

**ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO EN LA  
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Bacillus megaterium* sp A  
PARTIR DE GLICEROL CRUDO**

**CARLOS MAYORGA BARRERA  
LESLIE KATHERYN MESA VEGA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2018**

**ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO EN LA  
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Bacillus megaterium sp A*  
PARTIR DE GLICEROL CRUDO**

**CARLOS MAYORGA BARRERA  
LESLIE KATHERYN MESA VEGA**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:  
Ingeniero Químico

**Director**

**Humberto Escalante Hernández  
Ph.D en Ingeniería Química.**

**Codirectores**

**Víctor Alexis Lizcano González  
Ing. Químico.**

**Mabel Juliana Quintero Silva  
M.Sc en Ciencias Básicas Biomédicas.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2018**

*A mi madre Silvia Barrera, por brindarme su confianza y enseñarme el valor de la responsabilidad y compromiso, gracias también por estar siempre pendiente de mí y colaborarme en todo.*

*A mi padre Carlos Mayorga, porque gracias a su sacrificio y esfuerzo logré culminar esta carrera, gracias por ser mi apoyo y transmitirme el valor de la paciencia y honestidad.*

*A mi hermano Andrés Mayorga, por escucharme y darme consejos, gracias por motivarme a seguir adelante.*

*A mis tías Esperanza Barrera, Omaira Barrera y mi abuelo Argemiro Barrera, por creer en mí, colaborarme económicamente y por el constante apoyo.*

*A mi pimpollo Leslie Mesa, por ser mi amiga, compañera de proyecto y mi mano derecha, gracias por brindarme tu desinteresada ayuda, por las traspasadas estudiando y por todos los momentos compartidos contigo.*

**Carlos Mayorga Barrera**

*A Dios, por ser mi guía y brindarme la paciencia y entendimiento para culminar esta gratificante etapa de mi vida*

*A mi madre Gloria Vega, por darme las bases de la responsabilidad y perseverancia, siendo ella el mejor ejemplo por sus infinitas virtudes y su gran bondad, gracias por tus valiosos consejos y por darme ánimo para superar los problemas.*

*A mi padre Gregorio Mesa, por enseñarme que con disciplina y constancia cualquier meta se puede conseguir, gracias por impulsarme a alcanzar mis propósitos y ser mi apoyo incondicional.*

*A mi hermanita Sofy, por ser mi cómplice de travesuras, alegrarme los días con sus ocurrencias y ser mi motivación para cada día ser mejor.*

*A mi novio Wilmer, por celebrar mis éxitos, compartir mis tristezas, brindarme su cariño y ser mi gran apoyo*

*A mi amigo Carlos Mayorga, por ser mi confidente, gracias por compartir tus conocimientos conmigo, por las traspasadas estudiando y por el gran trabajo en equipo para culminar satisfactoriamente esta investigación.*

**Leslie Mesa Vega**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al profesor Humberto Escalante y la profesora Mabel Quintero por su orientación, seguimiento y apoyo brindado.

Al Ingeniero Víctor Lizcano por compartir su conocimiento, su constante motivación y su invaluable dedicación en el desarrollo de este proyecto.

Al Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales CEIAM por brindarnos la oportunidad de tener este proceso de aprendizaje y desarrollar los experimentos en sus laboratorios.

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos CICTA, por el préstamo de su laboratorio para el análisis de los resultados.

A nuestros maestros de la Escuela de Ingeniería Química por brindarnos las bases académicas para la culminación de este trabajo de grado.

Gracias a todos.

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN .....	16
1. METODOLOGÍA.....	22
1.1 FASE I .....	22
1.1.1 Microorganismo. ....	22
1.1.2 Medio de Cultivo. ....	23
1.1.3 Condiciones de Cultivo. ....	24
1.2 FASE II.....	25
1.2.1 Realización de cultivos en modo batch evaluando las concentraciones de oxígeno disuelto de 5%, 25% y 50%.....	25
1.2.2. Realización de cultivo en modo batch para evaluar la concentración de oxígeno disuelto que favorece la producción de PHB.....	27
2. RESULTADOS .....	28
2.1 CONSTRUCCIÓN DE CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Bacillus megaterium</i> . 28	
2.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO EN LA PRODUCCIÓN DE PHB. ....	29
2.3 DETERMINACION DE LA CONDICIÓN QUE FAVORECE LA PRODUCCIÓN DE PHB. ....	35
3. CONCLUSIONES.....	37
4. RECOMENDACIONES .....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39
ANEXOS.....	42

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ruta metabólica para la síntesis de PHB.....	19
Figura 2. Esquema metodológico. ....	22
Figura 3. Curva de crecimiento de <i>Bacillus megaterium B2</i> . ....	28
Figura 4. Cinética de crecimiento de <i>Bacillus megaterium B2</i> para una concentración de 5%, 25% y 50% de OD. ....	30
Figura 5. Cinética de consumo de glicerol crudo de <i>Bacillus megaterium B2</i> para una concentración de 5%, 25% y 50% de OD. ....	31
Figura 6. Cinética de consumo de nitrógeno de <i>Bacillus megaterium B2</i> para una concentración de 5%, 25% y 50% de OD. ....	32
Figura 7. Control en lazo cerrado de oxígeno en el bioreactor para las concentraciones de 5%, 25% y 50% de OD. ....	33
Figura 8. Cinética de producción de PHB de <i>Bacillus megaterium B2</i> para las condiciones de 5%, 25% y 50% de OD. ....	34
Figura 9. Perfil de producción de PHB en función de los niveles de saturación de oxígeno evaluados (5%, 25%, 50% y 75% de OD). ....	36

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Medio de sales.....	23
Tabla 2. Caracterización del GRIB.....	24
Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento para 5%, 25% y 50 % de oxígeno disuelto. ....	30
Tabla 4. Parámetros de productividad para 5%, 25% y 50% de oxígeno disuelto.	35

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Análisis de desviación media. ....	42
Anexo B. Tendencias.....	45
Anexo C. Tipo de metabolito según la concentración de OD.....	47
Anexo D. Cinéticas para la concentración de 75 % de OD.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

PHAS: Polihidroxicanoatos

PHB: Polihidroxiacetato

C/N: Relación Carbono/Nitrógeno

LPS: Lipopolisacáridos

OD: Oxígeno Disuelto

GRIB: Glicerol crudo residuo de la industria del biodiesel

PTAR: Planta de tratamiento de aguas residuales

KLa: Coeficiente de transferencia de masa

PVDF: Polifluoruro de Vinilideno

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO EN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Bacillus megaterium* sp A PARTIR DE GLICEROL CRUDO\*.

**AUTORES:** CARLOS MAYORGA BARRERA\*\*, LESLIE KATHERYN MESA VEGA\*\*.

**PALABRAS CLAVE:** POLIHIDROXIBUTIRATO, GLICEROL CRUDO, OXIGENO DISUELTO

**DESCRIPCIÓN:** El elevado consumo de plásticos sintéticos se ha convertido en una fuente significativa de contaminación por su acumulación como residuos sólidos y elevadas emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera durante su fabricación. Una alternativa para reemplazar estos plásticos convencionales es el uso de biopolímeros como el Polihidroxitirato (PHB). Estos bioplásticos se sintetizan y acumulan intracelularmente a través de una gran variedad de microorganismos. Se han detectado acumulaciones de PHB en diferentes cepas de *Bacillus megaterium*, la variable más reportada en la literatura para esta cepa es el nitrógeno, sin embargo el oxígeno también tiene influencia en la producción de PHB. Dado esto, en el presente trabajo se evaluó el efecto de cuatro niveles de saturación de oxígeno (5%, 25%, 50% y 75%) en la producción de PHB, empleando una cepa nativa de *Bacillus megaterium* B2. Se realizaron cultivos Batch en un biorreactor de 7.5 L con un volumen de trabajo de 4 L; se empleó glicerol crudo como única fuente de carbono con una concentración inicial de 20 g/L, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, el aire de suministro fue de 1 L/min y la saturación de oxígeno disuelto en el medio se midió a través del sensor polarografico del bioreactor y se controló mediante agitación entre 200 y 600 rpm. Finalmente, se encontró que una limitación excesiva de oxígeno disuelto no favorece la producción de PHB debido a que la concentración de oxígeno en el medio es insuficiente para satisfacer la demanda aeróbica de los microorganismos, asimismo un suministro alto de oxígeno disuelto favorece solamente el crecimiento de biomasa pero la producción de PHB decrece. En conclusión, la condición que favorece la máxima producción de PHB (1.5927 g/L) es 50% de oxígeno disuelto.

---

\* Trabajo de grado

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

## ABSTRACT

**TITLE:** STUDY OF DISSOLVED OXYGEN CONCENTRATION IN THE PRODUCTION OF POLYHYDROXIBUTIRATE (PHB) BY *Bacillus megaterium* sp FROM CRUDE GLYCEROL\*

**AUTHORS:** CARLOS MAYORGA BARRERA\*\*, LESLIE KATHERYN MESA VEGA\*\*.

**KEYWORDS:** POLYHYDROXIBUTIRATE, CRUDE GLYCEROL, DISSOLVED OXYGEN

**DESCRIPTION:** The high consumption of synthetic plastics has become a significant source of pollution due to their accumulation as solid waste and high CO<sub>2</sub> emissions into the atmosphere during their manufacture. An alternative to replace these conventional plastics is the use of biopolymers such as Polyhydroxybutyrate (PHB). These bioplastics are synthesized and accumulated intracellularly through a wide variety of microorganisms. Although accumulations of PHB have been detected in different strains of *Bacillus megaterium*. The variable most reported in the literature for this strain is nitrogen, however oxygen also has influence of the PHB production. Given this, in the present work the effect of three levels of oxygen saturation (5%, 25%, 50% y 75%) on the production of PHB was evaluated, using a native strain of *Bacillus megaterium* B2, cultivation Batch was realized in a biorreactor of 7.5 L with a volume of work of 4 L; Crude glycerol was used as the only source of carbon with an initial concentration of 20 g/L, ammonium sulphate as a source of nitrogen, the supply air was 1 L/min and the oxygen saturation dissolved in the medium was measured through the polarografico sensor of the Bioreactor and was controlled by agitation between 200 and 600 rpm. Finally, it was found that the saturation of dissolved oxygen in the medium influences the metabolism of *Bacillus megaterium* B2, an excessive limitation of dissolved oxygen does not favor the production of PHB because the concentration of oxygen in the medium is insufficient to meet the aerobic demand of the microorganisms, also, a high supply of dissolved oxygen (75% OD) favors the growth of biomass but the production of PHB decreases. In conclusion, the condition that favors the maximum production of PHB (1.5927 g/L) is 50% dissolved oxygen.

