

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Ajuste de las condiciones nutricionales del medio de cultivo en la producción de polihidroxibutirato (PHB) por *Bacillus megaterium* B2 a partir de residuos líquidos de cacao

Érika Shirley Mesa Beltrán y Sara Paola Romero Isaza

Trabajo de Grado para Optar el título de Ingeniero Químico

Director

Mabel Juliana Quintero Silva

Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas

Codirector

Luis Enrique Lambis Benítez

Ingeniero químico, Mag. Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2021

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Tabla de contenido

Introducción.....	10
1. Objetivos.....	13
1.1 Objetivo General	13
1.2 Objetivos Específicos	13
2. Estado del arte.....	14
2.1 Generalidades del cacao	14
2.2 Polihidroxicarboxilatos	15
2.3 Generalidades del microorganismo	18
3. Metodología.....	20
3.1 Selección de condiciones iniciales	21
3.1.1 Selección de tiempo de operación.....	21
3.1.3 Selección de proporción de mezcla del medio de cultivo.....	23
3.2 Producción de PHB con la relación C/N establecida a diferentes concentraciones de sales minerales.....	23
3.3 Diseño de experimentos.....	24
3.4 Cuantificación de biomasa, PHB y consumo de sustrato	25
3.4.1 Biomasa	25
3.4.2 PHB	25
3.4.3 Consumo de sustrato.....	26

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

4. Resultados.....	27
4.1 Selección de condiciones iniciales	27
4.1.1 Selección de tiempo de operación.....	27
4.1.2 Revisión bibliográfica y selección de una relación C/N reportada por otros autores como las más adecuadas para <i>Bacillus megaterium</i>	29
4.1.3 Selección de proporción de mezcla del medio de cultivo.....	30
4.2 Producción de PHB con la relación C/N establecida a diferentes concentraciones de microelementos.....	33
4.3 Diseño de experimentos.....	35
5. Conclusiones	40
6. Recomendaciones.....	41
Referencias bibliográficas	43
Apéndices	47

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Lista de tablas

Tabla 1. Caracterización química de los residuos líquidos provenientes de la agroindustria del cacao.....	15
Tabla 2. Ensayos realizados variando la concentración de sales	24
Tabla 3. Diseño Central Compuesto	25
Tabla 4. Concentraciones máximas y rendimiento ensayo de 72 horas.....	28
Tabla 5. Relación C/N para otros autores.....	30
Tabla 6. Valores máximos de los ensayos según la relación de concentración de medios	32
Tabla 7. Valores máximos de los ensayos según el factor de concentración de sales	33
Tabla 8. Valores de concentraciones máximas, concentración final y rendimiento para los ensayos del diseño experimental.....	36

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Lista de figuras

Figura 1. Estructura general PHAs, ejemplos, nomenclatura y símbolo según posición cadena lateral (R).....	17
Figura 2. Etapas metodológicas	20
Figura 3. Procedimiento ilustrado del cultivo por lotes para <i>B. megaterium</i> B2	22
Figura 4. Curva de crecimiento de <i>B. megaterium</i> para ensayo de 72 horas	28
Figura 5. Curva de crecimiento para el ensayo de concentración de medios 47:53	31
Figura 6. Curva de crecimiento para el ensayo de concentración de medios 33:33:33	31
Figura 7. Concentración final de PHB para cada factor de sales.....	34
Figura 8. Diseño Central Compuesto	35
Figura 9. Comparación de concentración máxima alcanzada por otros autores.....	37
Figura 10. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados	37
Figura 11. Gráfica de contorno Concentración final de PHB.....	38
Figura 12. Superficie Concentración final de PHB	39

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Lista de Apéndices

Apéndice A. Líquido residual lixiviado.	47
Apéndice B. Líquido residual de producción de celulosa.	47
Apéndice C. Ejemplo de PHB producido por <i>Bacillus megaterium</i> B2 a partir de residuos líquidos de la agroindustria del cacao.....	48
Apéndice D. <i>Bacillus megaterium</i> B2.....	48
Apéndice E. Vías metabólicas que suministran monómeros para la síntesis de PHA. Tomado de Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates (p.581) por T. Tsuge, 2002, Journal of Bioscience and Bioengineering, 94 (6).....	49
Apéndice F. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 10 y factor de concentración de sales 0.5	50
Apéndice G. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 10 y factor de concentración de sales 1.25	50
Apéndice H. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 10 y factor de concentración de sales 2	51
Apéndice I. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 10 y factor de concentración de sales 0.75	51
Apéndice J. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 10 y factor de concentración de sales 1	52
Apéndice K. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 6.89 y factor de concentración de sales 0.88	52

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Apéndice L. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 17.5 y factor de concentración de sales 0.7	53
Apéndice M. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 17.5 y factor de concentración de sales 0.88	53
Apéndice N. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 17.5 y factor de concentración de sales 1.05	54
Apéndice O. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 25 y factor de concentración de sales 0.75	54
Apéndice P. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 25 y factor de concentración de sales 1.	55
Apéndice Q. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 28.11 y factor de concentración de sales 0.88	55

Resumen

Título Ajuste de las condiciones nutricionales del medio de cultivo en la producción de polihidroxibutirato (PHB) por *Bacillus megaterium* B2 a partir de residuos líquidos de cacao*

Autores Érika Shirley Mesa Beltrán; Sara Paola Romero Isaza **

Palabras clave: Polihidroxibutirato, residuos líquidos de cacao, *Bacillus megaterium* B2

Descripción:

El polihidroxibutirato (PHB) es un biopolímero de origen bacteriano que se ha planteado como un material alternativo a los plásticos convencionales, debido a sus características fisicoquímicas similares. Sin embargo, su industrialización se ha visto obstaculizada por los altos costos y la baja productividad. En esta investigación se reaprovecharon los azúcares presentes en los residuos líquidos provenientes de la agroindustria del cacao para la producción de PHB usando la cepa *Bacillus megaterium* B2. Se determinaron las condiciones nutricionales del medio de cultivo que permitieron una mayor acumulación de PHB, tales como: duración del ensayo, proporción de mezcla de residuos líquidos y, por medio de un diseño de experimentos de composición central, la relación C/N y la concentración del medio básico de sales; alcanzando un incremento para una relación C/N de 6.89 y un factor de concentración de sales de 1.05. Se analizó el consumo del sustrato por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y, usando la técnica de peso seco y el método de extracción SDS-Sonicación, se construyeron las curvas de crecimiento de biomasa y acumulación de PHB. Se logró alcanzar una concentración final de PHB de 11.6283 g/L, lo cual representa un aumento de 82.8% respecto a investigaciones anteriores.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: M. Sc. Mabel Juliana Quintero Silva, Mag. Luis Enrique Lambis Benitez

Abstract

Title Adjustment of the nutritional conditions of the culture medium in the production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus megaterium* B2 from liquid cocoa wastes *

Authors Érika Shirley Mesa Beltrán; Sara Paola Romero Isaza **

Keywords: Polyhydroxybutyrate, liquid cocoa waste, *Bacillus megaterium* B2

Description:

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biopolymer of bacterial origin that has been proposed as an alternative material to conventional plastics, due to its similar physicochemical characteristics. However, its industrialization has been hampered by high costs and low productivity. In this research, the sugars present in liquid waste from the cocoa agroindustry were reused to produce PHB using the *Bacillus megaterium* B2 strain. The nutritional conditions of the culture medium that allowed a greater accumulation of PHB were determined, such as: duration of the trial, mixing ratio of liquid waste and, through a Central Composite Design's, the C/N ratio and the concentration of the basic medium of salts; reaching an increase for a C/N ratio of 6.89 and a salt concentration factor of 1.05. Substrate consumption was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and, using the dry weight technique and the SDS-Sonication extraction method, the biomass growth and PHB accumulation curves were constructed. A final PHB concentration of 11.6283 g/L was achieved, which represents an increase of 82.8% compared to previous research.

*Bachelor Thesis

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: M. Sc. Mabel Juliana Quintero Silva, Mag. Luis Enrique Lambis Benitez

Introducción

La acumulación de plásticos en el ambiente es una problemática mundial que requiere atención inmediata por parte de los gobiernos y empresas. La producción global de resinas plásticas para el año 2018 fue de 359 millones de toneladas (PlasticsEurope/Association of Plastics Manufacturers 2020); de las cuales en Colombia se produjeron 1.280.000 y se importaron 792.640 toneladas (GQSP Colombia 2020). Debido a que el país no cuenta con una política de regulación específica para este tipo de material, los destinos finales para la acumulación de los desechos plásticos y micro plásticos son los rellenos sanitarios y los ecosistemas marinos y costeros, los cuales tendrán presencia de estos materiales durante al menos 500 años, tiempo que tardan en degradarse (Greenpeace 2017). Se presume que la producción global de poliésteres incrementa en los próximos años, aumentando a su vez los desechos de estos materiales, lo cual, conllevaría un impacto ambiental con consecuencias más graves de las causadas hasta el momento. Es por ello que se hace necesario promover la investigación científica en el campo de producción de materiales alternativos como los polihidroxialcanoatos (PHAs) que comparten características similares a los plásticos convencionales.

Los PHAs son biopolíesteres producidos por fermentación bacteriana de forma intracelular que, una vez extraídos, presentan propiedades físicas semejantes a materiales como el polietileno y el polipropileno, pero son biodegradables, biocompatibles y de origen renovable (Sánchez Safont, 2019). Los microorganismos que son capaces de sintetizar este biopolímero lo hacen en condiciones de estrés como una reserva de energía y carbono, bajo limitaciones ya sea de nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio u oxígeno. Debido a sus características, este polímero tiene potencial de aplicación en la industria de empaques, medicina, farmacia, pinturas y alimentos

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

(González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013). Sin embargo, la producción de este biomaterial se ha visto afectada debido a los altos costos de producción; por esta razón, se han desarrollado procesos usando materias primas no convencionales, tales como: aguas residuales domésticas (Ceyhan & Ozdemir, 2011), glicerol crudo (Mothes, Schnorpfeil, & Ackermann, 2007), melaza de caña de azúcar y licor de maíz (Gouda, Swellam, & Omar, 2001), entre otros.

Debido al requerimiento de nuevas fuentes de carbono, se han considerado los residuos líquidos de mucílago provenientes de la agroindustria del cacao como una materia prima prometedora para la obtención de PHA debido a su composición fisicoquímica. El mucílago del cacao es una pulpa blancuzca rica en azúcares, pectina, ácido cítrico y sales; que se suele utilizar en la fabricación de productos alimenticios como: arequipe, jalea, licores, entre otros. Sin embargo, el mucílago se fermenta durante los primeros dos días, a partir de los cuales la biomasa microbiana transforma el alcohol en ácido acético; impidiendo su uso en la industria alimentaria (Arteaga Estrella, 2013). Este inconveniente, resulta en el descarte de más de 70 litros por tonelada de este material, es decir, la pérdida de materia prima con potencial uso en bioprocesos (Vallejo et al., 2016).

En el año 2019, se investigó la producción de PHB usando *Bacillus megaterium* B2 y residuos líquidos provenientes de la agroindustria del cacao, (Suarez Gamboa, 2019) (Suárez Rodríguez, 2019). Sin embargo, el rendimiento de producción de polímero no resultó satisfactorio, la concentración máxima de biopolímero fue de 4 g/L y la final fue de 2 g/L para el ensayo con mayor crecimiento de biomasa y acumulación de PHB. Por lo cual se hace necesario revisar ¿Cómo es posible aumentar la acumulación de PHB en este bioproceso?

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo propuso ajustar, por medio de un diseño de experimentos de composición central, la relación carbono-nitrógeno (C/N) y la concentración de sales minerales como variables claves y prometedoras para el mejoramiento de la producción de PHB. Debido a que ya se ha demostrado que *Bacillus megaterium* B2 tiene necesidades específicas de composición del medio de cultivo para favorecer su crecimiento y consecuente acumulación intracelular de dicho biopolímero. Para tales propósitos, se implementó la técnica analítica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para comprobar el comportamiento del consumo del sustrato. Se usó la técnica de peso seco para determinar la cantidad de biomasa y de polímero producido. Para la extracción del biopolímero se realizaron lavados con dodecilsulfato sódico (SDS) y el proceso de sonicación que permitía romper las membranas celulares de las bacterias y liberar fácilmente el contenido celular de PHB. Siendo este un proceso económico y seguro para el medio ambiente.

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar las condiciones nutricionales del medio de cultivo que reporten el mejor desempeño de producción de PHB, mediante la realización de un diseño de experimentos de composición central, usando como sustrato los residuos líquidos provenientes de la agroindustria del cacao.

1.2 Objetivos Específicos

Identificar la proporción de mezcla del medio de cultivo y la relación C/N adecuadas en el proceso de producción de PHB usando *Bacillus megaterium* B2.

Evaluar la concentración de sales minerales que mejoren el desempeño de *B. megaterium* B2 en el proceso de producción de PHB con la relación C/N establecida.

Analizar el efecto de la interacción de la relación de C/N y concentración de sales minerales en el desempeño de producción de PHB por medio de un diseño de experimentos de composición central.

