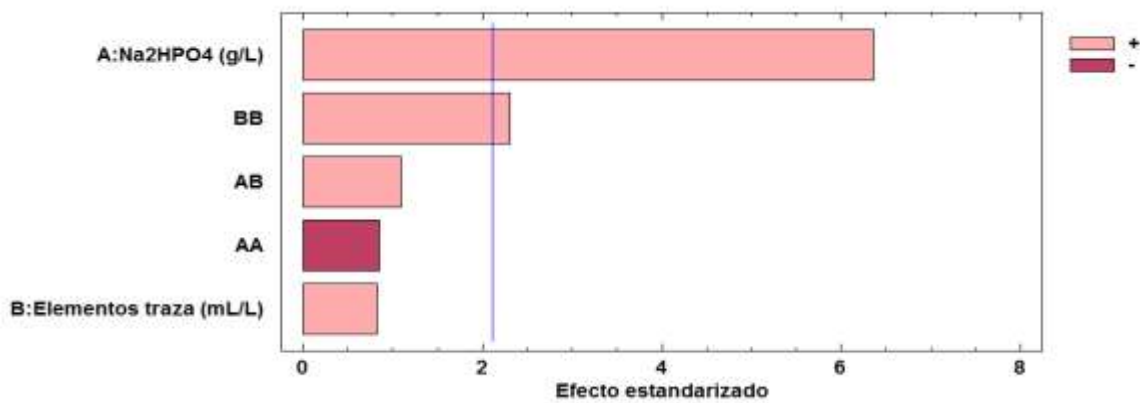


Figura 15. Diagrama de Pareto para el pH del DCC-2. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

En Figura 16 se muestran los contornos de la superficie de respuesta para el pH del DCC-2, se puede apreciar que el pH disminuye a medida que disminuye la concentración de FAS y que en 0.2 mL/L de ET se encuentra un mínimo para pH, aumentando o disminuyendo progresivamente el pH si los ET suben o bajan de esa concentración.

El estadístico R^2 sobre el ajuste de los datos explica el 74.86% de la variabilidad en pH, lo cual es aceptable para describir el efecto del FAS y los ET sobre el pH.

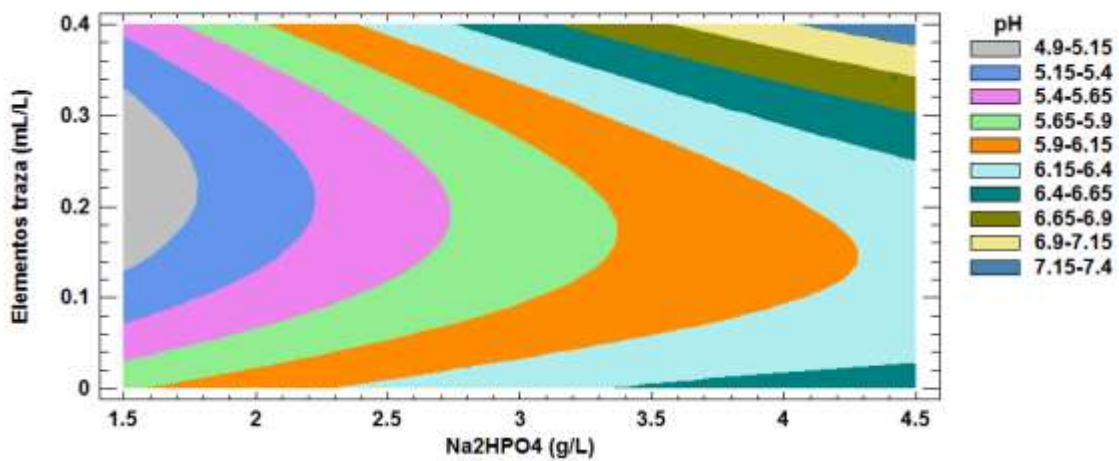


Figura 16. Contornos de la superficie de respuesta para el pH del DCC-2. Nota: Grafica elaborada en el Software Statgraphics Centurion 16.2.

Apéndice B.4 Análisis estadístico glicerol consumido del DCC-2

Tabla 19.

Anova para glicerol consumido del DCC-2.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A: FAS (g/L)	3.54557	1	3.54557	0.22	0.6424
B: ET (mL/L)	39.6338	1	39.6338	2.50	0.1324
AA	81.3622	1	81.3622	5.13	0.0369
AB	0.0219273	1	0.0219273	0.00	0.9708
BB	0.0301043	1	0.0301043	0.00	0.9658
Error total	269.722	17	15.866		
Total (corr.)	397.055	23			

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 19, se muestra el Anova para glicerol consumido del DCC-2, dónde observa que el efecto de curvatura del FAS, tiene efecto significativo sobre el glicerol consumido ($P < 0.05$). El indicador R^2 explica el 32.07% de la variabilidad de glicerol consumido, por lo tanto, no es posible encontrar una relación de efecto entre el glicerol consumido y las variables del diseño.

Apéndice B.5. Análisis estadístico rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido del DCC-2.

Tabla 20.

Anova para porcentaje de rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido del DCC-2.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A: ET (mL/L)	146.266	1	146.266	7.85	0.0122
B: FAS (g/L)	0.999651	1	0.999651	0.05	0.8196
AA	4.30877	1	4.30877	0.23	0.6367
AB	14.2829	1	14.2829	0.77	0.3934
BB	51.1993	1	51.1993	2.75	0.1157
Error total	316.641	17	18.626		
Total (corr.)	554.649	23			

Nota: Datos obtenidos a partir del Software Statgraphics Centurion 16.2.

En la Tabla 20, se muestra el Anova para rendimiento de PHB respecto a glicerol consumido del DCC-2, donde observa que los ET son los únicos que tienen efecto significativo sobre el rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido ($P < 0.05$). El indicador R^2 explica el 42.91% de la variabilidad de rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido, por lo tanto, no es posible encontrar una relación de efecto entre el rendimiento de PHB respecto al glicerol consumido y las variables del diseño.