---

\* Bachelor Thesis

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

## INTRODUCCIÓN

La producción mundial de plásticos sintéticos en el año 2016 fue de 322 millones de toneladas y los pronósticos indican un crecimiento anual del 4%.<sup>1</sup> Esta demanda ha generado un escenario aterrador para el medio ambiente dado que estos materiales son recalcitrantes a la degradación microbiana, convirtiéndose en una fuente significativa de contaminación por su acumulación como residuos sólidos e importantes emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera durante su fabricación. Adicionalmente, se emplea petróleo, el cual es un recurso no renovable con reservas limitadas.<sup>2</sup>

Aunque existen diferentes procesos para disminuir la cantidad de desechos plásticos como: la incineración, reciclaje y fotodegradación, estos siguen siendo insuficientes para el tratamiento de las grandes cantidades de plásticos que se consumen, por tanto, millones de toneladas que no pudieron ser tratadas terminan en los vertederos y océanos.<sup>3</sup> Debido a la incapacidad de procesar en su totalidad los desechos plásticos, actualmente existen diferentes estrategias para reducir el consumo de plásticos derivados del petróleo.

Una alternativa para reemplazar estos plásticos convencionales es el uso de biopolímeros como son los Polihidroxicanoatos (PHAs). Los PHAs se sintetizan y se acumulan intracelularmente a través de una gran variedad de microorganismos. El PHA más estudiado es el Polihidroxibutirato (PHB), este biopolímero posee propiedades termoplásticas y mecánicas similares al polipropileno por lo cual

---

<sup>1</sup> WORLD ECONOMIC FORUM. The new plastics economy. Ginebra: 2016. [En línea]. (Recuperado en 9 de enero 2017). Disponible en [http://www3.weforum.org/docs/WEF\\_The\\_New\\_Plastics\\_Economy.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf).

<sup>2</sup> GANGURDE, N y SAYYED, R., Poly-β-hydroxybutyrate (PHB): A Biodegradable Polymer of Microbial Origin. En: Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials. 2012, p. 46-59.

<sup>3</sup> GONZÁLES, Yolanda, *et al.* Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. En: Revista Internacional de contaminación ambiental. 2013, vol.29., p.77-115.

presenta un amplio rango de aplicación en la industria, la medicina, la farmacología y la agricultura.<sup>4</sup>

La producción industrial de PHB se realiza mediante vía fermentativa principalmente usando cepas Gram negativas como *Cupriavidus necator*, *Azohydromonas lata*, *Escherichia coli* recombinante y *Pseudomonas putida*<sup>5</sup>. Sin embargo, Desde el año 2001 han tomado gran interés las cepas Gram Positivas debido a sus múltiples ventajas operacionales como: rápido crecimiento y tolerancia a altas concentraciones de sales.<sup>6</sup> Otro aspecto favorable de las cepas Gram Positivas es la posibilidad del desarrollo de aplicaciones biomédicas, pues este tipo de bacterias no posee lipopolisacáridos en su membrana (LPS), los cuales se coextraen con el PHB y causan reacciones inmunogénicas.<sup>7</sup>

Entre las bacterias Gram positivas se destaca *Bacillus megaterium* debido a su mayor productividad y menores restricciones en las condiciones de fermentación. *Bacillus megaterium* es un microorganismo aerobio estricto con forma de bastón, productor de esporas con morfología cilíndrica, lo que le permite resistir condiciones desfavorables y tolerar altas temperaturas. Este microorganismo posee un crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5 - 8.5.<sup>8</sup> Se puede encontrar en diversos ambientes, entre los que sobresalen el suelo, agua de mar y las plantas de tratamiento residuales (PTAR). Esta especie puede aprovechar diferentes fuentes de carbono, desde azúcares de fácil asimilación como la

---

<sup>4</sup> CHEN, G., A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. En: Royal society of chemistry. 2009, vol.38, no.8., p. 2434-2446.

<sup>5</sup> FACCIN, D., *et al.* Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. En: Journal Chemistry Biotechnology. 2009, vol.84., p.1756–1761.

<sup>6</sup> Omar, S., *et al.* Optimization of cell growth and poly(3-pydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. Biotechnol. Lett. 2001, vol.23.,p.1119-1123.

<sup>7</sup> BONARTSEV, Anton, *et al.* Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3- hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. En: Communicating Current Research and Educational 24 Topics and Trends in Applied Microbiology. 2007, p. 295-307.

<sup>8</sup> MORENO, Paolo, *et al.* Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology ELSEVIER. Diciembre, 2015, vol.32, no.6., p. 682-689.

sacarosa, glucosa y maltosa, hasta residuos industriales como el glicerol crudo y las melazas.<sup>9</sup>

El Polihidroxibutirato (PHB) no es un componente esencial para las bacterias, por lo tanto no se forma en todas las circunstancias. La síntesis se inicia como respuesta a las condiciones adversas del medio, ya sea por déficit de uno o varios nutrientes como nitrógeno, oxígeno, fósforo y siempre en condiciones de exceso de fuente de carbono. El PHB se deposita intracelularmente en formas de cuerpos de inclusión y puede llegar a representar más del 90% del peso seco celular.<sup>10</sup>

Para entender la influencia de los nutrientes del medio con respecto a la producción de PHB se debe analizar el metabolismo de la cepa. En la Figura 1 se muestra la ruta metabólica para la síntesis y degradación de PHB. Inicialmente la fuente de carbono sufre una serie de transformaciones enzimáticas que lo convierten en la molécula intermediaria Acetil-CoA, este es el punto de partida tanto para la producción de PHB como para el ciclo de Krebs.

La concentración de amonio y oxígeno tienen una fuerte influencia sobre la producción de PHB. Diferentes estudios han mostrado que en ausencia de fuente de nitrógeno, el microorganismo no sintetiza efectivamente aminoácidos, ya que el sustrato portador de energía NAD(P)H no puede ser utilizado en el proceso de aminación reductiva; la acumulación de NAD(P)H en el medio impide la aparición de la enzima citrato sintasa, la cual es promotora del ciclo de Krebs, generando así un incremento en la concentración de Acetil-CoA, por lo que automáticamente se desplaza la cinética hacia la ruta de formación de PHB.<sup>11</sup>

---

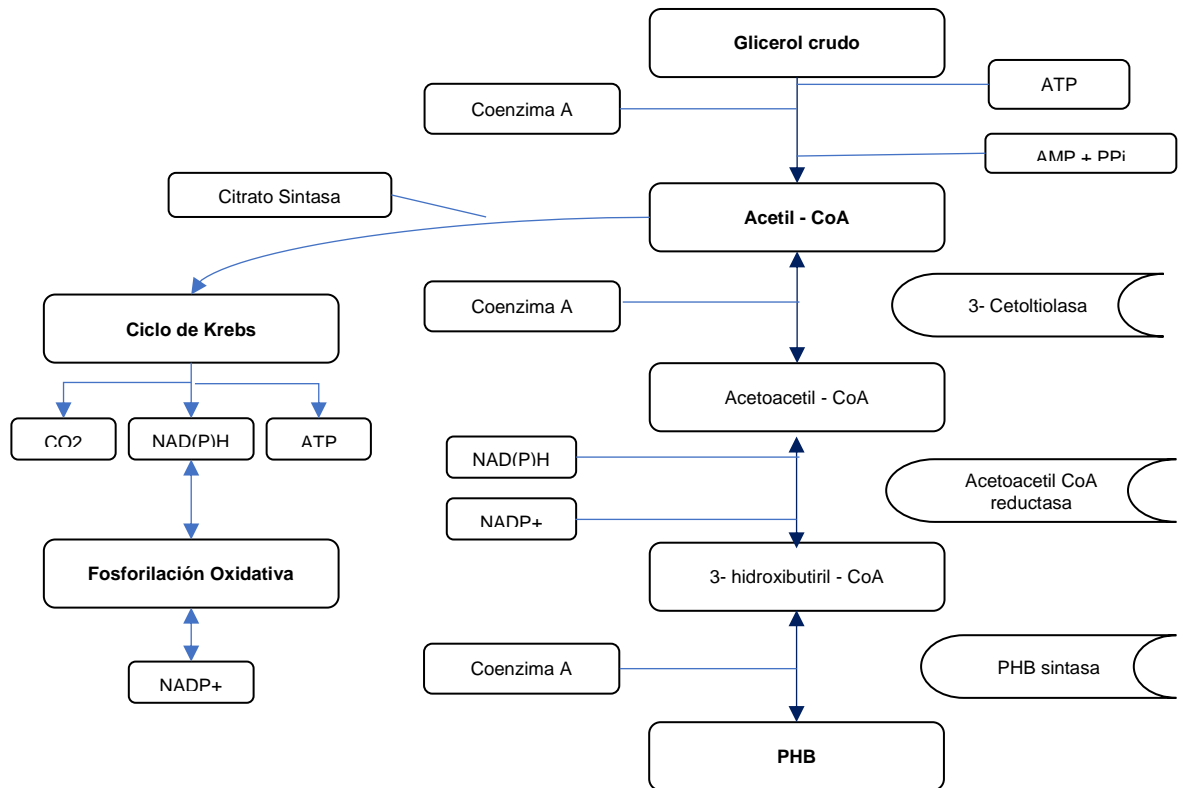
<sup>9</sup> KOLLER, M., *et al.* Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. En: Engineering in life sciences, 2011, vol.11, no.3., p.222-237.

<sup>10</sup> LÓPEZ, Jimmy, *et al.* Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. En: Biotechnology and Bioprocess Engineering. Noviembre, 2012, vol.17., p.250-258.

<sup>11</sup> BABEL, Wolfgang; ACKERMANN, Jorge Uwe y BREUER, Uta. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2001, vol. 71., p. 128-139.