2. Estado del arte

2.1 Generalidades del cacao

El árbol del cacao (*Theobroma cacao* L.) pertenece a la familia Malvaceae subfamilia Sterculiaceae, incluye diversas variedades, formas y subespecies (Waizel, Waizel, Magaña, Campos, & San Esteban, 2012). En la última década, la producción colombiana de cacao pasó de 36.118 toneladas para el año 2009 a 59.740 toneladas para el año 2019, concentrándose principalmente en Santander con un 42%, Antioquia con 9% y Arauca con 8% (Fedecacao, 2020). La forma y tamaño del fruto del cacao varía de acuerdo con la especie y variedad, es una mazorca conformada por una cascara carnosa y gruesa, y semillas o granos rodeados de una pulpa cremosa y azucarada llamada mucílago (Barro Nieves, 1981).

El mucílago absorbe agua que protege a las semillas en tiempo de sequía y que además, ayuda en su germinación. Una vez separados los granos de las mazorcas, la fermentación del mucílago desprende un líquido residual lixiviado (LRL) de color amarillo pálido (ver Apéndice A) el cual resulta descartado como residuo en el proceso de aprovechamiento de la semilla, este funciona como sustrato a los microorganismos responsables del sabor y aroma característicos de los granos de cacao (Sarmiento Suárez, 2018). Este residuo está compuesto por sustancias de alto interés nutricional que pueden ser aprovechados, tales como: fibra, algunos minerales esenciales (K, Fe, Mg, P), glucosa, fructosa y sacarosa, fenoles, nitrógeno, grasas, ácidos orgánicos (láctico, acético y crítico) y proteínas (Durán Riveros & Cabezas Calderón, 2019).

En el marco del desarrollo de procesos biotecnológicos por parte del Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales CEIAM de la Universidad Industrial de Santander, para el año 2019, se adelantó una investigación en la cual se logró producir celulosa bacteriana a partir de mucílago de cacao fresco suplementado con una fuente de nitrógeno (peptona). La celulosa es formada como

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

una película sobre los medios líquidos y al finalizar la fermentación oxidativa de los azúcares, este medio líquido residual de producción de celulosa (LRPC) es descartado como residuo (ver Apéndice B). No obstante, este LRPC al finalizar el proceso, todavía tiene un importante contenido de carbohidratos (fructosa, glucosa y sacarosa), metales (Ca, K, Na y Al) y compuestos provenientes del metabolismo del microorganismo al producir el polímero que pueden ser aprovechados en un bioproceso (Durán Riveros & Cabezas Calderón, 2019).

Debido a lo anterior, en una investigación consecutiva, en el año 2019, se demostró que el LRPC en combinación con el LRL son líquidos residuales que pueden ser aprovechados para la producción de PHB usando *Bacillus megaterium* B2 (Suárez Rodríguez, 2019) (Suarez Gamboa, 2019).

Tabla 1

Caracterización química de los residuos líquidos provenientes de la agroindustria del cacao

Compuesto	LRPC [g/L]	LRL [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: Tomado de Tomado de (Suárez Rodríguez, 2019). Producción de polihidroxialcanoatos a partir de residuos de la fermentación del cacao usando *Bacillus megaterium* B2. (Tesis de pregrado), Universidad Industrial de Santander

2.2 Polihidroxialcanoatos

Los plásticos convencionales se han convertido en un material esencial para la vida del ser humano. Al ser económicos, fáciles de moldear y contar con propiedades de ligereza, dureza y

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

durabilidad, han permitido reemplazar materiales como madera, vidrio y metal en amplias aplicaciones industriales y domésticas. Sin embargo, estos plásticos se obtienen de derivados químicos del petróleo, y por su alta masa molecular y estructura compleja, no son biodegradables. Esta resistencia al ataque microbiológico tiene un impacto directo en el ambiente, ya que pueden permanecer por alrededor de 500 años en cuerpos de agua, suelo y vertederos, incrementando la problemática de cambio climático, acumulación y contaminación (Raza, Abid, & Banat, 2018).

Algunos materiales han sido estudiados e implementados como posibles sustitutos de los poliésteres de origen petroquímico. Entre ellos se encuentran los polihidroxialcanoatos (PHAs), biopolímeros que son degradados por microorganismos por acción de las enzimas PHA depolimerasas y PHA hidrolasas, hasta convertirlos en CO₂ y agua, en condiciones aerobias, y en metano, en condiciones anaerobias (Reddy, Vivekanandhan, Misra, Bhatia, & Mohanty, 2013).

Los PHAs son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos que algunas bacterias, arqueas y microalgas acumulan intracelularmente en condiciones de limitación o exceso de nutrientes, como material de reserva de energía. Hasta el momento se han reportado más de 150 hidroxialcanoatos, incluyendo 3-, 4-, 5- y 6- hidroxicarboxilatos, que, de acuerdo con el número de carbonos presentes, pueden ser de cadena corta (3 a 5 carbonos), cadena media (6 a 14 carbonos) y cadena larga (más de 14 carbonos). Dependiendo de la composición de sus monómeros, son termoplásticos o elastoméricos variando propiedades como fuerza tensil, elongación al quiebre, biocompatibilidad y biodegradabilidad (Sagong, Son, Choi, Lee, & Kim, 2018). En la *Figura 11* se observa la estructura de los PHAs y algunos ejemplos de nomenclatura.

El PHA más estudiado es el polihidroxibutirato (PHB). Descubierto en *Bacillus megaterium*, fue aislado y caracterizado por primera vez en 1925, por el microbiólogo francés Maurice Lemoigne. Es un homopolímero que exhibe una estructura isotáctica completamente

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

lineal, que muestra de 60 a 70% de cristalinidad. En comparación con los polímeros convencionales, este problema con los PHB puros pueden erradicarse mediante polimerización con comonómeros (Mohapatra et al., 2017).

Figura 1

Estructura general PHAs, ejemplos, nomenclatura y símbolo según posición cadena lateral(R)

$$\left[\begin{array}{ccccccc} & & \text{H} & & & & \\ & & | & & & & \\ - & \text{O} & - & \text{C} & - & (\text{CH}_2)_n & - & \text{C} & - \\ & & | & & & & & || & \\ & & \text{R} & & & & & \text{O} & \end{array} \right]$$

<i>n</i>	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. Tomado de “*Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria*” (p.432) por S. Y. Lee, 1996, *Trends in Biotechnology*, 14 (11)

Los PHAs son insolubles en agua y relativamente resistentes a la degradación hidrolítica, presentan buena resistencia a la radiación UV, pero poca al ataque ácido y básico. Se comportan como un material piezoeléctrico, no son tóxicos y se hunden en el agua, favoreciendo la biodegradación anaeróbica en los sedimentos. Adicionalmente, el PHB es biocompatible, dando

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

lugar a aplicaciones en el sector biomédico para la reconstrucción de tejidos, parches de bioimplantes, administración de medicamentos, cirugía y vendaje para heridas (Bugnicourt, Cinelli, Lazzeri, & Alvarez, 2014).

2.3 Generalidades del microorganismo

Se ha demostrado que existen más de 300 especies de bacterias productoras de PHB entre gram negativas y gram positivas. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje se destaca por su uso potencial a nivel industrial debido a su nivel de rendimiento y porcentaje de acumulación del biopolímero. Entre las especies gram negativas más importantes se encuentran *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida*, *P. oleovorans*, *Azotobacter vinelandii* y una cepa de *Escherichia coli* recombinante. Entre las gram positivas sobresalen *Actinomycetes* y varias especies del género *Bacillus*, como *Bacillus megaterium* (Sánchez Moreno, Marín Montoy, Mora Martínez, & Yepes Pérez, 2012).

Las especies del género *Bacillus* se han convertido en organismo modelo en la industria y la academia, principalmente por su estabilidad genética (Biedendieck et al., 2007) Además de presentar mayor crecimiento comparado con otras bacterias, el uso de este género para producir PHAs representa una ventaja debido a la ausencia de una película externa de lipopolisacáridos, lo cual facilita su extracción (Khiyami et al., 2011)

B. megaterium es una de las bacterias gram positivas más grandes conocidas en la actualidad, con una longitud 4 µm y un diámetro de 1.5 µm. Es un microorganismo principalmente aerobio, formador de esporas, no patogénico, capaz de crecer en sustratos no convencionales y que se puede encontrar en variados ecosistemas (Bunk et al., 2010). Esta bacteria es capaz de acumular PHB de forma intracelular como reserva de energía y carbono en condiciones de estrés, bajo la

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

limitación o el exceso de macronutrientes como el nitrógeno y el fósforo o micronutrientes como el magnesio o sulfato (Suhazsini, Keshav, Narayanan, Chaudhuri, & Radha, 2020). En la célula bacteriana, las fuentes de carbono son metabolizadas por distintas rutas (Ver Apéndice E)

En el año 2015, el CEIAM, como parte de su labor investigativa, logró aislar la cepa *Bacillus megaterium* B2 de residuos de glicerol crudo de una planta colombiana de Biodiesel. Esta cepa demostró ser capaz de producir PHB a una temperatura óptima de 37°C y pH de 7 (Moreno et al., 2015). Investigaciones posteriores, lograron formular un medio básico de sales que complementara el medio de cultivo con glicerol debido a que ciertos componentes como los elementos traza y el fosfato ácido de sodio, necesarios para el crecimiento microbiano, resultaron ser inhibitorios, razón por la cual, su formulación debía ser específica. Además, se demostró que la producción de PHB se ve favorecida por la disponibilidad de oxígeno y nitrógeno y se estableció una relación carbono-nitrógeno de 10, adecuada para este tipo de sustrato (Lizcano Gonzáles, 2018).

Consecuentemente, en el año 2019, se utilizó *B. megaterium* B2 para la producción de PHB a partir de residuos provenientes de la agroindustria del cacao usando un biorreactor batch de 7 L con volumen de trabajo de 4 L. Alcanzando una concentración final de PHB de 2 g/L para el ensayo con mayor crecimiento de biomasa y acumulación de PHB (Suárez Rodríguez, 2019) (Suarez Gamboa, 2019). Sin embargo, se hace necesario realizar un mejoramiento del proceso con el fin de aumentar la acumulación del biopolímero.

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo propone el ajuste de las condiciones nutricionales del medio de cultivo en la producción de polihidroxibutirato (PHB) por *Bacillus megaterium* B2 a partir de residuos líquidos de cacao, con el objetivo aumentar el desempeño de producción en el proceso.

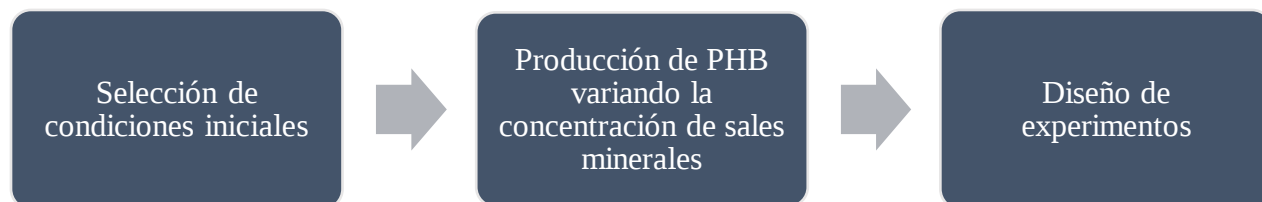
3. Metodología

En la

Figura 2 se encuentra la metodología planteada para lograr los objetivos propuestos en la presente investigación. En la primera fase, se determinaron condiciones como duración del experimento y proporción de los residuos líquidos en el medio de cultivo, por medio de comprobación experimental y relación C/N por medio de revisión bibliográfica. En la segunda fase, se realizaron cuatro ensayos variando la concentración de sales minerales en el medio básico para identificar cómo afectaba dicha variación al desempeño de producción de *B. megaterium* B2 y establecer un rango con resultados potenciales para aumentar el crecimiento del microorganismo y acumulación de PHB. En la tercera fase, se consideró evaluar la interacción entre variables: relación C/N y concentración de sales minerales, a través de un diseño de experimentos de Composición Central con el propósito de incrementar las concentraciones de biomasa y biopolímero.

Figura 2

Etapas metodológicas



CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

3.1 Selección de condiciones iniciales

3.1.1 Selección de tiempo de operación

Se realizó un ensayo durante 72 horas para observar el comportamiento del microorganismo en este tiempo, y determinar la duración de los experimentos posteriores. La cepa se activó depositando un vial criopreservado en 50mL de medio de cultivo, previamente esterilizado a 105°C por 15min y preparado con líquido residual de la producción de celulosa (LRPC) y caldo nutritivo, incorporados en una proporción de 53% y 47%, respectivamente. El caldo nutritivo es una solución acuosa compuesta por peptona 15g/L, extracto de levadura 3g/L y NaCl 6g/L. El medio inoculado se llevó a incubación a 34°C, pH 6.9 y 200 rpm, durante 9 horas, tiempo en el cual, el microorganismo se adaptó a la fuente de carbono disponible.

Posterior a esta etapa, se tomaron 4mL del cultivo anterior y se transfirieron a un preinóculo de 200mL donde se reemplazó el medio nutritivo por medio básico (MB) y se mantuvo la proporción anterior y las condiciones de esterilización. El medio básico está compuesto de KH_2PO_4 1.5g/L, Na_2HPO_4 3g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de acuerdo con la relación C/N y elementos traza en solución 100mg/L [$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.25 g/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l; H_3BO_4 , 0.23 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.2 g/l; y HCl, 10 ml] (Naranjo, Posada, Higuaita, & Cardona, 2013). El preinóculo se incubó a 34°C, pH 6.9 y 200 rpm por un lapso de 16 horas.