Por otra parte, bajas saturaciones de oxígeno impide el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa, a causa de esto se incrementa la concentración NAD(P)H, de manera que el Acetil-CoA se emplea en la producción de PHB como estrategia de almacenamiento de fuente de carbono.<sup>12</sup>

Figura 1. Ruta metabólica para la síntesis de PHB.



Fuente: BABEL, Wolfgang; ACKERMANN, Jorge Uwe y BREUER, Uta. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2001, vol. 71., p. 128-139.

Aunque las ventajas del PHB son evidentes, este no ha podido reemplazar totalmente los plásticos convencionales dado su elevado costo de producción, donde la fuente de carbono oscila entre el 30-40 % del costo total,<sup>13</sup> es por esto que las investigaciones sobre la producción del biopolímero se han enfocado

<sup>12</sup> BABEL, Wolfgang; ACKERMANN, Jorge Uwe y BREUER, Uta. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2001, vol. 71., p. 128-139.

<sup>13</sup> CHANPRATEEP, Suchada. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. 2010, vol. 110., p. 621-632.

principalmente en reducir costos e incrementar la productividad del proceso. Una de las estrategias implementadas es el uso de microorganismos nativos ya que ofrecen mayor adaptación durante las condiciones de fermentación y disminuye el uso de antibióticos en comparación con los microorganismos genéticamente modificados, demostrando rendimientos de PHB similares o incluso mayores que los reportados en la literatura por otras cepas de referencia.<sup>12</sup> Otra estrategia es el uso de residuos agroindustriales tales como melaza de caña de azúcar, jarabe de dátil y glicerol crudo como fuentes de carbono.

Colombia es uno de los principales productores de biodiesel en Latinoamérica. En el año 2016 la producción total de biodiesel fue de 413 mil toneladas.<sup>14</sup> El subproducto de esta industria es el glicerol crudo (GRIB) y representa el 10 % en peso del biodiesel producido, generando sobreoferta y bajo costo de este subproducto. El exceso de GRIB ha impulsado su uso en procesos microbiológicos como la producción de polihidroxicanoatos, donde es aprovechado como fuente de carbono, y se ha reportado que el uso de glicerol crudo posee mayores ventajas que la glucosa.<sup>15</sup>

Así mismo, se han reportado diversas investigaciones sobre la producción de PHB por *Bacillus megaterium*. Empleando la cepa DSMZ90 y utilizando sacarosa como fuente de carbono se concluyó que el factor con mayor influencia sobre la producción de PHB es la concentración de oxígeno disuelto (%OD), la cual se fijó de 1 a 3% de saturación en el medio, logrando una producción de PHB de 5.3 g/L.<sup>16</sup> Resultados similares se obtuvieron con cultivos de *Bacillus megaterium* DSM32, alcanzando una producción de PHB de 3.5 g/L con un coeficiente de

---

<sup>14</sup> FEDERACION NACIONAL DE BIOCOMBUSTIBLES. Producción de biodiesel. Bogotá: 2017. [En línea]. (Recuperado en 6 de septiembre 2017). Disponible en <http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-produccion-titulo Biodiesel.htm>

<sup>15</sup> GANGURDE, N y SAYYED, R., Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB): A Biodegradable Polymer of Microbial Origin. En: Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials. 2012, p. 46-59.

<sup>16</sup> SABRA, W., y ABOU-ZEID, D., Improving Feeding Strategies for Maximizing Polyhydroxybutyrate Yield by *Bacillus megaterium*. En: Resource Journal of Microbiology. 2008, vol.3., p.308–318.

transferencia de masa (KLa) de  $0,006 \text{ s}^{-1}$  ( $OD \approx 0$ ),<sup>17</sup> mientras que bajo las mismas condiciones y una concentración de OD superior a 40%, la máxima concentración de PHB alcanzada fue de 1.4 g/L.<sup>18</sup>

En contraste con los resultados mostrados anteriormente, un aumento en la disponibilidad de oxígeno disuelto de 20% a 80%, utilizando la cepa de *Bacillus megaterium* BBST4 y glicerol crudo como fuente de carbono, generó un incremento en la producción de PHB de 3.4 g/L<sup>19</sup> a 4.8 g/L.<sup>20</sup> Adicionalmente se ha estudiado una cepa nativa identificada como *Bacillus megaterium* B2 y glicerol crudo como fuente de carbono alcanzando una producción de PHB de 1.2 g/L en un medio sin control de oxígeno.<sup>21</sup>

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de la concentración de oxígeno en la producción de PHB empleando la cepa *Bacillus megaterium* B2, glicerol crudo como única fuente de carbono y realizando cultivos modo Batch en un biorreactor de 7.5 litros con un volumen de trabajo de 4 litros. Se plantearon los siguientes objetivos específicos: analizar el efecto de la concentración de oxígeno en las cinéticas de producción de PHB, Biomasa, consumo de nitrógeno y glicerol crudo, así como determinar y validar la concentración que favorece la producción PHB.

---

<sup>17</sup> LUVIZETTO, D., *et al.* Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. En: Process Biochemistry. 2013, vol.48., p.420–425.

<sup>18</sup> FACCIN, D., *et al.* Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. En: Journal Chemistry Biotechnology. 2009, vol.84., p.1756–1761.

<sup>19</sup> LÓPEZ, Jimmy, *et al.* Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. En: Biotechnology and Bioprocess Engineering. Noviembre, 2012, vol.17., p.250-258.

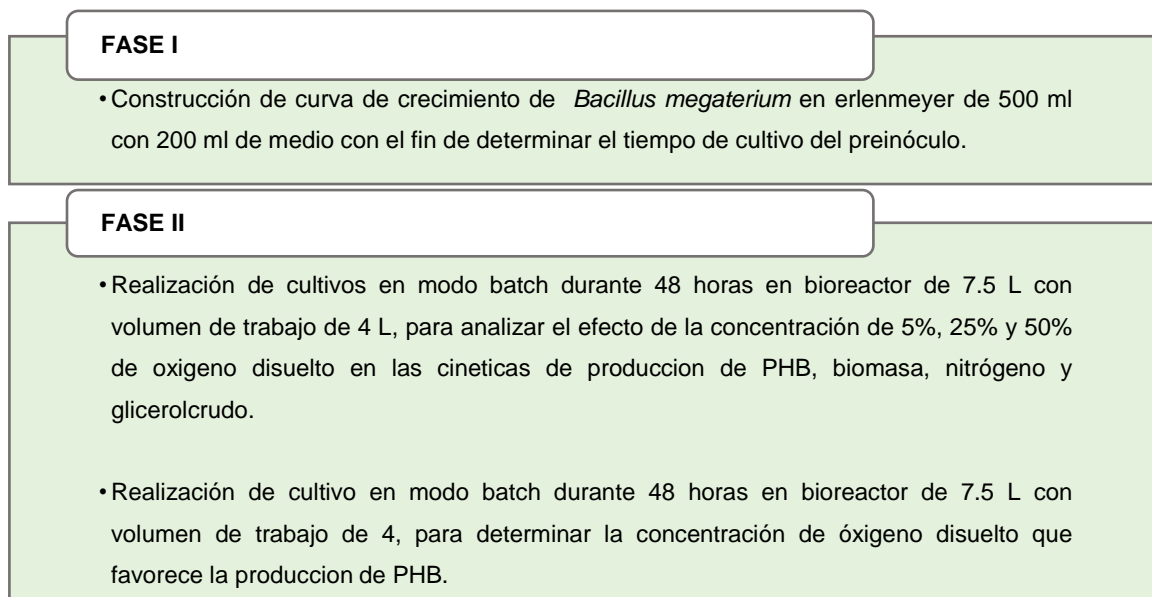
<sup>20</sup> NARANJO, Javier. Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales. Tesis para optar por el título de Magister en Ingeniería Química. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería, 2010, 217p.

<sup>21</sup> MORENO, Paolo, *et al.* Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology ELSEVIER. Diciembre, 2015, vol.32, no.6., p. 682-689.

## 1. METODOLOGÍA

En la Figura 2 se presenta la metodología desarrollada para la producción de PHB a partir de *Bacillus megaterium* B2 bajo diferentes niveles de saturación de oxígeno.

Figura 2. Esquema metodológico.



### 1.1 FASE I

1.1.1 Microorganismo. La cepa *Bacillus megaterium* B2 utilizada en este proyecto fue aislada e identificada por Moreno, *et al.*<sup>22</sup> y adaptada para producir PHB a partir de glicerol crudo como fuente de carbono, con una concentración inicial de 20 g/L. El stock de cepas criopreservadas se mantuvo en medio basal con 200 g/L de glicerol crudo y se mantuvo a - 21 ° C.

<sup>22</sup> MORENO, Paolo, et al. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: *New Biotechnology* ELSEVIER. Diciembre, 2015, vol.32, no.6., p. 682-689.

1.1.2 Medio de Cultivo. El medio de cultivo se preparó con las concentraciones descritas en la Tabla 1, <sup>23</sup> la fuente de carbono usada fue glicerol crudo a una concentración de 20 g/L para todos medios y la fuente de nitrógeno usada fue sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Tabla 1. Medio de sales.

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN (g/L)
<i>Glicerol crudo</i>	20
<i>Sulfato de amonio</i>	1
<i>Sulfato de magnesio heptahidrato</i>	0.2
<i>Fosfato diácido de potasio</i>	1.5
<i>Fosfato ácido de sodio</i>	1.18
<b>Elementos Traza N</b>	0.1
<i>Sulfato de hierro heptahidratado</i>	10
<i>Sulfato de zinc heptahidratado</i>	2.25
<i>Sulfato de cobre pentahidratado</i>	1
<i>Sulfato de manganeso tetrahidratado</i>	0.5
<i>Cloruro de calcio dihidratado</i>	2
<i>Ácido bórico</i>	0.23
<i>Molibdato de amonio</i>	0.2
<i>Ácido clorhídrico</i>	10

El glicerol crudo usado en este proyecto fue obtenido en la planta de producción de biodiesel BIO D ubicada en Facatativá. En esta planta, el biodiesel es producido con aceite de palma africana y metóxido de sodio, posteriormente es lavado con una solución diluida de ácido acético. El GRIB es mezclado con las

<sup>23</sup> MORENO, Paolo, et al. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: *New Biotechnology* ELSEVIER. Diciembre, 2015, vol.32, no.6., p. 682-689.

aguas de lavado del biodiesel para disminuir la viscosidad. Las muestras de GRIB fueron recolectadas en recipientes de vidrio, almacenadas a 4°C y se mantuvieron a una concentración de 20 g/L para todos los experimentos. En la Tabla 2 se presenta la caracterización del glicerol crudo utilizado.<sup>24</sup>

Tabla 2. Caracterización del GRIB.

PARÁMETRO	VALOR
<i>pH</i>	6.41 ± 0.12
<i>Densidad (g/mL)</i>	1.04 ± 0.01
<i>Glicerol crudo (% p/p)</i>	47.42 ± 0.23
<i>Humedad (% p/p)</i>	45.42 ± 0.02
<i>Cenizas (% p/p)</i>	2.85 ± 0.25
<i>Metanol (% p/p)</i>	3.57 ± 0.05
<i>Jabones (% p/p)</i>	1.34 ± 0.17

Los principales componentes del GRIB son glicerol crudo y agua. El alto contenido de agua disminuye la viscosidad del glicerol permitiendo su fácil manejo con instrumentos volumétricos. La muestra presenta un bajo contenido de las sustancias que podrían inhibir el crecimiento microbiano (cenizas, metanol y jabones) por lo tanto durante todo el estudio descrito se utilizó el GRIB sin ningún pretratamiento.

1.1.3 Condiciones de Cultivo. Para la reactivación, se inoculó 1 ml de la cepa de *B. megaterium* en un erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de sales (Tabla 1), se incubó a 34°C en un agitador orbital (Unimax 1010) a 200 rpm durante 12 horas.

---

<sup>24</sup> MORENO, Paolo, et al. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: *New Biotechnology* ELSEVIER. Diciembre, 2015, vol.32, no.6., p. 682-689.

Luego se inocularon 4 ml de este medio en un erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de medio de la misma composición. Los erlenmeyer se mantuvieron a 34°C y 200 rpm. Se tomaron muestras cada 6 horas y se realizaron siembras en caja de Petri de agar nutritivo de composición: 15 g/L agar, 15 g/L peptona, 3 g/L extracto de levadura, 6 g/L NaCl y 20 g/L glicerol crudo, con el fin de realizar recuento en placa y calcular el número de unidades formadoras de colonias (UFC).<sup>25</sup>

## 1.2 FASE II

1.2.1 Realización de cultivos en modo batch evaluando las concentraciones de oxígeno disuelto de 5%, 25% y 50%. La producción de PHB se realizó en modo batch durante 48 h en un biorreactor de 7.5L (BioFlo 115; New Brunswick Scientific, USA) con un volumen de trabajo de 4 L, cada montaje inició con las siguientes condiciones: concentración de glicerol crudo de 20 g/L, relación carbono/nitrógeno (C/N) de 10, temperatura de 34 °C y 7 mg/L de oxígeno disuelto (100%OD). La concentración de oxígeno disuelto fue medida a través de un sensor portátil polarografico.

En cada montaje se introdujo el medio de sales al bioreactor; para acondicionar y homogeneizar el medio se encendió el control de la agitación y temperatura en 400 rpm y 34°C respectivamente. Los sensores de pH y OD se calibraron con el fin de asegurar que el medio se estabilizara a un pH de 7 y 100% de OD (medio saturado). El pH se mantuvo en 7 y se controló mediante adición automática de solución de KOH 2M. El flujo de aire se mantuvo en 1 L/min y la saturación de oxígeno en el medio se controló automáticamente mediante agitación (entre 200 y 600 rpm). Se evaluaron por duplicado tres concentraciones de oxígeno disuelto: 0.35, 1.75 y 3.5 mgO<sub>2</sub>/L, que corresponden a 5%, 25% y 50% de saturación de OD respectivamente. El intervalo de OD se definió según valores reportados en la

---

<sup>25</sup> MORENO, Paolo, et al. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: *New Biotechnology* ELSEVIER. Diciembre, 2015, vol.32, no.6., p. 682-689.

literatura como déficit<sup>26</sup> y exceso<sup>27</sup> de oxígeno. Se tomó una muestra cada cuatro horas con el fin de determinar la concentración de PHB, Biomasa, Glicerol crudo y Nitrógeno. Los procedimientos realizados para la cuantificación de estas variables fueron descritos por *Moreno et,al.*<sup>28</sup>

La cuantificación de biomasa se realizó mediante el método de gravimetría, 15 mL de medio de cultivo se centrifugaron durante 8 minutos a 8000 rpm en tubos falcón previamente pesados, el pellet formado se secó a 60°C por 24 h. La masa del peso total de células se calculó por diferencia de peso con respecto al tubo vacío. Un ml del sobrenadante se filtró empleando membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 0.45 µm y se almacenó para la cuantificación de glicerol crudo.

Para la determinación de PHB, se centrifugaron 2 mL de medio de cultivo bajo las mismas condiciones, el pellet formado se liofilizó y se realizó una hidrólisis ácida con 1 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 97% y a 200 °C por 30 minutos, con el fin de convertir el PHB en ácido crotónico. Las muestras se diluyeron 50 veces con una solución de 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y posteriormente se filtraron empleando membranas de PVDF de 0.45 µm y se almacenaron en viales de cromatografía.

El contenido de nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl, 5 mL de sobrenadante se llevaron a reacción con 150 mL de solución de NaOH a 8.3 M, la mezcla se sometió a destilación por arrastre con vapor en un destilador Kjeldahl UDK 129 (Velp Scientifica) por 5 minutos. El destilado fue condensado en una solución de ácido bórico de 1% p/v. La presencia de amoníaco genera un viraje al color verde en la solución de ácido bórico debido a la presencia de indicador mixto

---

<sup>26</sup> SABRA, W., y ABOU-ZEID, D., Improving Feeding Strategies for Maximizing Polyhydroxybutyrate Yield by *Bacillus megaterium*. En: Resource Journal of Microbiology. 2008, vol.3., p.308–318.

<sup>27</sup> NARANJO, Javier. Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales. Tesis para optar por el título de Magister en Ingeniería Química. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería, 2010, 217p.

<sup>28</sup> MORENO, Paalo, et al. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology ELSEVIER. Diciembre, 2015, vol.32, no.6., p. 682-689.

para titulaciones de amoníaco. Finalmente, el condensado fue llevado a titulación con ácido clorhídrico a 0.05 M.

El glicerol crudo y el PHB fueron cuantificados mediante HPLC en un equipo UltiMate 3000 UHPLC System. Se empleó una columna SupelcoGel C610H de intercambio de iones, se utilizó una solución 5 mM de  $H_2SO_4$  como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min y una temperatura en la columna de 60 °C. La detección de glicerol crudo y PHB se realizó mediante un detector de índice de refracción con temperatura en la celda de 35°C. Para la cuantificación de PHB, la detección del ácido crotónico se llevó a cabo mediante un detector de UV-VIS a una longitud de onda de 221 nm. Adicionalmente para determinar la concentración de oxígeno y pH se utilizó el sensor polarográfico del biorreactor.

1.2.2. Realización de cultivo en modo batch para evaluar la concentración de oxígeno disuelto que favorece la producción de PHB. Se comparó el rendimiento PHB/Biomasa entre cada uno de los niveles de concentración de oxígeno (5%, 25% y 50%) y se estableció el intervalo donde se presentó la mayor producción de PHB. Se realizó una fermentación bajo las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, tomando muestras cada 4 horas para medir las concentraciones de PHB, Biomasa, Glicerol crudo y Nitrógeno. Finalmente, con los resultados obtenidos se identificó el comportamiento de la producción de PHB ante la variación en la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio.

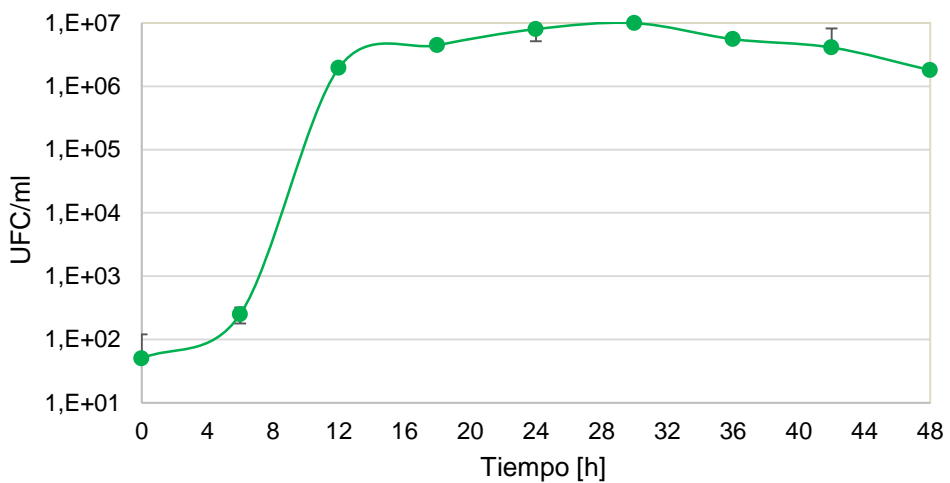
## 2. RESULTADOS

### 2.1 CONSTRUCCIÓN DE CURVA DE CRECIMIENTO DE *Bacillus megaterium*.

En la Figura 3 se observa la cinética de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 durante 48 horas, inicialmente la curva presenta aproximadamente 8 horas de fase de latencia. La corta duración de esta fase se debe probablemente a que la cepa se aisló de glicerol crudo, por lo tanto, la asimilación de esta fuente de carbono es alta. Después de la hora 8 inicia la fase exponencial de 16 horas, seguido de 6 horas de fase estacionaria hasta la hora 30 y finalmente se presenta un decremento en las unidades formadoras de colonias (UFC) que indica la fase de muerte celular.

Mediante el método grafico se concluye que el tiempo de cultivo del preinóculo debe ser de 12 horas, dado que es el tiempo de fermentación donde se alcanza una alta tasa lo cual indica el punto de mayor crecimiento de las células.