Transcurrido este tiempo, se transfirió la totalidad del preinóculo a un biorreactor de tanque agitado con capacidad de 7.5L y 4L de medio con las mismas condiciones nutricionales del preinóculo, a una temperatura de 34°C, pH de 6.9 controlado por solución buffer de KOH 2M o HCl 2M, según lo requerido, suministro de aire de 1 L/min, y agitación ajustada entre 200 y

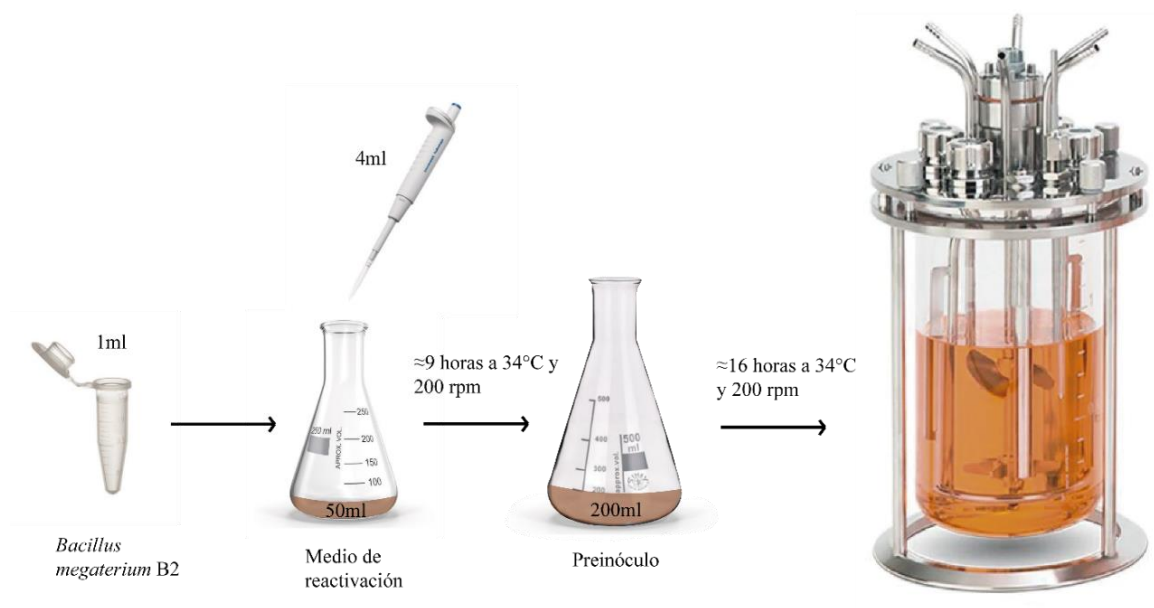
CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

600rpm, con el fin de mantener la saturación de oxígeno por encima del 50%. En la *Figura 3* se observa en resumen el procedimiento.

Durante la fermentación se tomaron muestras de 30 mL, por triplicado, cada 2 horas, en tubos falcon previamente pesados. Las muestras se centrifugaron a 7000rpm por 15 minutos; 10 ml del sobrenadante se conservó congelado para el posterior análisis de consumo de sustrato por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y el restante se descartó. El pellet obtenido se conservó refrigerado para el análisis de producción de biomasa usando la técnica de peso seco y posteriormente se realizó la respectiva extracción de PHB.

Figura 3

Procedimiento ilustrado del cultivo por lotes para B. megaterium B2



CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

3.1.2 Revisión bibliográfica y selección de una relación C/N reportada por otros autores como las más adecuadas para *Bacillus megaterium*

Para seleccionar una relación C/N fue necesario hacer una revisión bibliográfica de trabajos en los que se implementó *Bacillus megaterium* como microorganismo productor de PHB, con el fin de encontrar las condiciones nutricionales que otros autores reportaron con mejores resultados en términos de producción de PHB y, de esta manera, establecer un valor base para los ensayos posteriores.

3.1.3 Selección de proporción de mezcla del medio de cultivo

Como resultado del análisis estadístico propuesto en un estudio previo, se obtuvo que el sustrato que generaba mayor crecimiento era la combinación de LRPC (53%) y MB (47%), lo que hizo que esta proporción se tomara como punto de partida del presente trabajo, sin embargo, los mejores resultados experimentales se encontraban alrededor de la combinación de 3 sustratos: LRPC, LRL y MB, en partes iguales (Suarez Gamboa 2019). Para validar estos resultados, se realizaron dos ensayos con la relación C/N y el tiempo de operación establecidos, tal y como se describe en el apartado 3.1.1; primero con la combinación de medios 53:47 y luego 33:33:33, teniendo en cuenta que el carbono disponible varía, y a su vez, la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adicionado.

3.2 Producción de PHB con la relación C/N establecida a diferentes concentraciones de sales minerales

Posterior a la selección de proporción de mezcla del medio de cultivo, se varió la concentración de sales minerales en el medio básico compuesto por KH_2PO_4 1.5g/L, Na_2HPO_4 3g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L y elementos traza en solución 0.1g/L, concentraciones que fueron designadas como los valores estándar y a partir de los cuales se realizó el ajuste multiplicando

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

dichas concentraciones por distintos factores según fuera el caso. Se realizaron cuatro ensayos en los cuales se aumentó un 25% y 100% y se disminuyó un 25% y 50% la concentración de sales estándar. Luego se realizaron los cultivos correspondientes de la *Tabla 2* para cada ensayo como se describió en el apartado 3.1.1 y la respectiva extracción de PHB. Con los resultados obtenidos, se determinó el rango de concentración de sales que evidenciara cambios significativos en el desempeño de producción de PHB y se consideró evaluar la interacción entre variables, relación C/N y concentración de sales minerales, con el propósito de aumentar la producción de PHB.

Tabla 2

Ensayos realizados variando la concentración de sales

Factor de sales	0.5	0.75	1.25	2
-----------------	-----	------	------	---

3.3 Diseño de experimentos

Se realizó un diseño de experimentos para encontrar la mejor interacción entre relación C/N y concentración de sales minerales en el medio básico, Diseño Central Compuesto, con ayuda del software estadístico MINITAB®. Los límites de las variables C/N y concentración de sales se establecieron por literatura revisada en la primera fase y observación experimental de la segunda fase, respectivamente. En la

Tabla 3 se encuentran las combinaciones sugeridas por el programa y posteriormente evaluadas. Finalmente, los resultados obtenidos se sometieron a un análisis estadístico con el fin de encontrar la combinación de variables que más incrementara la producción de PHB.

Tabla 3*Diseño Central Compuesto*

Factor de Sales	C/N
0.88	17.5
0.88	6.89
1	25
0.75	10
0.75	25
0.70	17.5
1.05	17.5
1	10
0.88	28.11

3.4 Cuantificación de biomasa, PHB y consumo de sustrato

3.4.1 Biomasa

El pellet obtenido se lavó dos veces con solución salina al 85% para evitar la lisis celular y eliminar los residuos de azúcares. Luego se secó en el horno a 60 °C por 22 horas y se registró el peso de tal forma que, por diferencia de peso, se obtuvo la cantidad de biomasa. Este valor se utilizó para calcular las concentraciones y rendimientos y del proceso.

3.4.2 PHB

Para la extracción de PHB, se utilizó una técnica con SDS-sonicación, libre de reactivos tóxicos como cloroformo, metanol o ácido sulfúrico, sustancias peligrosas de manipular y perjudiciales para el medio ambiente, (Arikawa, Sato, Fujiki, & Matsumoto, 2017). Al pellet seco

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

obtenido en la cuantificación de la biomasa, se le adicionaron 20 mL de agua tipo I y 10 mL de SDS en solución acuosa 0.05%*m/v*. Esta mezcla fue sometida a un baño con ultrasonidos para romper las células y dispersar los restos en el agua. El proceso se realizó por 15 minutos a 90°C. Las muestras se centrifugaron de nuevo a 7000 rpm por 10 minutos, de esta forma, el PHB insoluble se concentró en forma de pellet. El pellet se sometió a dos lavados con una mezcla de agua tipo 1 y etanol al 95% en proporción 4:1, para remover los residuos celulares. Finalmente, el tubo que contenía el PHB extraído, se llevó a un horno de secado a 60 °C por 22 horas y se registró su peso. La diferencia entre este peso y el peso del tubo vacío correspondió al peso del PHB. Este valor se utilizó para calcular rendimientos y porcentaje de acumulación de PHB.

3.4.3 Consumo de sustrato

El sobrenadante se caracterizó cualitativa y cuantitativamente en términos de tipo y contenido de azúcares por HPLC. Para esto, se utilizó una columna empaquetada en resina de intercambio iónico Columna Agilent Hi-Plex H 8µm, 300x 7.7mm. El método consistió en una fase móvil de agua tipo 1 a un flujo de 0.6 mL/min, un volumen de inyección de muestra de 15 µL y un detector de índice de refracción (FID). El tiempo total de análisis fue de 30 minutos. Para la caracterización de azúcares, se prepararon tres patrones a partir de una solución madre de concentración 50 g/L de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa, con concentraciones de 1, 10, 20, 30, 40 y 50 g/L, con los cuales se construyeron las correspondientes curvas de calibración. A partir de éstas, se calcularon las concentraciones de los compuestos presentes. Las muestras se filtraron a través de una membrana de acetato de celulosa antes de ser diluidas en proporción 1:2 con fase móvil para las primeras 20 horas de ensayo y puro para las siguientes horas, y a continuación se inyectaron en el equipo de HPLC por triplicado.

4. Resultados

4.1 Selección de condiciones iniciales

Con los ensayos realizados durante esta fase y la revisión bibliográfica se determinaron parámetros del proceso, como tiempo de operación, proporción de mezcla del medio de cultivo y relación C/N.

4.1.1 Selección de tiempo de operación

En la

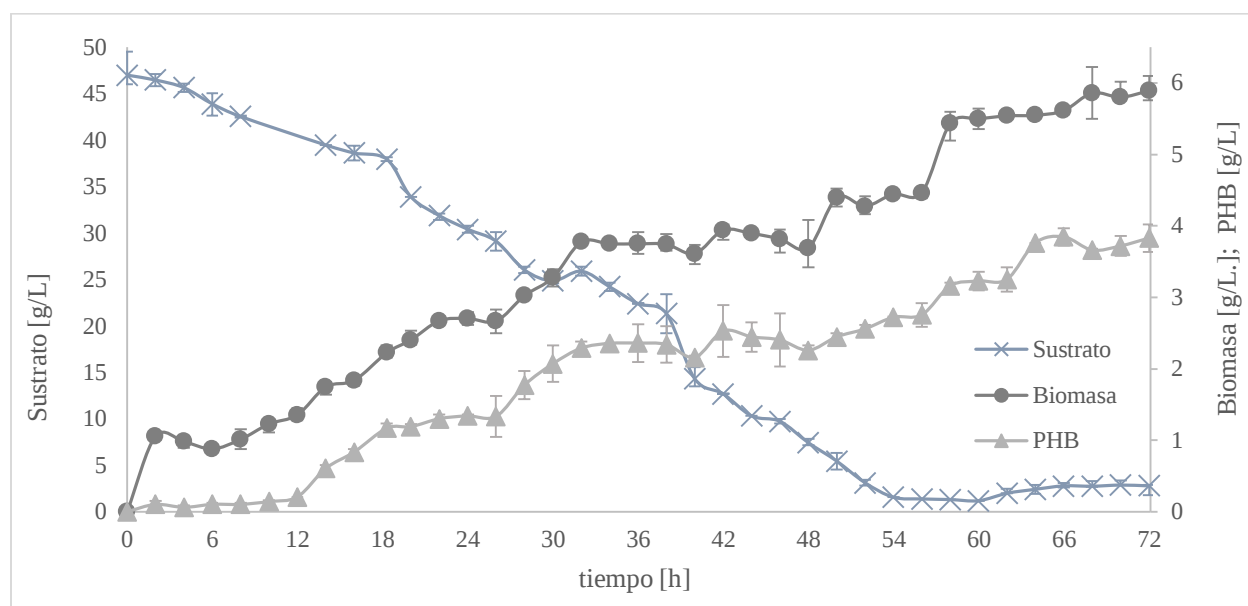
Figura 4 se observa la curva de crecimiento de *B. megaterium* y la acumulación de PHB, donde se evidencia la aparición del polihidroxialcanoato como un metabolito primario y tres fases: fase lag, fase de crecimiento y fase estacionaria; distribuidas en distintos periodos de tiempo a lo largo de todo el experimento. El microorganismo se mantiene en una fase de latencia hasta la hora 6, donde comienza a crecer exponencialmente hasta la hora 32, alcanzando una productividad máxima de 0.0716 g/L·h y donde es posible apreciar una fase cuasi estacionaria hasta la hora 48. Después de un lapso de 16 horas en esta fase, no se esperaba que el microorganismo continuara creciendo, sin embargo, *B. megaterium* B2 retoma su crecimiento hasta la hora 58, donde de nuevo entra a una fase estacionaria con un leve incremento en las últimas 6 horas, obteniendo 3.8296 g/L de PHB para la hora final del experimento y un rendimiento global de 0.65g PHB/g biomasa. Este

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

crecimiento inesperado después de la primera fase estacionaria fue evidente durante la experimentación, luego de que *B. megaterium* que antes demandaba KOH para mantener el pH comenzó a requerir de HCl, lo que se tradujo en un cambio de metabolismo que ahora resultaba en la alcalinización del medio y en un incremento de biomasa y producción de PHB.

Figura 4

Curva de crecimiento de B. megaterium para ensayo de 72 horas



A pesar de que el microorganismo crece durante la totalidad del experimento, el porcentaje de acumulación de PHB durante esta primera fase estacionaria es de aproximadamente 63%, y para la hora 72, equivale alrededor del 65%, un valor que no es recomendable alcanzar, ya que la diferencia porcentual es mínima y para ello se requieren 34 horas más de operación, que conllevan

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

un mayor gasto energético y costos económicos. De acuerdo con estas observaciones, se definió ‘38 horas’ como el tiempo de duración de los ensayos siguientes.

Tabla 4

Concentraciones máximas y rendimiento ensayo de 72 horas

Concentraciones máximas			Concentración final PHB [g/L]	Rendimiento Y _p x
Biomasa [g/L]	PHB [g/L]	% PHB acumulado		
5.890	3.847*	68.541	3.830	0.650

4.1.2 Revisión bibliográfica y selección de una relación C/N reportada por otros autores como las más adecuadas para *Bacillus megaterium*

En las especies del género *Bacillus* es difícil promover la formación de PHB con las condiciones estándar: relaciones carbono:nitrógeno altas o bajo suministro de aire, ya que éstas inducen a la esporulación (Wu et al., 2001). A partir de esta observación, diferentes autores trabajaron con microorganismos del género, bajo condiciones no estándar. En específico, se encontró que el microorganismo *Bacillus megaterium* B2, se usó en diferentes trabajos con el objetivo de determinar las cantidades óptimas de carbono y nitrógeno (Carrillo & Parra, 2016) y el efecto de las concentraciones de oxígeno y nitrógeno (Lizcano González, 2018). Además, diversos autores plantearon estudios con *B. megaterium* determinando las condiciones nutricionales y de operación más adecuadas, reportando valores de C/N entre 5 y 25.

En la

Tabla 5 se destaca el estudio realizado por Zhang et al. (2013) por la alta concentración de PHB obtenida con relación C/N de 5, y el estudio realizado por Kulprecha et al. (2009) por la productividad alcanzada a partir de C/N 25. En los dos trabajos se analizó la interacción entre distintas fuentes de carbono y de nitrógeno con resultados que permitieron concluir que la

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

interacción influye positiva o negativamente sobre el crecimiento del microorganismo y la acumulación de PHB. En la

Tabla 5 se encuentran los valores de relación C/N reportados por los distintos autores.

De acuerdo con estos resultados, y teniendo en cuenta los estudios previos con *B. megaterium* B2, se seleccionó la relación C/N de 10 como el valor base para la realización de los experimentos posteriores.

Tabla 5

Relación C/N para otros autores

Microorganismo	Sustrato	C/N	PHB [g/L]	PHB [g/L*h]	Referencia
<i>Bacillus megaterium</i> B2	Glicerol	5	1.2	0.110	Moreno et al., 2015
<i>Bacillus megaterium</i> B2	Glicerol	10	1.59	0.044	Carrillo & Parra, 2016
<i>Bacillus megaterium</i> B2	Glicerol	10	1.58	0.044	Lizcano González, 2018
<i>Bacillus megaterium</i> DSM32T	Sacarosa	8		0.162	Faccin et al., 2013
<i>Bacillus megaterium</i> uyuni S29	Glucosa	5	5.4	0.45	Rodríguez et al., 2013
<i>Bacillus megaterium</i> YYBm1	Fructosa	6			Korneli et al., 2011
<i>Bacillus megaterium</i> R11	OPEFB*	5	12,48	0.260	Zhang et al., 2013
<i>Bacillus megaterium</i> BBST4	Glucosa	25	3.3	0.103	López et al., 2011
<i>Bacillus megaterium</i> BBST4	Glicerol	20	4.8	0.114	Naranjo et al., 2013
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	Melaza	25	4.16	0.35	Kulpreecha et al., 2009

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

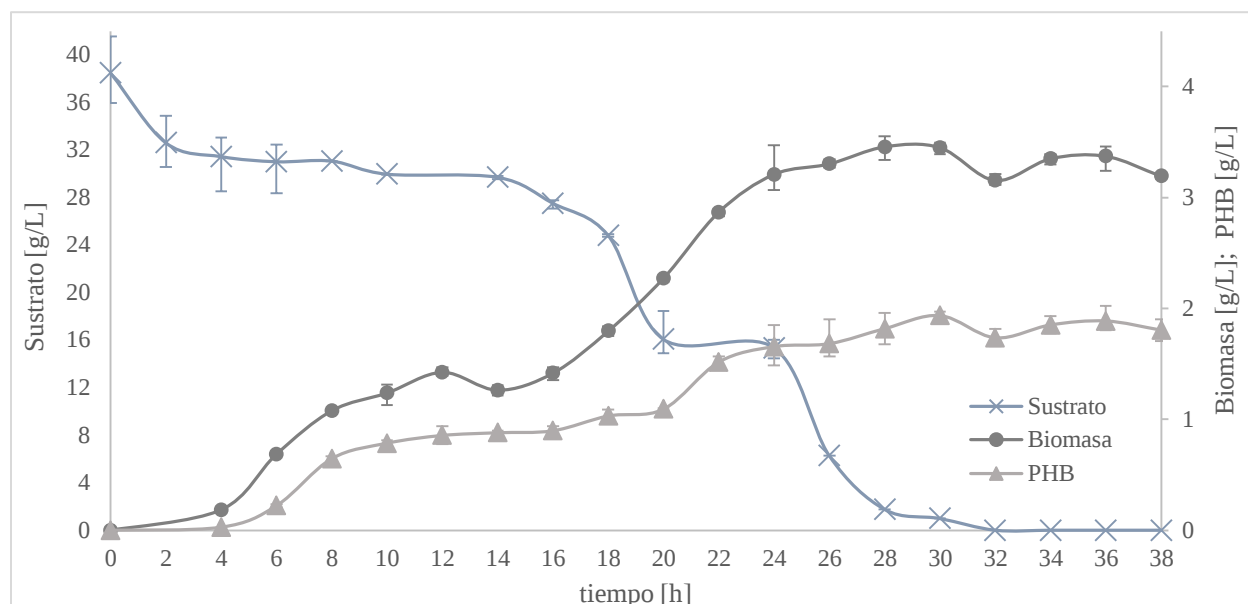
4.1.3 Selección de proporción de mezcla del medio de cultivo**4.1.3.1 Ensayo: Proporción de mezcla 47:53** En la

Figura 5 se observa que la fase de latencia tuvo una duración de cuatro horas, en las cuales el microorganismo se adaptó al medio de cultivo. Seguida de esta fase, se presentó el crecimiento exponencial hasta aproximadamente la hora 24; hora a partir de la cual se evidenció la fase estacionaria donde la bacteria cesó su crecimiento por el agotamiento de nutrientes y dejó de producir el biopolímero por lo cual la concentración de este permaneció constante hasta el final del experimento. (Ver valores de concentración máxima, concentración final y rendimiento en la Tabla 6)

Figura 5

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Curva de crecimiento para el ensayo de concentración de medios 47:53



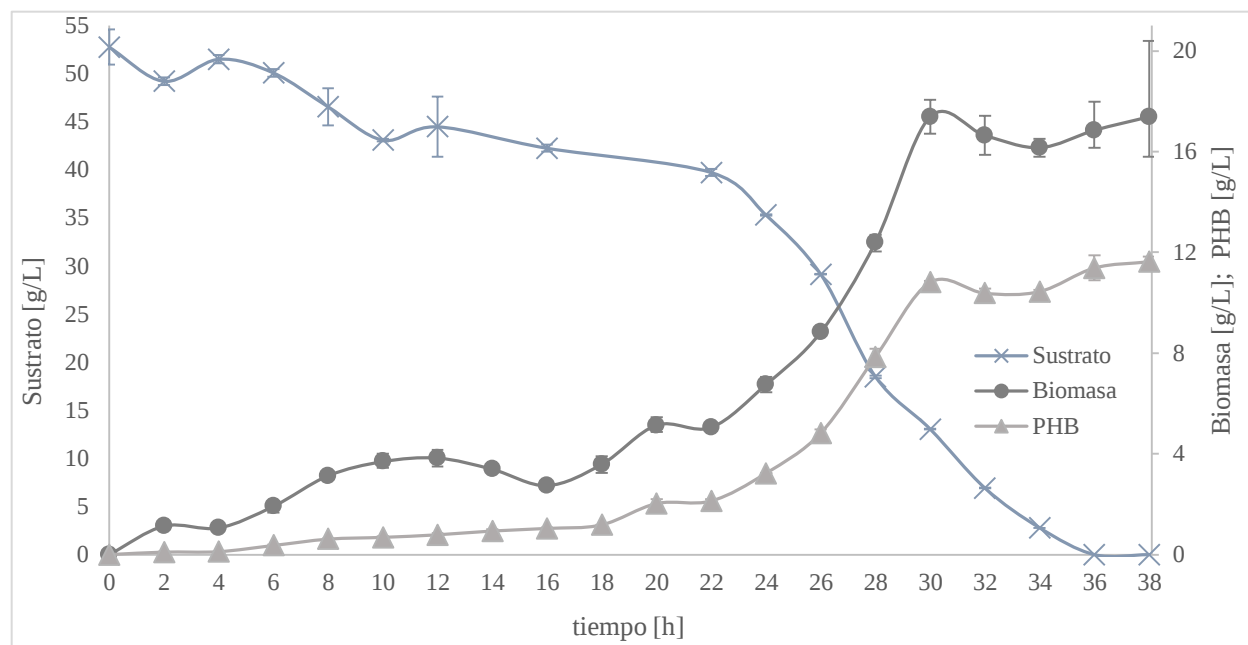
4.1.3.2 Ensayo: Proporción de mezcla 33:33:33. En la Figura 6 se observa que la fase de latencia tuvo una duración de aproximadamente 4 horas, sin embargo, el microorganismo evidenció una tasa de crecimiento mayor y más estable a partir de la hora 16. Esto quiere decir que el microorganismo tomó más tiempo para adaptarse al medio de cultivo, debido al uso de mucílago lixiviado fermentado.

Se puede hablar de una etapa estacionaria a partir de la hora 32, en esta fase el microorganismo detiene su crecimiento debido al agotamiento de nutrientes en el medio. Sin embargo, aprovecha el PHB producido naturalmente como reserva energética para sobrevivir.

Figura 6

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Curva de crecimiento para el ensayo de concentración de medios 33:33:33



Realizando la comparación de ambos ensayos se obtuvieron, en resumen, los siguientes resultados:

Tabla 6

Valores máximos de los ensayos según la relación de concentración de medios

Proporción de mezcla	Concentraciones máximas			Concentración final PHB [g/L]	Rendimiento Y'px
	Biomasa [g/L]	PHB [g/L]	% PHB acumulado		
47:53	3.46	1.94	69.63	1.80	0.570
33:33:33	17.38	11.63	67.54	11,63	0.669

El ensayo donde se evidenciaron los mejores resultados fue aquel en el cual la concentración de medios tuvo una razón de 33:33:33 puesto que la concentración final de PHB

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

aumentó 84.52% y hubo un mayor crecimiento de biomasa, 80.09%, con relación al ensayo con concentración de medios de razón 47:53.

La mejora en los resultados responde a que el mucílago lixiviado fermentado aporta ácidos (y posiblemente otros nutrientes desconocidos hasta el momento) que favorecen el crecimiento de biomasa y, por ende, al ser este un metabolito primario, se ve favorecida la producción de PHB.

4.2 Producción de PHB con la relación C/N establecida a diferentes concentraciones de microelementos

Teniendo en cuenta una concentración estándar de sales minerales (KH_2PO_4 1.5g/L, Na_2HPO_4 3g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L y elementos traza en solución 0.1g/L). Se procedió a estudiar el comportamiento de producción de PHB de *Bacillus megaterium* B2, al aumentar y disminuir dicha concentración, multiplicándola por diferentes factores. Así, se obtuvieron resultados para un factor de concentración de 0.5, 0.75, 1, 1.25 y 2 veces la concentración estándar de sales. Resumidos en la *Tabla 7*. Ver curvas de crecimiento de biomasa y acumulación de PHB en Apéndice F – J.

Tabla 7

Valores máximos de los ensayos según el factor de concentración de sales

Factor de sales	Concentraciones máximas			Concentración final PHB [g/L]	Rendimiento Y'_{px}
	Biomasa [g/L]	PHB [g/L]	% PHB acumulado		
0.5	6.684	3.973	82.044	3.973	0.680
0.75	8.439	4.629	75.813	4.629	0.735
1	17.383	11.628	67.539	11.628	0.669
1.25	8.831	7.056	80.764	7.056	0.799
2	14.324	8.798	80.240	8.798	0.614

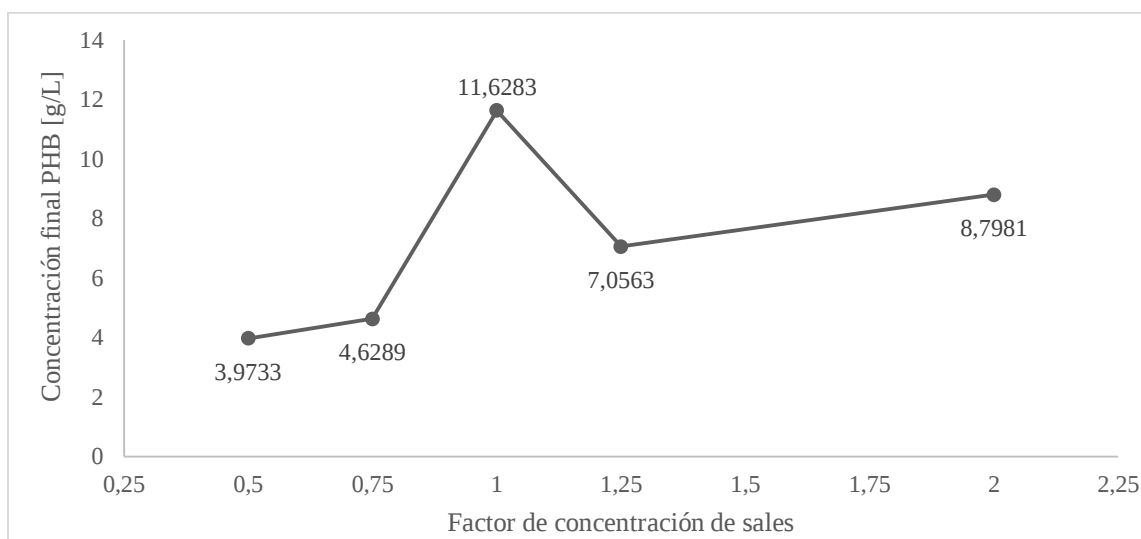
CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Con estos resultados, se realizó la gráfica en la

Figura 7 con los valores de concentración de PHB obtenidos al final de cada ensayo, con el fin de identificar cómo afectaba al desempeño de producción, la variación en la concentración de sales y establecer los límites de esta variable en el diseño de experimentos de composición central.