Figura 3. Curva de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2.



## 2.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO EN LA PRODUCCIÓN DE PHB.

En las figuras 4, 5, 6, 7 y 8 se reporta el promedio de los duplicados realizados para cada uno de los niveles de oxígeno evaluados (5%, 25% y 50% de OD). Mediante el software Microsoft Excel® se estimó la varianza y desviación relativa, se obtuvieron desviaciones para PHB, Biomasa residual, glicerol crudo y nitrógeno menores al 14%. El resumen del análisis de las desviaciones se encuentra en el **Anexo A**. Posteriormente se calculó el promedio de los datos y se ajustaron los valores a una curva utilizando el software Curve Expert®, estas tendencias y datos experimentales se consignan en el **Anexo B**.

En la Figura 4 se presentan los perfiles de concentración de biomasa para cada uno de los niveles de oxígeno evaluados. Se observa que desde la hora 0 hay un incremento en la producción de biomasa para los 3 niveles de oxígeno, la corta duración de la fase de latencia se debe a que *B. megaterium B2* está adaptada desde el preinóculo a las condiciones del medio.<sup>29</sup> La fase exponencial para las condiciones de 5%, 25% y 50% de OD se detiene en las horas 32, 40 y 24 respectivamente. En las condiciones de 25% y 50 % de OD, la fase de crecimiento desacelerado inicia después de la hora exponencial, sin embargo, para 5% de OD se da la fase estacionaria. La terminación de la fase exponencial para los tres experimentos coincide con el punto donde la disponibilidad de nitrógeno en el medio se agota (Figura 4 y 6).

Se observa que la máxima cantidad de biomasa se alcanza a la hora 24 para la condición de 50% de OD, mientras que para las condiciones de 25% y 5% se da en la hora 40 y 48 respectivamente. En efecto, el aumento de oxígeno disuelto en

---

<sup>29</sup> MORENO, Paolo, et al. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: New Biotechnology ELSEVIER. Diciembre, 2015, vol.32, no.6., p. 682-689.

el medio incrementa la velocidad específica de crecimiento bacteriano como se observa en la Tabla 3.

Figura 4. Cinética de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 para una concentración de 5%, 25% y 50% de OD.

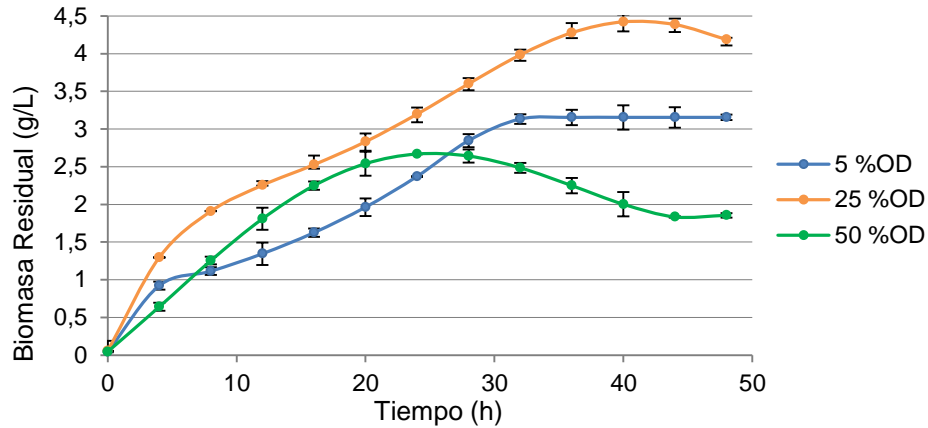


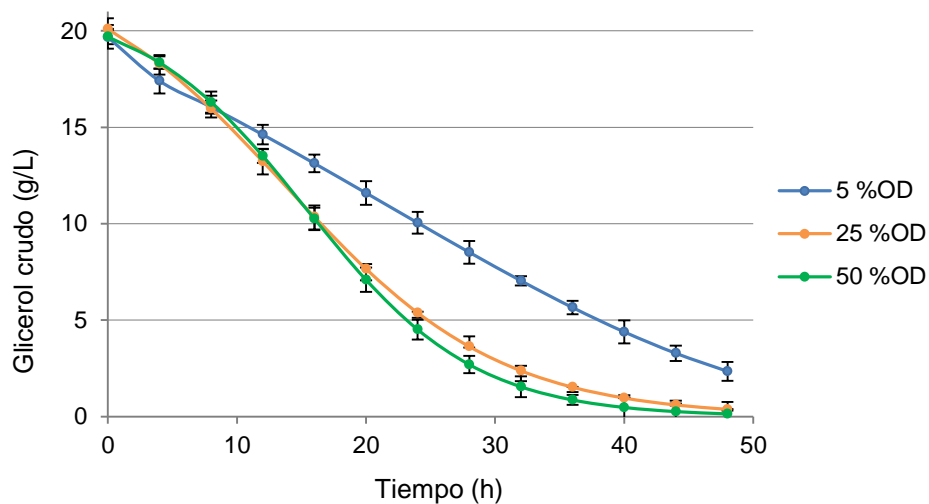
Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento para 5%, 25% y 50 % de oxígeno disuelto.

<b>% OXIGENO DISUELTO (OD)</b>	<b>VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO <math>\mu_{max}</math> [ h<sup>-1</sup> ]</b>
5	0.0527
25	0.0660
50	0.1031

En la Figura 5 se presentan los perfiles de concentración de glicerol crudo para cada uno de los niveles de oxígeno evaluados. Se evidencia una correlación en los perfiles de biomasa y glicerol crudo (Figura 4 y 5) dado que al iniciar la fase exponencial se observa que la concentración de glicerol crudo decrece en función del crecimiento de la biomasa. De acuerdo con la figura 4, en los tres niveles de oxígeno evaluados cesó la producción de biomasa en las horas 32, 40 y 24, sin

embargo el consumo de glicerol crudo finaliza en la hora 48, esto indica que la fuente de carbono se dirige por vías metabólicas que no implican la producción de biomasa (síntesis PHB o respiración celular).<sup>30</sup> El consumo de glicerol crudo para 5%, 25% y 50% de OD fue del 88%, 98% y 99% respectivamente, por tanto a mayor concentración de OD se incrementa el consumo de glicerol crudo.

Figura 5. Cinética de consumo de glicerol crudo de *Bacillus megaterium* B2 para una concentración de 5%, 25% y 50% de OD.



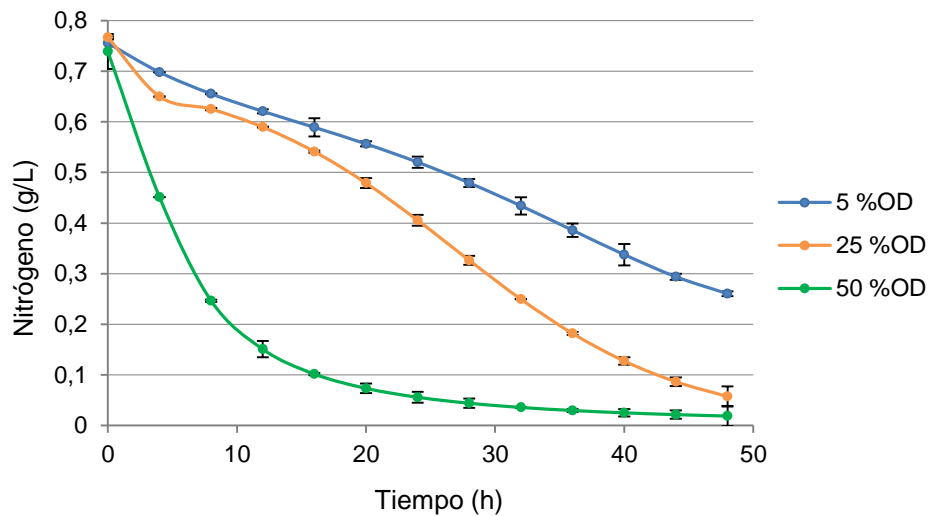
En la Figura 6 se presentan los perfiles de concentración de nitrógeno para los 3 niveles de oxígeno evaluados. El consumo total de nitrógeno en las condiciones de 5%, 25% y 50% de OD fue del 62%, 92% y 97% respectivamente, esto indica que una alta disponibilidad de oxígeno influye significativamente en el consumo de la fuente de nitrógeno.

Para el nivel de 5% de OD se observa una velocidad de consumo lenta y el nitrógeno no se agota totalmente, sin embargo, en los niveles de 25% y 50% de OD la hora en que se agota el nitrógeno coincide con el momento donde finaliza la

<sup>30</sup> FACCIN, D., *et al.* Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. En: Journal Chemistry Biotechnology. 2009, vol.84., p.1756–1761.

fase exponencial (Figura 4). Este comportamiento es reportado por Babel et al, quienes concluyen que cuando se agota la fuente de nitrógeno, la bacteria no logra reproducirse eficientemente debido a que no puede producir aminoácidos por tanto la formación de biomasa se detiene.<sup>31</sup>

Figura 6. Cinética de consumo de nitrógeno de *Bacillus megaterium* B2 para una concentración de 5%, 25% y 50% de OD.



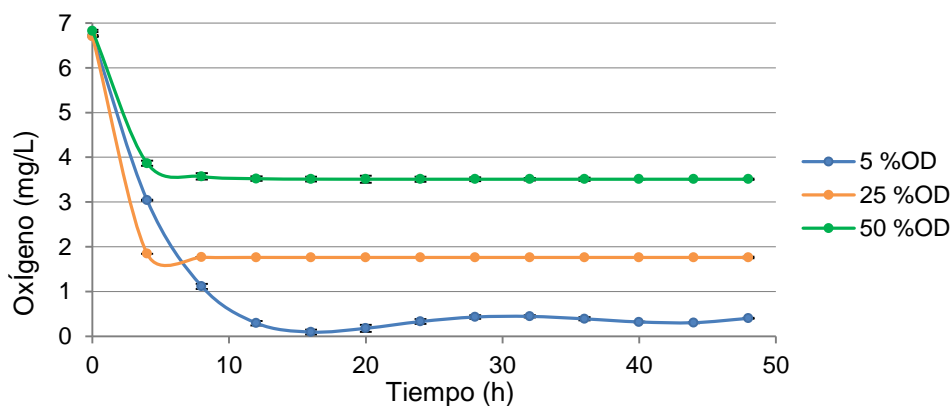
La Figura 7 presenta el consumo de oxígeno para las condiciones evaluadas. Para garantizar el desplazamiento de la ruta metabólica hacia el ciclo de Krebs cada montaje inició con una concentración de oxígeno saturado en el medio (100 %OD). La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo controlada en 5%, 25% y 50% de OD que equivale a 0.35, 1.75 y 3.5 mgO<sub>2</sub>/L.