Figura 7

Concentración final de PHB para cada factor de sales



Modificar la concentración de sales estándar, tiene un efecto notable sobre la producción de PHB, valores por debajo del estándar disminuyen las concentraciones de PHB, de igual manera sucede al aumentar estas concentraciones, sin embargo, para un factor de sales de 2 se vuelve a tener un incremento de PHB, no obstante, esto significaría la utilización de mayor cantidad de reactivos y considerando que el fin es disminuir la cantidad sales requeridas por *B. megaterium*, se descarta este valor. El cambio más significativo se observa entre el rango de 0.75 y 1, lo cuál

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

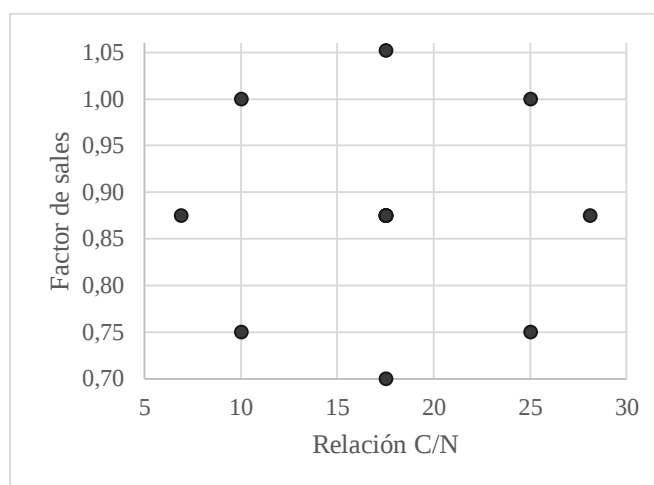
puede ser un indicio de un máximo, antes o después de 1, por tal razón se selecciona este rango para la realización del diseño de experimentos. Además, el tipo de diseño de experimentos contempla un rango más amplio, por encima de 1 y por debajo de 0.75, lo cual permitiría observar si el comportamiento del microorganismo se ajusta a lo observado en esta fase

4.3 Diseño de experimentos

Al escoger un rango de relación C/N entre 10 y 25, y un rango de factor de concentración de sales entre 0.75 y 1. Con ayuda del software estadístico MINITAB®, se determinaron las combinaciones experimentales necesarias para efectuar un diseño de experimentos de composición central ilustrado en la *Figura 8*.

Figura 8

Diseño Central Compuesto



Los resultados de los ensayos realizados se resumen en la *Tabla 8*, además, las curvas de crecimiento del microorganismo y acumulación de PHB para cada uno de los experimentos se encuentran en los Apéndice I - R:

Tabla 8

Valores de concentraciones máximas, concentración final y rendimiento para los ensayos del diseño experimental

C/N	Factor de sales	Concentraciones máximas			[] final PHB [g/L]	Rendimiento Y'px
		Biomasa [g/L]	PHB [g/L]	% PHB acumulado		
6.89	0.88	5.135	3.568	69.478	3.568	0.695
10	0.75	8.439	4.629	75.813	4.629	0.735
10	1	17.383	11.628	67.539	11.628	0.669
17.5	0.7	0.289	0.129	74.424	0.111	0.383
17.5	0.88	0.948	0.539	56.797	0.539	0.568
17.5	1.05	4.007	2.224	71.935	3.873	0.529
25	0.75	8.487	4.059	71.060	1.331	0.183
25	1	3.241	2.269	74.778	2.269	0.700
28.11	0.88	2.423	1.416	60.750	1.416	0.585

En los ensayos correspondientes al diseño de experimentos, se logró alcanzar una concentración máxima de PHB de 11.628 [g/L] para una relación C/N de 10 y una concentración de sales estándar. Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores que utilizaron la misma cepa *Bacillus megaterium* B2 y la misma concentración del medio básico de sales. Obteniéndose un aumento del 93% en la concentración máxima del biopolímero usando glicerol crudo como sustrato y un aumento de 65.6% usando residuos líquidos de la agroindustria del cacao sin el ajuste de las condiciones nutricionales (*Figura 9*).

Los valores obtenidos de concentración final de PHB se ingresaron al software estadístico MINITAB®, donde se realizó un análisis de varianza y que permitió obtener el diagrama de Pareto de efectos estandarizados (*Figura 10*)

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Figura 9

Comparación de concentración máxima alcanzada por otros autores

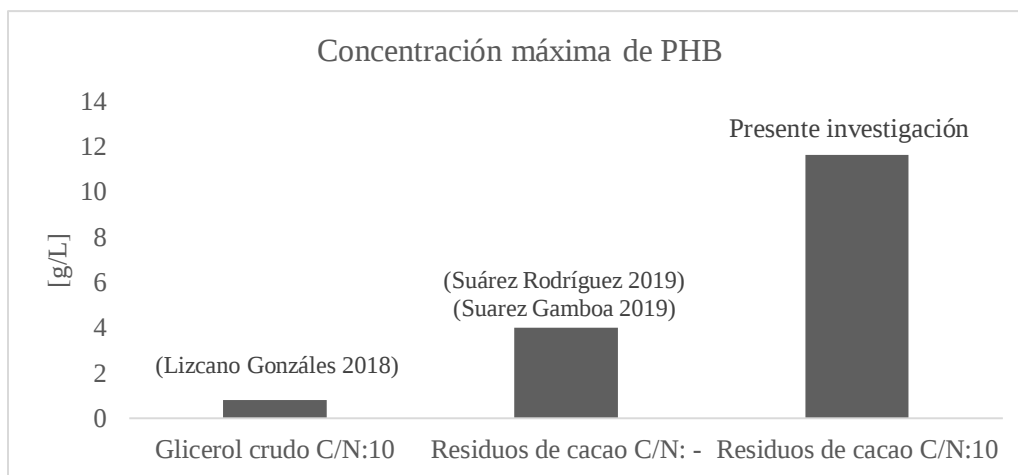
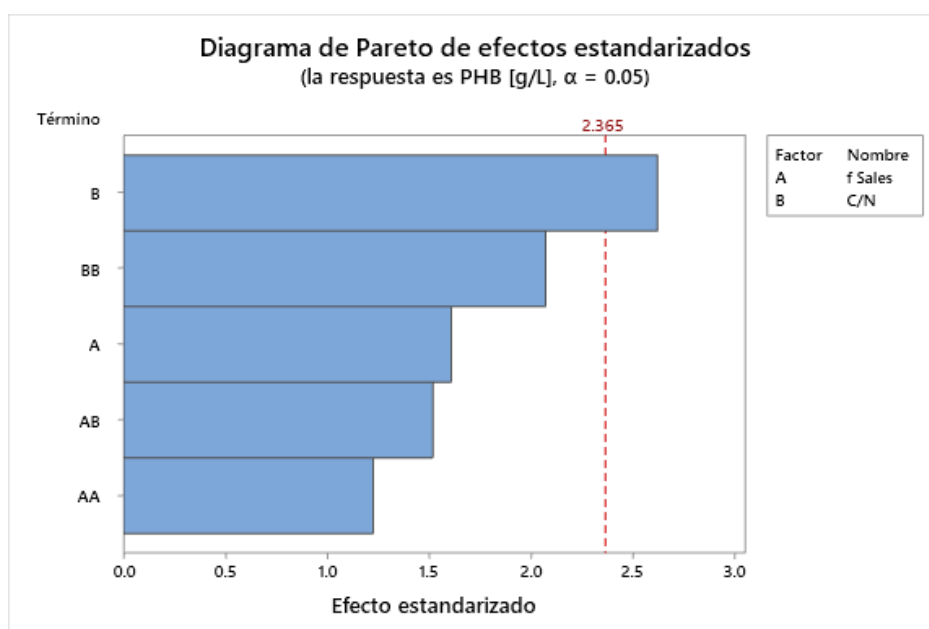
**Figura 10**

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados



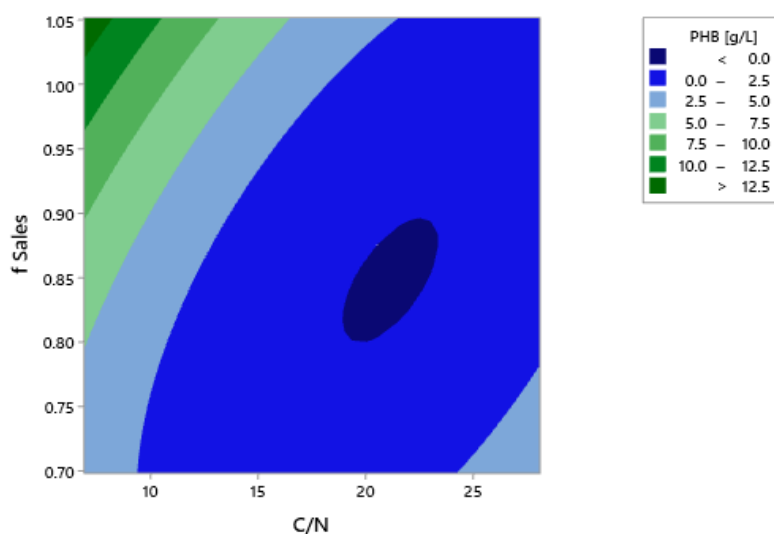
CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

En el diagrama se observa que la relación C/N tiene un efecto más significativo sobre la concentración final de PHB. Por otro lado, la variación de la concentración de sales resulta no corresponder una variable significativa sobre la concentración final de PHB. Por tal razón, se puede continuar manejando la concentración de sales estándar en el medio básico.

En el software también se realizaron las gráficas de contorno y superficie (*Figura 11 y Figura 12*), donde se observa un incremento en la producción de PHB para concentración de sales de 1.05 y relación C/N 6.89. Estos resultados se ajustan a los resultados experimentales y al comportamiento de *B. megaterium* observado por otros autores , donde el crecimiento del microorganismo y la acumulación del biopolímero, se ven favorecidas por relaciones C/N bajas, es decir en condiciones de exceso de nitrógeno (Wu et al., 2001).

Figura 11

Gráfica de contorno Concentración final de PHB

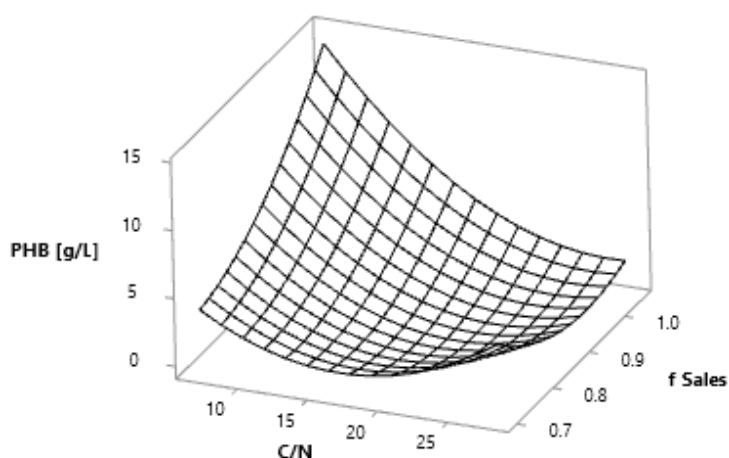


CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

De acuerdo con las gráficas de contorno y superficie, incrementar un 5% la concentración de sales estándar y ajustar la relación C/N en 6.89, resultaría en una producción estimada de 15 [g/L] de PHB a las 38 horas.

Figura 12

Superficie Concentración final de PHB



Para validar los resultados estadísticos es necesario realizar el ensayo con dichas condiciones, sin embargo, debido a la emergencia sanitaria del COVID-19 durante el año 2020, el tiempo y los recursos no fueron suficientes para su ejecución.

5. Conclusiones

La comprobación experimental para seleccionar la proporción de mezcla de los residuos líquidos en el medio de cultivo permitió demostrar que los tres tipos de sustrato: LRPC, LRL y MB, agregados en igual proporción, aportan nutrientes que aumentan de manera significativa el crecimiento de *B. megaterium* B2 y la acumulación de PHB.