Se observa que el porcentaje de oxígeno disuelto disminuye drásticamente coincidiendo con el inicio de la fase exponencial (Figura 4), posteriormente la concentración de oxígeno se estabiliza en las horas 12, 4 y 4 para las condiciones de 5%, 25% y 50% de OD. Se concluye que el control de oxígeno responde

<sup>31</sup> BABEL, Wolfgang; ACKERMANN, Jorge Uwe y BREUER, Uta. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2001, vol. 71., p. 128-139.

efectivamente a través de la agitación frente a las variaciones del oxígeno disuelto en el medio, logrando así mantener el %OD en su set point.

Figura 7. Control en lazo cerrado de oxígeno en el bioreactor para las concentraciones de 5%, 25% y 50% de OD.



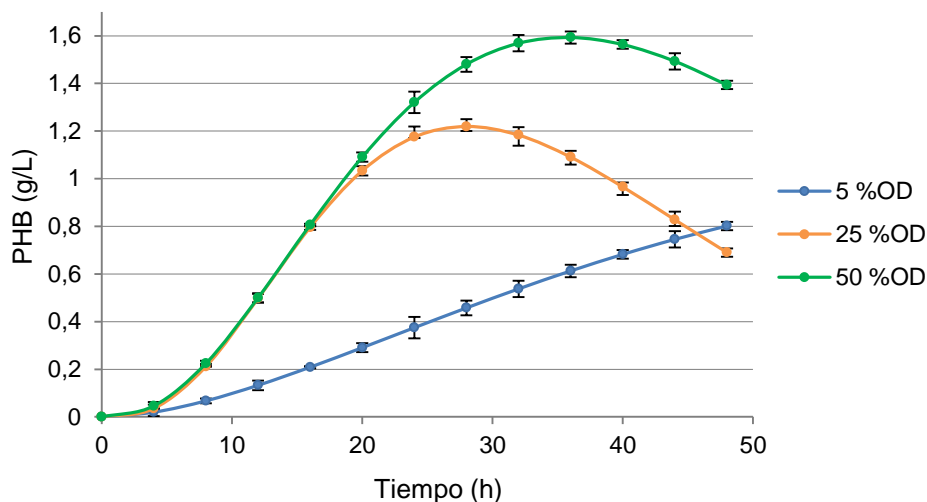
La cinética de producción de PHB para las tres condiciones de oxígeno disuelto se presenta en la Figura 8. La producción de PHB inicia a partir de la hora 4 para los 3 niveles de oxígeno, la curva para 5% de OD muestra una velocidad de producción constante hasta la hora 48 alcanzando una concentración de 0.80 g/L de PHB. Las condiciones de 25% y 50% de OD presentan una producción de PHB acelerada hasta obtener una concentración final de 1.21 y 1.59 g/L en las horas 28 y 36 respectivamente. Después de alcanzados los máximos de producción, se observa que el inicio del consumo de PHB coincide con el tiempo donde se agota la fuente de carbono, este fenómeno se puede explicar debido a que el microorganismo degrada el biopolímero para su supervivencia como fuente de energía cuando así lo requiere.<sup>32</sup>.

Según los datos obtenidos, las condiciones de 25% y 50% de OD muestran que el total de PHB se produce en la fase exponencial de la bacteria y la producción del

<sup>32</sup> FACCIN, D., *et al.* Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. En: *Journal Chemistry Biotechnology*. 2009, vol.84., p.1756–1761.

biopolímero sigue un comportamiento similar a la curva de crecimiento del microorganismo, entonces se concluye que el PHB producido por *Bacillus megaterium B2* es un metabolito primario; sin embargo en la condición de 5% de OD se obtuvo una producción del 67% de PHB en la fase exponencial y 23% en la fase estacionaria, presentando un comportamiento de metabolito mixto. En el **Anexo D** se presentan las gráficas de tipo de metabolito según la concentración de oxígeno disuelto en el medio.

Figura 8. Cinética de producción de PHB de *Bacillus megaterium B2* para las condiciones de 5%, 25% y 50% de OD.



En la tabla 4 se encuentran los parámetros de productividad obtenidos por *Bacillus megaterium B2* en cultivo Batch para los tres niveles de oxígeno evaluados. Se evidencia claramente la relación entre la producción de PHB y OD, una mayor disponibilidad de concentración de oxígeno en el medio aumenta significativamente la acumulación de PHB, estos resultados son comparables con los encontrados en la literatura para las cepas *Bacillus megaterium* BA-019<sup>33</sup> y

<sup>33</sup> KULPREECHA, S., *et al.* Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. En: Journal Bioscience Bioengineering. 2009, vol.107., p.240–245.

BBST4<sup>34</sup> donde el óptimo de PHB se logra con el 60% y 80% de OD a partir de melaza de caña y glicerol crudo respectivamente.

Tabla 4. Parámetros de productividad para 5%, 25% y 50% de oxígeno disuelto.

VARIABLE	UNIDADES	5 %OD	25 %OD	50 %OD
<i>Máxima producción de PHB peso seco</i>	[g/L]	0.80	1.21	1.59
<i>Producción de biomasa residual en el punto máximo de concentración de PHB</i>	[g/L]	3.15	3.60	2.24
<i>Acumulación PHB en la célula peso seco</i>	%	20%	25%	41%
<i>Productividad de PHB*</i>	[g/L*h]	$1.67 \cdot 10^{-2}$	$4.35 \cdot 10^{-2}$	$4.42 \cdot 10^{-2}$

\*Estos valores fueron calculados en la hora donde se alcanzó el valor máximo de producción de PHB.

### 2.3 DETERMINACION DE LA CONDICIÓN QUE FAVORECE LA PRODUCCIÓN DE PHB.

En la Tabla 4 se observa que el aumento en la disponibilidad de oxígeno favorece la producción de PHB, por tanto se extendió el límite superior de saturación de oxígeno (50%OD) con el determinar la condición que favorece la producción de PHB, para ello se realizó un montaje en modo batch para un nivel de saturación de oxígeno de 75% a las mismas condiciones de operación de los experimentos

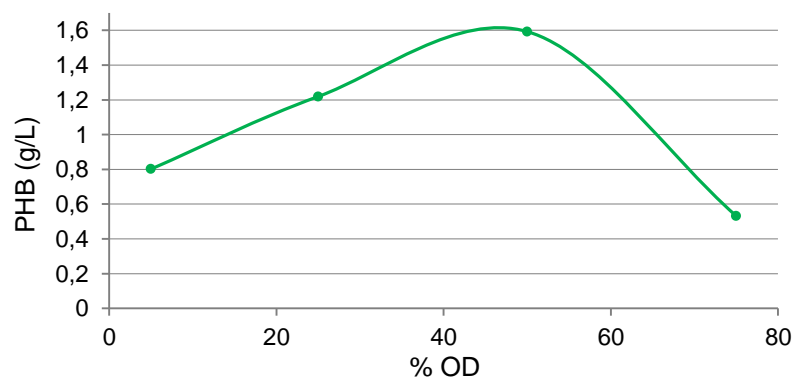
<sup>34</sup> LÓPEZ, Jimmy, *et al.* Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. En: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Noviembre, 2012, vol.17., p.250-258.

mencionados anteriormente. El comportamiento de las variables cinéticas para esta condición se consigna en el **Anexo D**.

En la Figura 9 se presenta el perfil de producción de PHB en función de los niveles de saturación de oxígeno evaluados, se observa que los bajos niveles de oxígeno disuelto ( $DO < 25\%$ ) son insuficientes para satisfacer las demandas aeróbicas de *Bacillus megaterium* B2 causando así una reducción significativa en la producción de PHB ( $PHB < 1.4\text{g/L}$ ). Así mismo, niveles altos de oxígeno disuelto ( $75\%$ ) disminuyen drásticamente la producción de PHB. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kulpreecha, quien afirma que con valores superiores al  $80\%$  de OD la producción de PHB disminuye a causa del estrés oxidativo generado por las altas velocidades de agitación.<sup>35</sup>

De acuerdo con los resultados expuestos la condición de  $50\%$  de saturación de oxígeno disuelto favorece la producción de PHB alcanzando un máximo de  $1.592\text{ g/L}$ . Esto concuerda con los resultados de Kulpreecha quien alcanzó la mayor producción de PHB con  $60\%$  de OD.

Figura 9. Perfil de producción de PHB en función de los niveles de saturación de oxígeno evaluados ( $5\%$ ,  $25\%$ ,  $50\%$  y  $75\%$  de OD).



<sup>35</sup> KULPREECHA, S., *et al.* Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. En: Journal Bioscience Bioengineering. 2009, vol.107., p.240–245.

### 3. CONCLUSIONES

Durante el proceso productivo de PHB; se identificó que *Bacillus megaterium B2* presenta una relación directa entre la velocidad específica de crecimiento y la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo. De las tres condiciones de oxígeno evaluadas, la mayor velocidad específica de crecimiento se presenta en la condición de 50% de oxígeno disuelto de  $0.1031 \text{ h}^{-1}$ . Al incrementar la concentración de oxígeno disuelto, los macronutrientes (glicerol crudo y nitrógeno) se consumen rápidamente y la fase exponencial finaliza en menor tiempo.

Cuando el bioproceso se lleva a cabo a una relación C/N de 10 (exceso de nitrógeno) la mayor producción de PHB se presenta en la condición de 50% de oxígeno, alcanzando una concentración de 1.5927 g/L. Además, un suministro alto de oxígeno disuelto (75% OD) favorece el crecimiento de biomasa pero decrece la producción de PHB alcanzando solo 0.5318 g/L.

#### 4. RECOMENDACIONES

Se recomienda para la construcción de la curva de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 tomar muestras cada hora para tener un comportamiento detallado en la etapa de crecimiento exponencial.

Se recomienda que para los próximos estudios de *Bacillus megaterium* B2, se debe medir la viabilidad de las células durante la fermentación para verificar que el crecimiento de la bacteria y la acumulación de PHB se realiza en las condiciones adecuadas.

Se recomienda estudiar el efecto del estrés celular debido a la agitación ya que para la condición de 75% de saturación de oxígeno disuelto se obtuvo menor producción de PHB.

## BIBLIOGRAFÍA

BABEL, Wolfgang; ACKERMANN, Jorge Uwe y BREUER, Uta. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2001, vol. 71., p. 128-139.

BONARTSEV, Anton, *et al.* Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. En: Communicating Current Research and Educational 24 Topics and Trends in Applied Microbiology. 2007, p. 295-307.

CHANPRATEEP, Suchada. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. 2010, vol. 110., p. 621-632.

CHEN, G., A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. En: Royal society of chemistry. 2009, vol.38, no.8., p. 2434-2446.

FACCIN, D., *et al.* Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. En: Journal Chemistry Biotechnology. 2009, vol.84., p.1756–1761.

FEDERACION NACIONAL DE BIOCOMBUSTIBLES. Producción de biodiesel. Bogotá: 2017. [En línea]. (Recuperado en 6 de septiembre 2017). Disponible en <http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-produccion-titulo Biodiesel.htm>

GANGURDE, N y SAYYED, R., Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB): A Biodegradable Polymer of Microbial Origin. En: Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials. 2012, p. 46-59.

GONZÁLES, Yolanda, *et al.* Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. En: Revista Internacional de contaminación ambiental. 2013, vol.29., p.77-115.

KOLLER, M., *et al.* Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. En: Engineering in life sciences, 2011, vol.11, no.3., p.222-237.

KULPREECHA, S., *et al.* Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. En: Journal Bioscience Bioengineering. 2009, vol.107., p.240–245.

LÓPEZ, Jimmy, *et al.* Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. En: Biotechnology and Bioprocess Engineering. Noviembre, 2012, vol.17., p.250-258.

LUVIZETTO, D., *et al.* Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. En: Process Biochemistry. 2013, vol.48., p.420–425.

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

NARANJO, Javier. Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales. Tesis para optar por el título de Magister en Ingeniería Química. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería, 2010, 217p.

POSADA, J., *et al.* Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. En: *Process Biochemmistry*. 2011, vol.46., p.310–317.

SABRA, W., y ABOU-ZEID, D., Improving Feeding Strategies for Maximizing Polyhydroxybutyrate Yield by *Bacillus megaterium*. En: *Resource Journal of Microbiolgy*. 2008, vol.3., p.308–318.

WORLD ECONOMIC FORUM. The new plastics economy. Ginebra: 2016. [En línea]. (Recuperado en 9 de enero 2017). Disponible en [http://www3.weforum.org/docs/WEF\\_The\\_New\\_Plastics\\_Economy.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf)

## ANEXOS

### Anexo A. Análisis de desviación media.

Cada nivel de concentración de oxígeno disuelto se evaluó por duplicado, además con el fin de comprobar la repetitividad de las fermentaciones se realizó mediante el software Microsoft Excel® un análisis de desviación media para las concentraciones de PHB, biomasa, glicerol, nitrógeno y oxígeno.

A continuación se presenta el consolidado de las desviaciones para cada variable evaluada en los 3 niveles de 5%, 25% y 50% de saturación de oxígeno.

Figura A1. Desviación media para las cinéticas de *Bacillus megaterium* B2 para una concentración de 5% de OD.

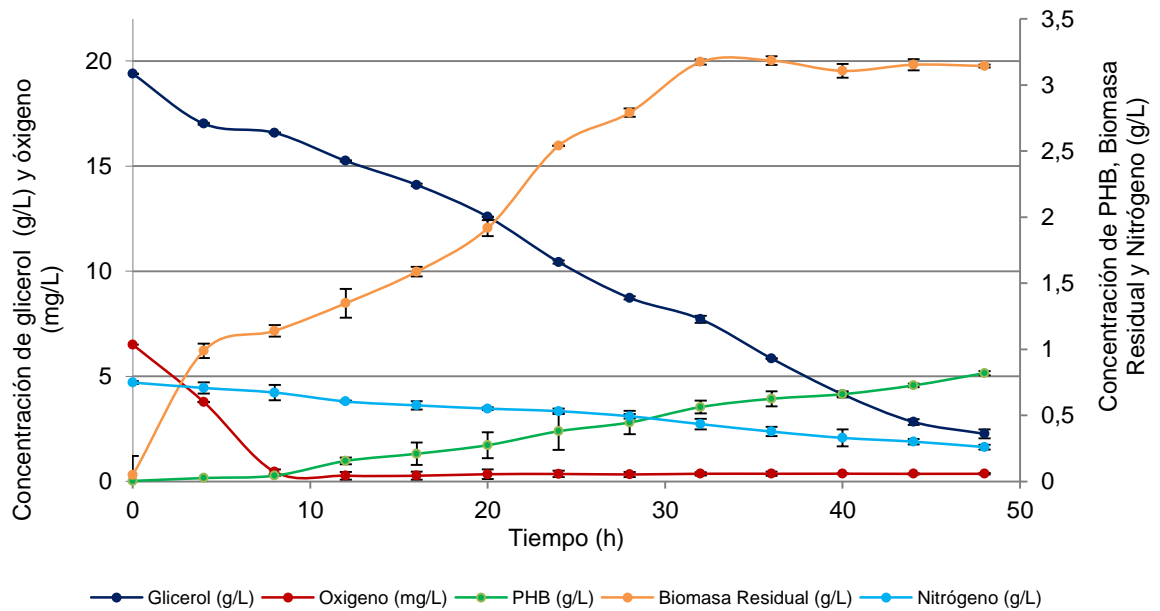


Tabla A1. Promedios de desviación relativa para las cinéticas de *Bacillus megaterium B2* para una concentración de 5% de OD.

25% OD	Promedio desviación relativa (%)
<i>PHB</i>	8
<i>Biomasa residual</i>	5
<i>Glicerol</i>	8
<i>Nitrógeno</i>	3
<i>Oxígeno</i>	10

Figura A2. Desviación media para las cinéticas de *Bacillus megaterium B2* para una concentración de 25% de OD.

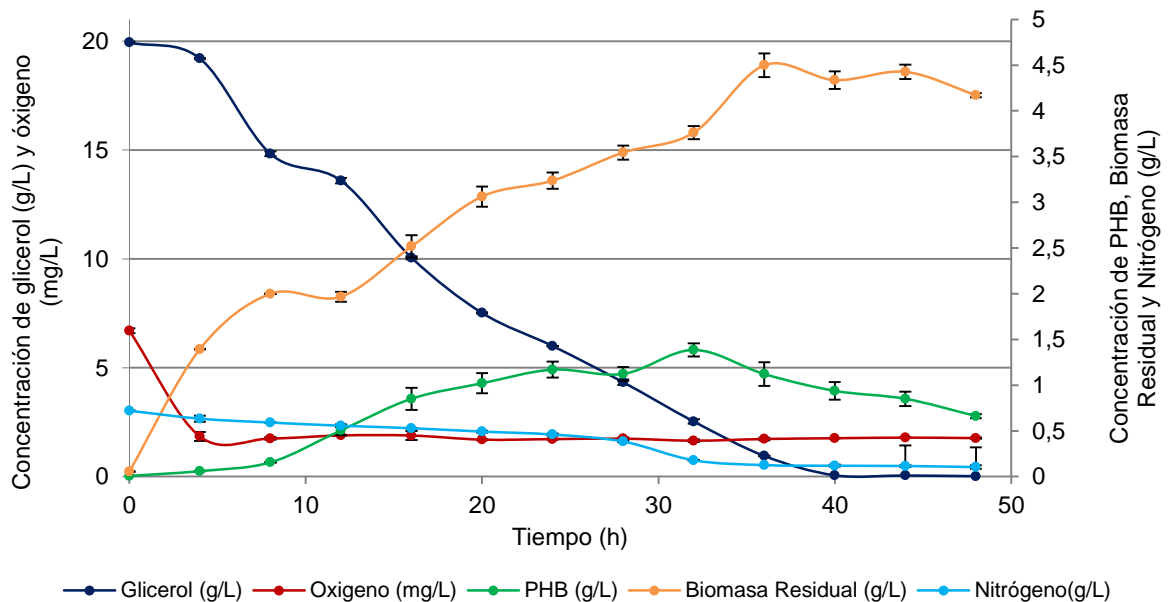


Tabla A2. Promedios de desviación relativa para las cinéticas de *Bacillus megaterium B2* para una concentración de 25% de OD.

25% OD	Promedio desviación relativa (%)
<i>PHB</i>	8
<i>Biomasa residual</i>	11
<i>Glicerol</i>	10
<i>Nitrógeno</i>	4
<i>Oxígeno</i>	3

Figura A3. Desviación media para las cinéticas de *Bacillus megaterium B2* para una concentración de 50% de OD.