Aumentar o disminuir la concentración de sales minerales y elementos traza en el medio básico evidenció la dependencia de la cepa en su desarrollo, confirmando que sin sales minerales o con exceso de éstas se puede inhibir el crecimiento del microorganismo.

El diseño de experimentos demostró que la relación C/N juega un papel importante en el crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 y la acumulación de PHB, además confirmó las observaciones reportadas en la literatura, donde el microorganismo comienza a acumular biopolímero en un ambiente de estrés condicionado por exceso de nitrógeno.

Ajustar las condiciones nutricionales y de operación, permitió incrementar la producción de PHB, alcanzando una concentración de 11.628 [g/l] y porcentajes de acumulación hasta del 80%, un resultado bastante alentador

6. Recomendaciones

Para validar los resultados obtenidos del diseño de experimentos, se recomienda realizar el ensayo con el incremento de sales de 5% y la relación C/N ajustada en 6.89

En las curvas de crecimiento del microorganismo y acumulación de PHB obtenidas, se evidencia una fase lag relativamente larga para algunos ensayos, por tal razón se recomienda extender el tiempo de incubación del preinóculo para que al momento de ingresarlo en el reactor ya se encuentre en la fase exponencial, obteniendo las máximas concentraciones de biomasa y biopolímero en un tiempo menor. Además, se sugiere implementar un régimen de alimentación intermitente (fed-batch), modo de operación que resolvería el inconveniente de parar la producción y adicionalmente se ha reportado que mejora el desempeño de producción de PHB por *B. megaterium* (Kulpreecha, 2009).

En el estudio realizado por Kulpreecha et al. (2009) se analizó el efecto de la interacción entre diferentes fuentes de carbono: sacarosa y melaza; y nitrógeno: sulfato de amonio y urea; encontrando que la melaza y la urea eran la mejor combinación como sustrato. Los resultados evidenciaban que combinar los suministros de carbono y nitrógeno pueden influir positiva o negativamente sobre el crecimiento del microorganismo y acumulación de PHB. En otro estudio, se analizó el efecto de variar cinco fuentes de nitrógeno: sulfato de amonio, cloruro de amonio, peptona y extracto de levadura, obteniendo los mejores resultados con triptona; una fuente de nitrógeno, que según otras investigaciones no era la más adecuada, sin embargo, los autores concluyeron que esto podía ser debido a la interacción con la fuente de carbono, que para este caso eran rácimos de frutos vacíos de palma de aceite, confirmando la observación hecha por

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Kulpreecha et al. (2009) (Zhang et al., 2013). Siguiendo esta línea y teniendo en cuenta que se requiere gran cantidad de sulfato de amonio para cada ensayo, se recomienda utilizar otras fuentes de nitrógeno con el fin de aminorar costos de este reactivo. La urea representa una opción factible, ya que, al ser una molécula pequeña polar sin carga, en contraste con el sulfato de amonio que se encuentra en forma iónica, la cepa la asimila más fácil; la tasa de absorción de urea a través de la membrana es más rápida y menos dependiente del pH que el sulfato de amonio, además es más económica, lo cual reduciría los costos de producción de PHB (Nelson, 2000).

En la presente investigación sólo se realizó el análisis de tres azúcares por HPLC, los análisis de muestras obtenidos evidencian la aparición de otros compuestos a través del tiempo para cada experimento; en su mayoría deberían ser ácidos orgánicos residuos del metabolismo del microorganismo, sin embargo, teniendo en cuenta el cambio repentino de pH de algunas fermentaciones, en donde en lugar de acidificarse el medio, se alcalinizó, se sugiere analizar qué otras sustancias están presentes y determinar si tienen alguna incidencia sobre el crecimiento del microorganismo o bien, proponen un indicio de lo que sucede realmente con *B. megaterium* B2 para que pase de acidificar el medio a alcalinizarlo.

Referencias bibliográficas

- Arikawa, H., Sato, S., Fujiki, T., & Matsumoto, K. (2017). Simple and rapid method for isolation and quantitation of polyhydroxyalkanoate by SDS-sonication treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(2), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.003>
- Barro Nieves, O. (1981). Morfología y clasificación botánica del cacao. In *Manual de asistencia técnica* (24th ed., pp. 25–42). Bogotá (Colombia): Intituto colombiano agropecuario.
- Biedendieck, R., Gamer, M., Jaensch, L., Meyer, S., Rohde, M., Deckwer, W. D., & Jahn, D. (2007). A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. *Journal of Biotechnology*, 132(4), 426–430. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.494>
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- Bunk, B., Schulz, A., Stammen, S., Munch, R., Warren, M., Rohde, M., ... Biedendieck, R. (2010). A short story about a big magic bug. *BioengineeredBugs*, 1(2), 85–91.
- Carrillo, D., & Parra, M. (2016). *Efecto de la relación C-N en la producción de PHB por B. Megaterium B2 a partir de glicerol crudo*.
- Ceyhan, N., & Ozdemir, G. (2011). Poly--hydroxybutyrate (PHB) production from domestic wastewater using *Enterobacter aerogenes* 12Bi strain. *African Journal of Microbiology*

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Research, 5(6), 690–702.

Durán Riveros, D. R., & Cabezas Calderón, J. T. (2019). *Evaluación del mucílago de cacao como fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana*. Universidad Industrial de Santander.

Fedecacao, F. N. D. C. (2020). *Así quedó el ranking de producción de cacao en Colombia*. Bogotá (Colombia).

González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77–115.

Gouda, M. K., Swellam, A. E., & Omar, S. H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156(3), 201–207.

Lizcano Gonzáles, V. A. (2018). *Efecto de las concentraciones de nitrógeno y oxígeno en la producción de polihidroxibutirato por Bacillus megaterium B2 a partir de glicerol*. Universidad Industrial de Santander.

Lizcano, V. (2017). *Efecto de las concentraciones de nitrógeno y oxígeno en la producción de polihidroxibutirato por Bacillus Megaterium B2 a partir de glicerol*. Universidad Industrial de Santander.

Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C., & Samantaray, D. (2017). *Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges*. *Biochemistry and Biophysics Reports*,

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

12(October), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>

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. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.04.003>

Mothes, G., Schnorpfeil, C., & Ackermann, J. U. (2007). Production of PHB from crude glycerol.

Engineering in Life Sciences, 7(5), 475–479.

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>

Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production,

recent developments and applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>

Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K., & Mohanty, A. K. (2013). Biobased

plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1653–1689. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006>

Sagong, H. Y., Son, H. F., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural Insights into

Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.005>

Sánchez Moreno, S. A., Marín Montoy, M. A., Mora Martínez, A. L., & Yepes Pérez, M. del S.

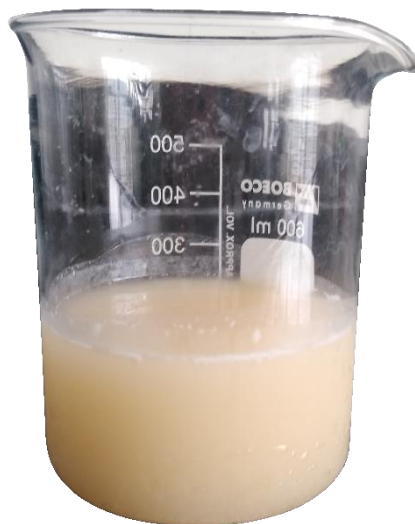
CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

- (2012). Identificación de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV(2), 89–100.
- Sarmiento Suárez, J. J. (2018). *Determinación de las condiciones para la hidrólisis de sacarosa presente en mucílago de cacao CCN 51*. Univeridad Industrial de Santander.
- Suarez Gamboa, M. A. (2019). *Producción y caracterización de Polihidroxicanoatos (PHAs) generados a partir de residuos provenientes de la agroindustria del cacao usando una cepa nativa*. Universidad Industrial de Santander.
- Suárez Rodríguez, S. J. (2019). *Producción de polihidroxicanoatos a partir de residuos de la fermentación del cacao usando Bacillus Megaterium B2*. Universidad Industrial de Santander.
- Suhazsini, P., Keshav, R., Narayanan, S., Chaudhuri, A., & Radha, P. (2020). A Study on the Synthesis of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Bacillus megaterium Utilizing Cheese Whey Permeate. *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 1390–1405.
- Waizel, S., Waizel, J., Magaña, J. A., Campos, P., & San Esteban, J. E. (2012). Cacao y chocolate : seducción y terapéutica. *Anales Médicos*, 57(3), 237.
- Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K. P., & Chen, G. Q. (2001). Production of poly-3-hydroxybutyrate by Bacillus sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 80(2), 111–118. <https://doi.org/10.1023/A:1012222625201>

CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Apéndices

Apéndice A. Líquido residual lixiviado.



Apéndice B. Líquido residual de producción de celulosa.

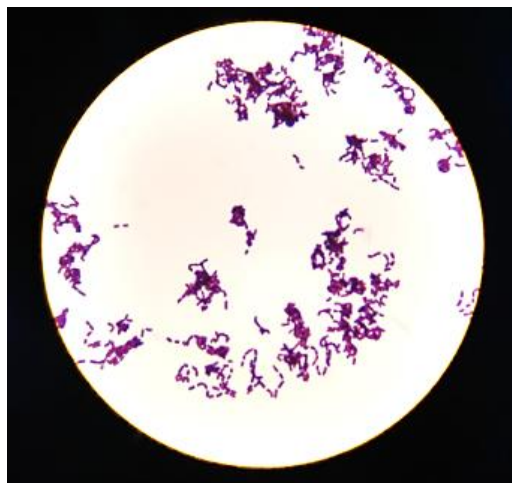


CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Apéndice C. Ejemplo de PHB producido por *Bacillus megaterium* B2 a partir de residuos líquidos de la agroindustria del cacao.

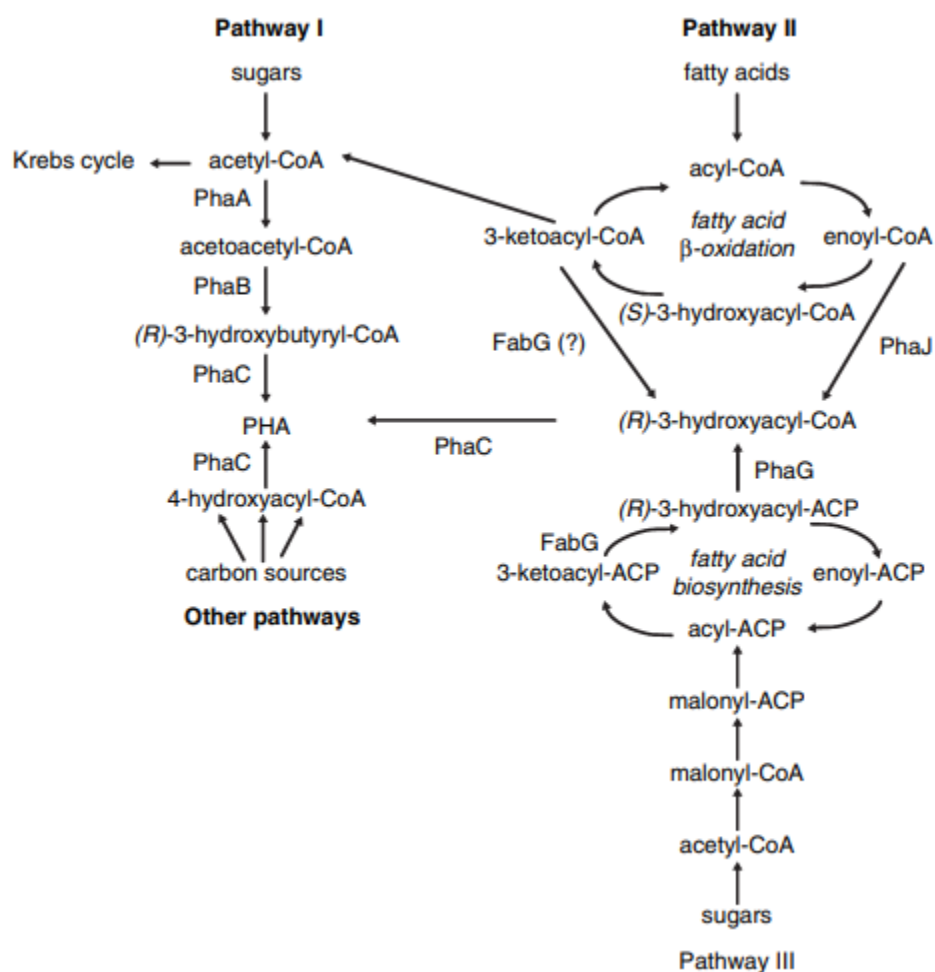


Apéndice D. *Bacillus megaterium* B2.



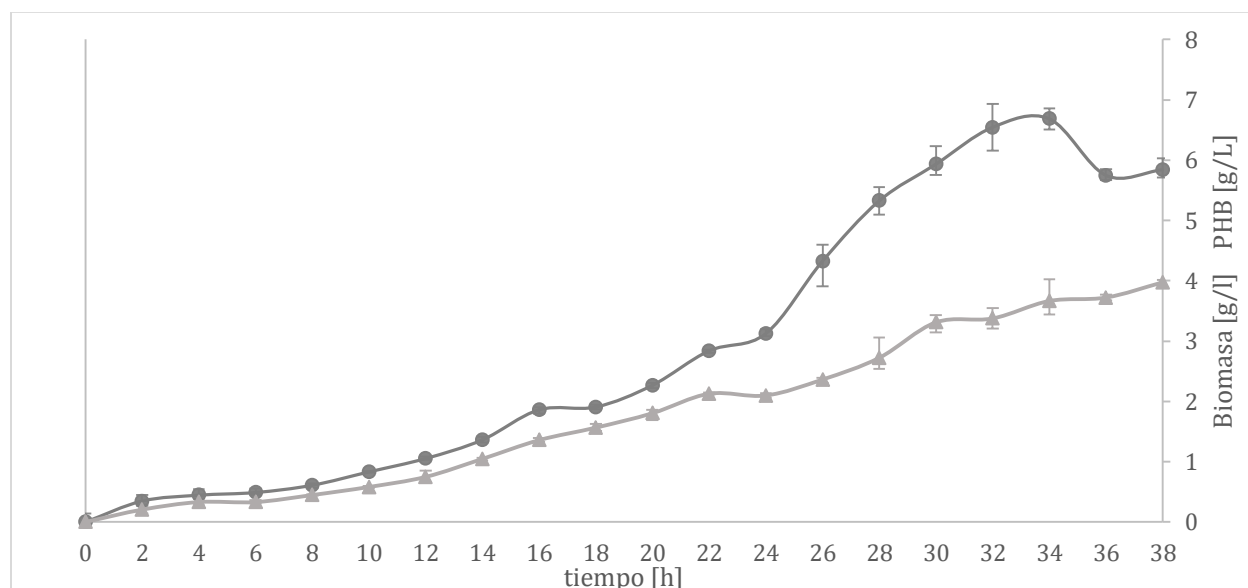
CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Apéndice E. Vías metabólicas que suministran monómeros para la síntesis de PHA. Tomado de Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates (p.581) por T. Tsuge, 2002, Journal of Bioscience and Bioengineering, 94 (6)

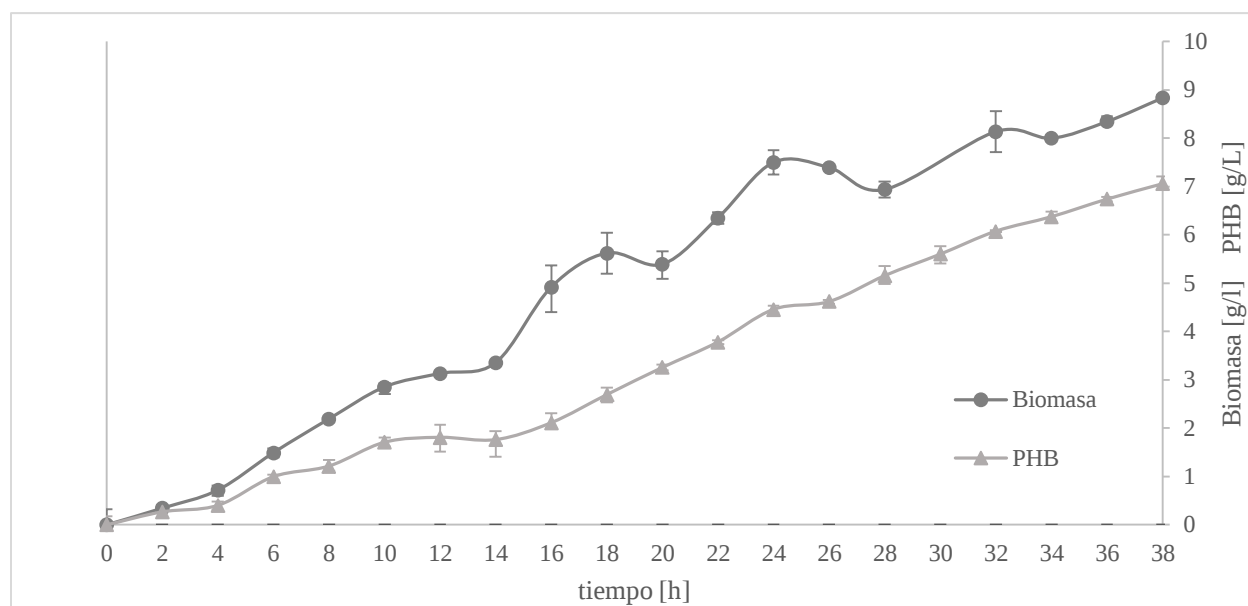


CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Apéndice F. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 10 y factor de concentración de sales 0.5

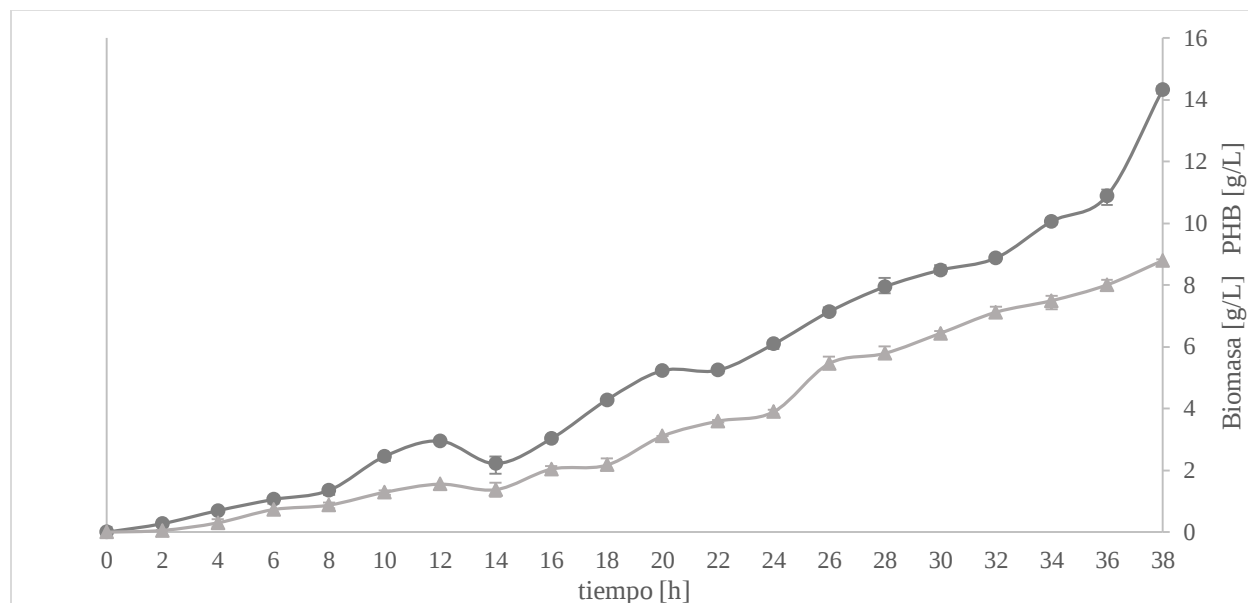


Apéndice G. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 10 y factor de concentración de sales 1.25

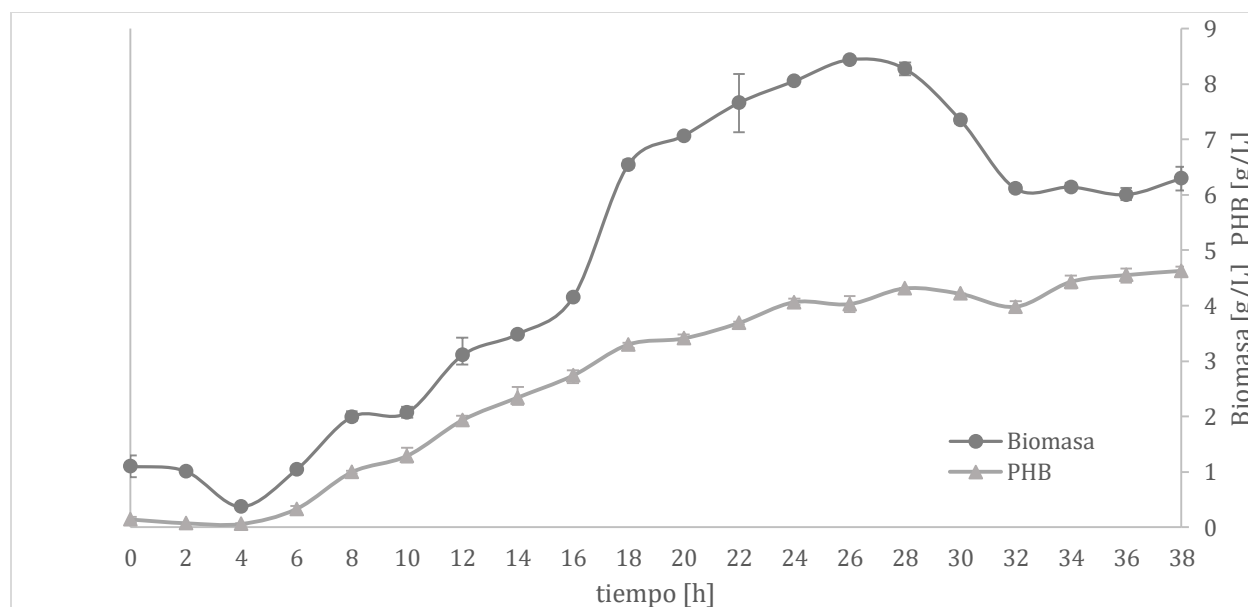


CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Apéndice H. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 10 y factor de concentración de sales 2

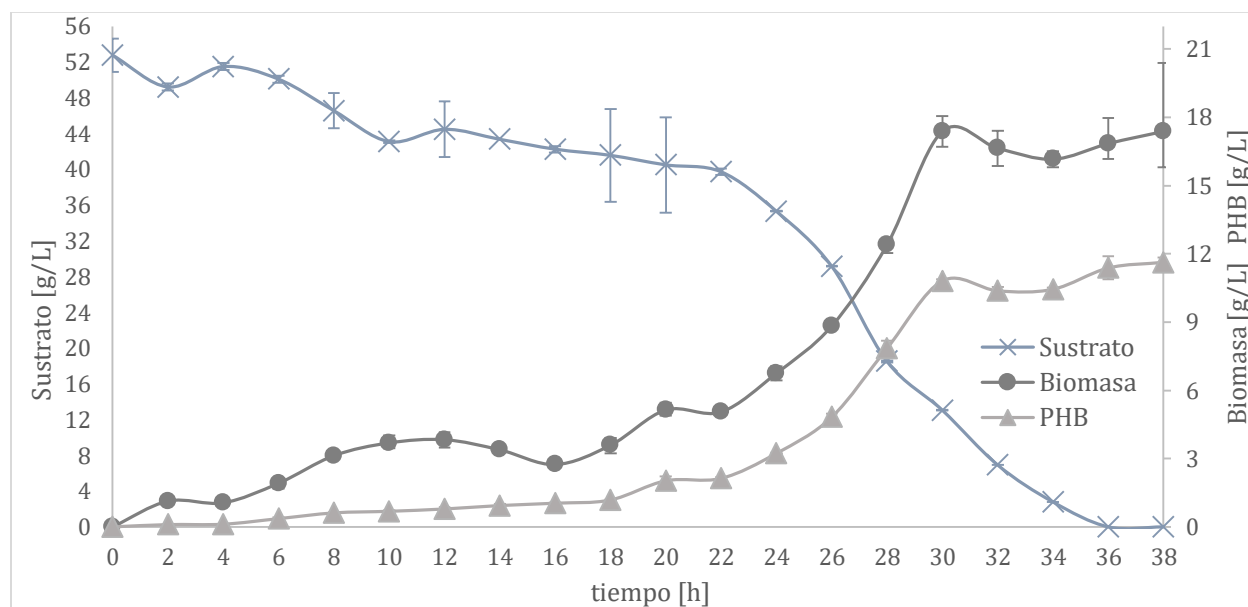


Apéndice I. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 10 y factor de concentración de sales 0.75

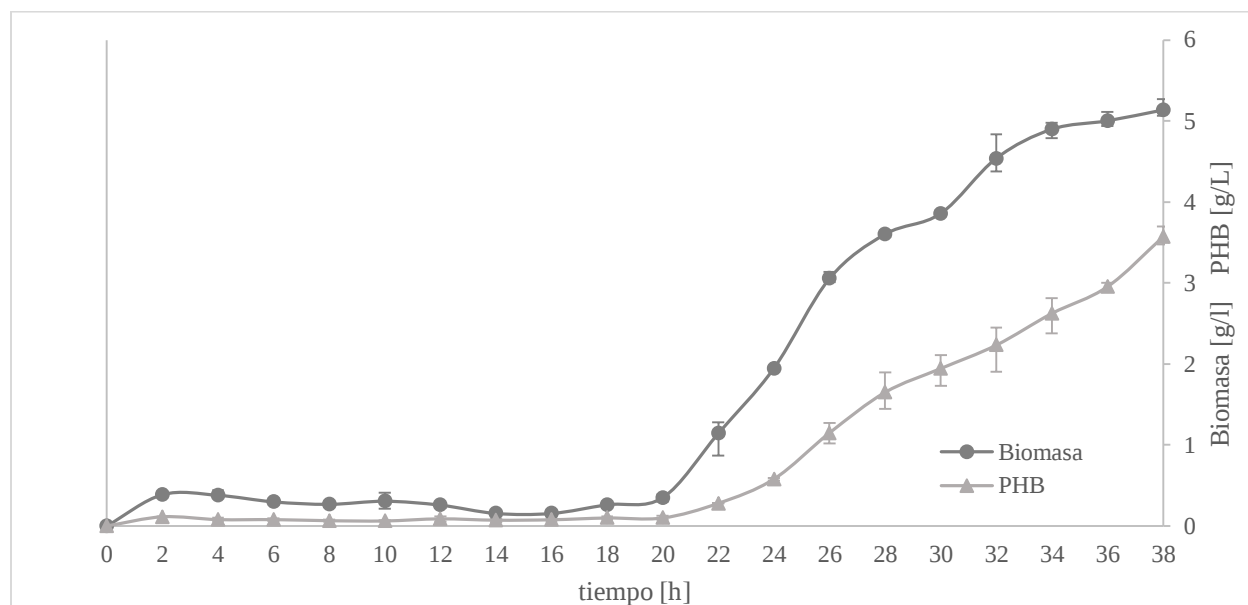


CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Apéndice J. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 10 y factor de concentración de sales 1

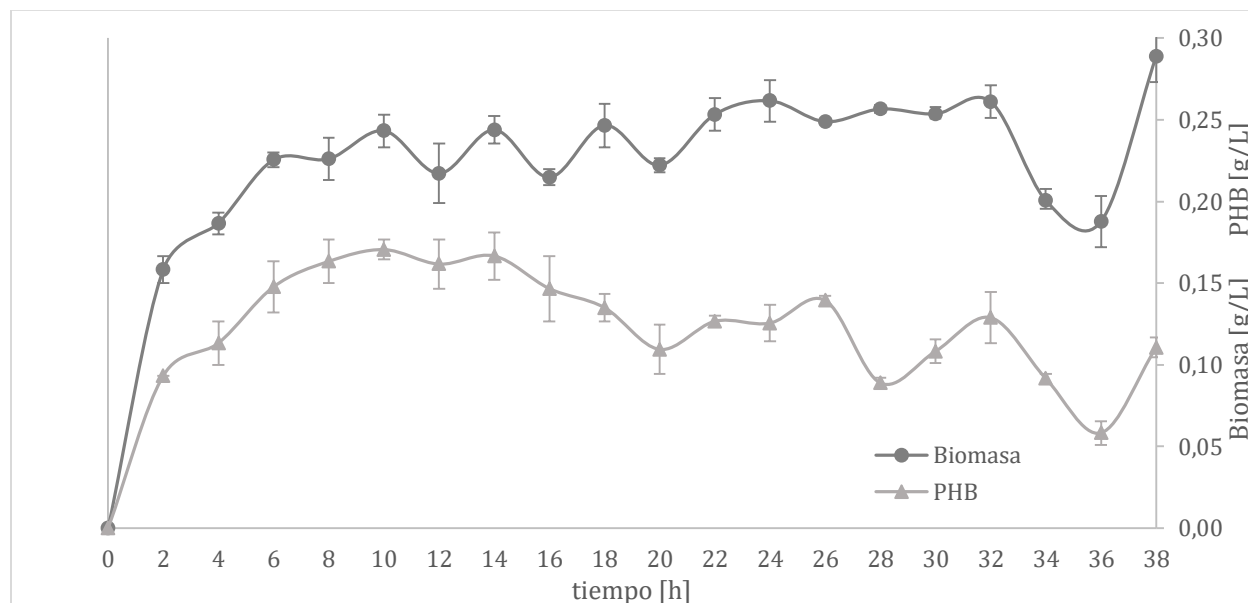


Apéndice K. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 6.89 y factor de concentración de sales 0.88

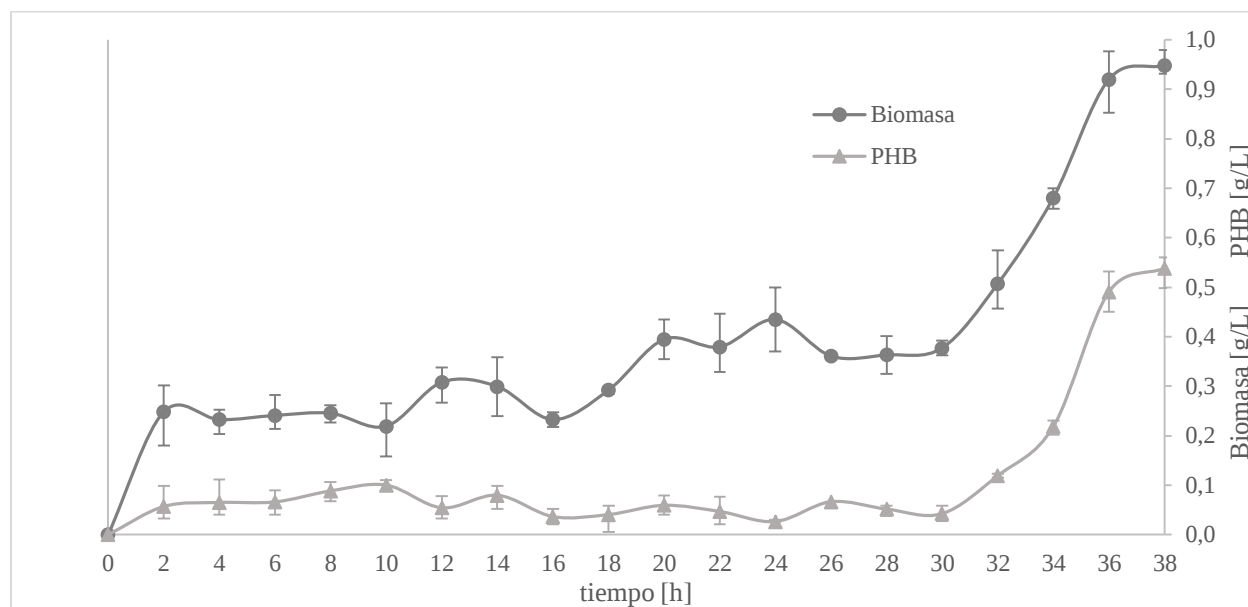


CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Apéndice L. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 17.5 y factor de concentración de sales 0.7

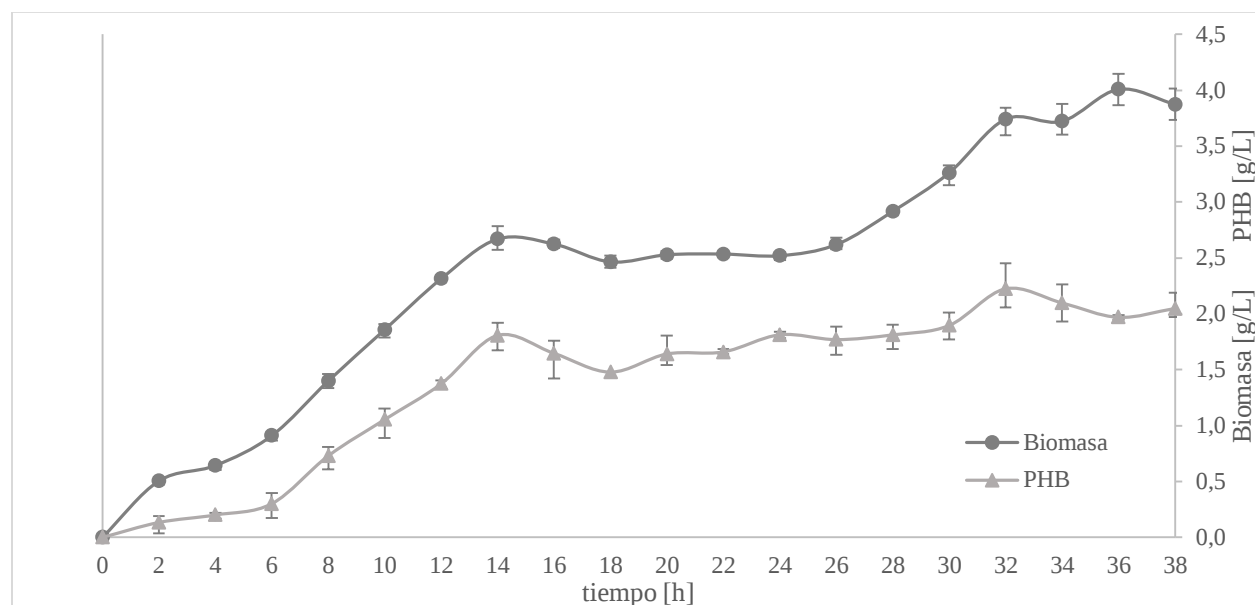


Apéndice M. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 17.5 y factor de concentración de sales 0.88

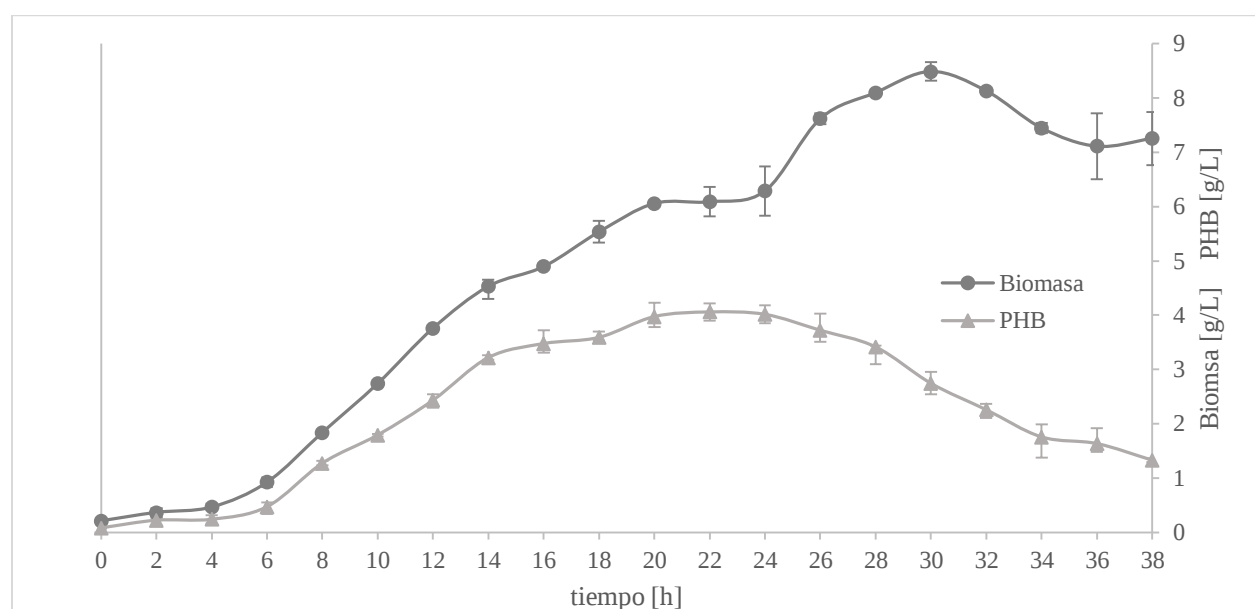


CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Apéndice N. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 17.5 y factor de concentración de sales 1.05

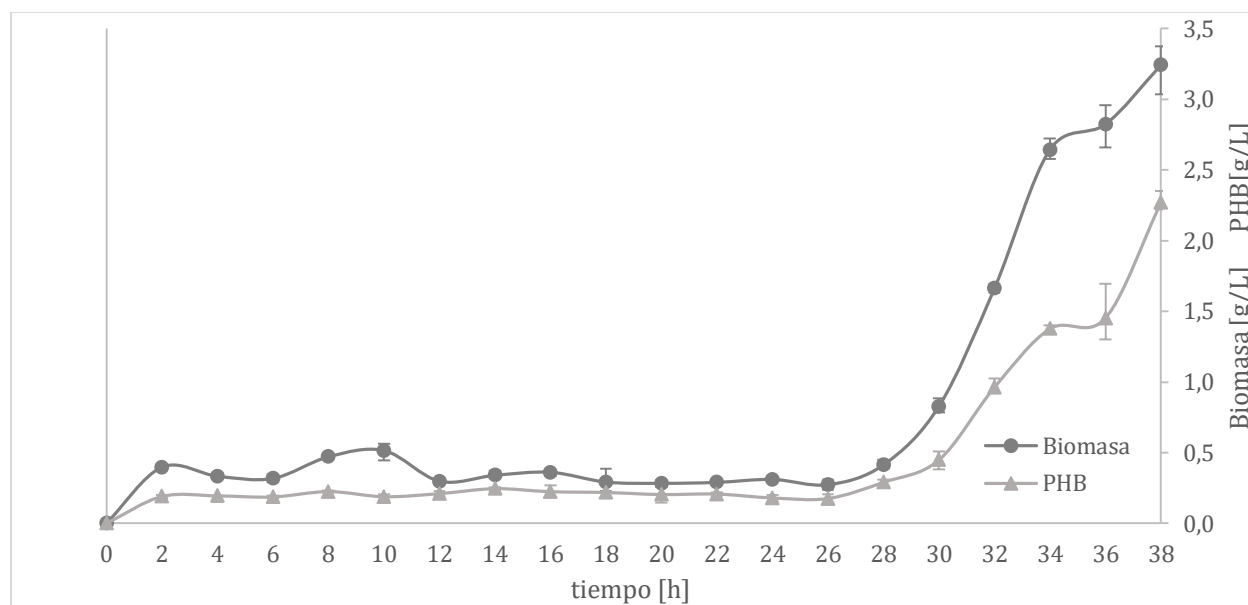


Apéndice O. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 25 y factor de concentración de sales 0.75



CONDICIONES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE PHB

Apéndice P. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 25 y factor de concentración de sales 1.



Apéndice Q. Curva de crecimiento para ensayo de relación carbono-nitrógeno 28.11 y factor de concentración de sales 0.88