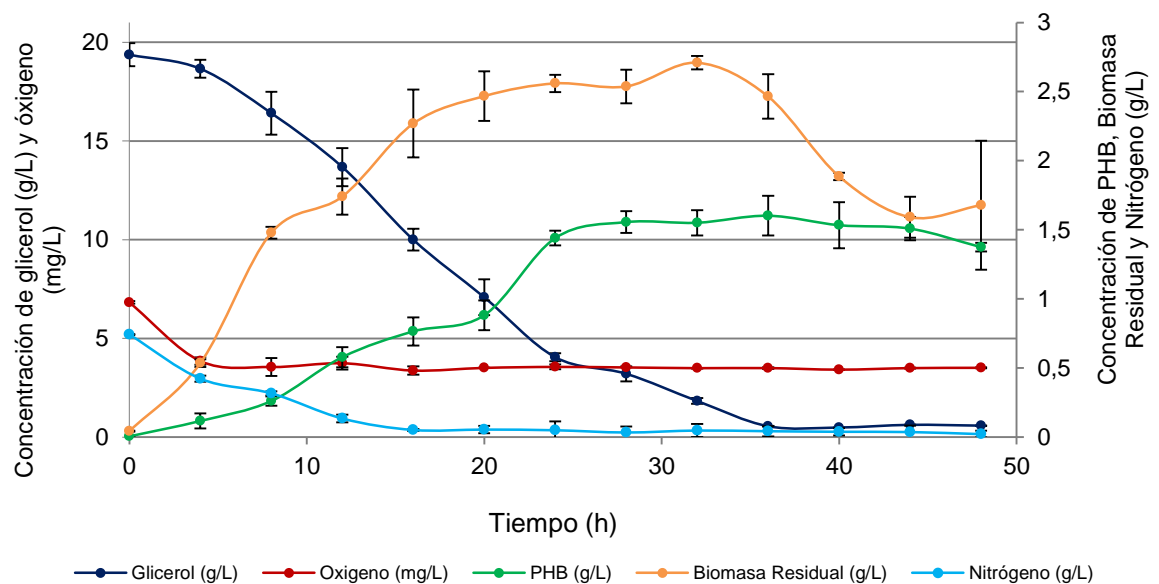


Tabla A3. Promedios de desviación relativa para las cinéticas de *Bacillus megaterium* B2 para una concentración de 50% de OD.

50% OD	Promedio desviación relativa (%)
PHB	9
Biomasa residual	5
Glicerol	6
Nitrógeno	75
Oxígeno	3

En la Tabla A3, se observa que la variable nitrógeno presenta un valor promedio de desviación relativa alto, esto se debe a que la tolerancia de la operación para encontrar dicha desviación es muy sensible cuando se trata de números pequeños.

### Anexo B. Tendencias.

Figura B1. Tendencia para la cinética de *Bacillus megaterium* B2 para la concentración de 5 % de OD

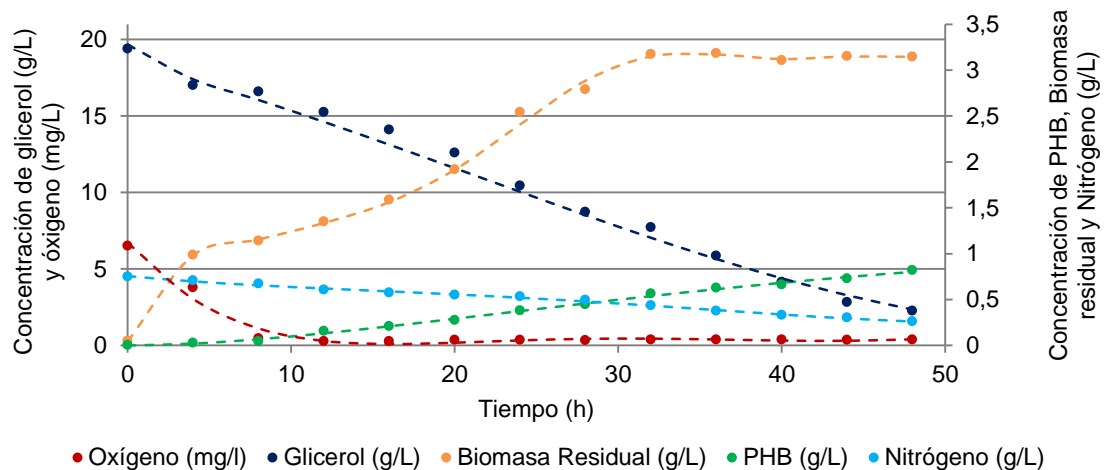


Figura B2. Tendencia para la cinética de *Bacillus megaterium* B2 para la concentración de 25 % de OD.

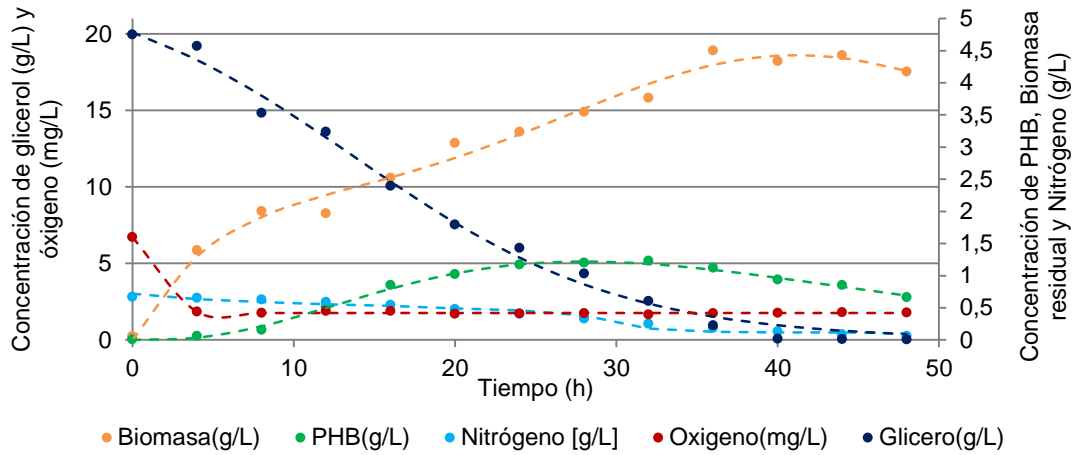
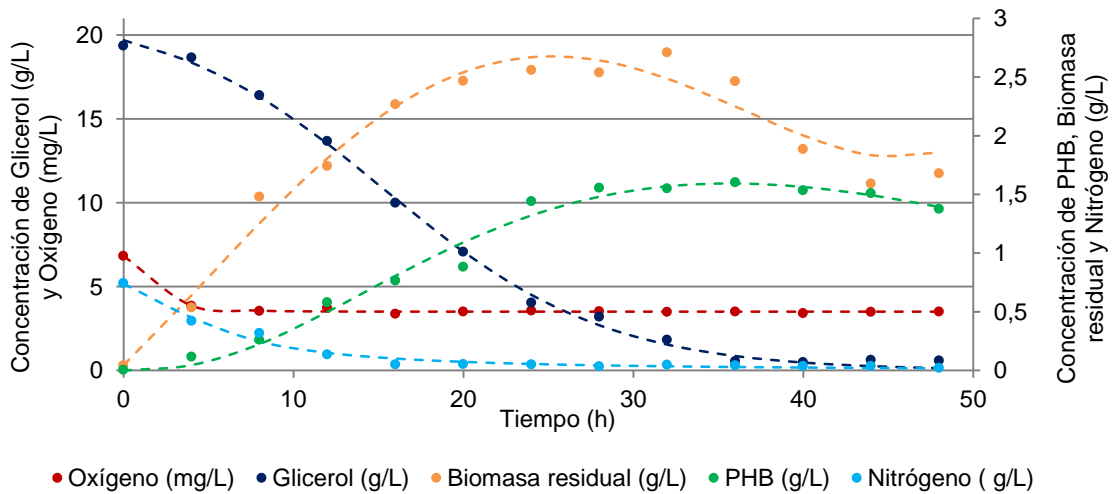
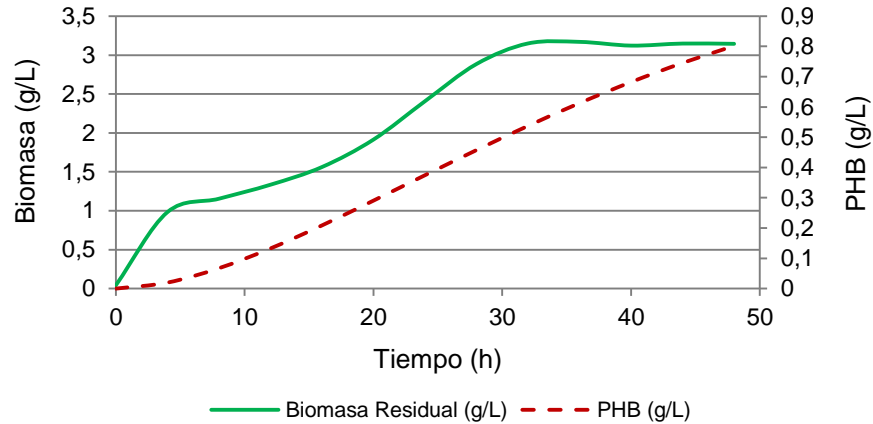


Figura B3. Tendencia para la cinética de *Bacillus megaterium* B2 para la concentración de 50 % de OD.



**Anexo C.** Tipo de metabolito según la concentración de OD.

Figura C1. Producción de PHB en la fase exponencial de *Bacillus megaterium* B2 para la concentración de 5 % de OD



Se observa en la figura C2 que para la condición de 5% de OD el 67% de la producción de PHB se dio durante la fase exponencial de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 y el 33 % de la producción se dio en la fase estacionaria, de esta manera se concluye que el PHB es un metabolito mixto.

Figura C2. Producción de PHB en la fase exponencial de de *Bacillus megaterium* B2 para la concentración de 25 % de OD

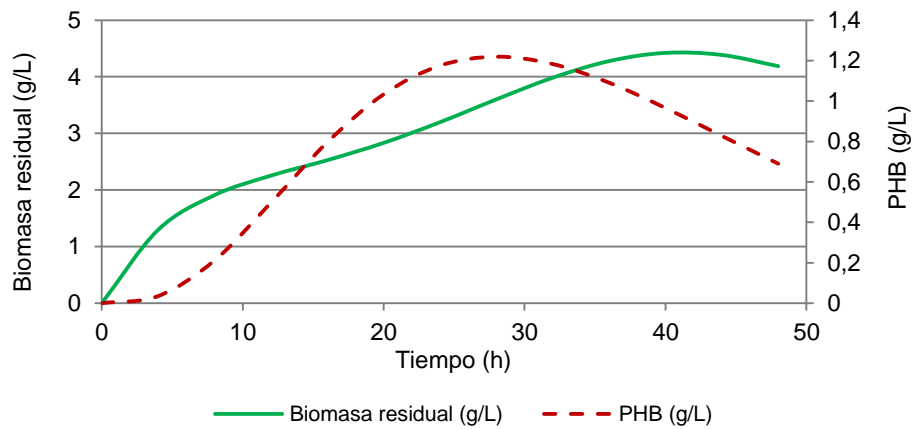
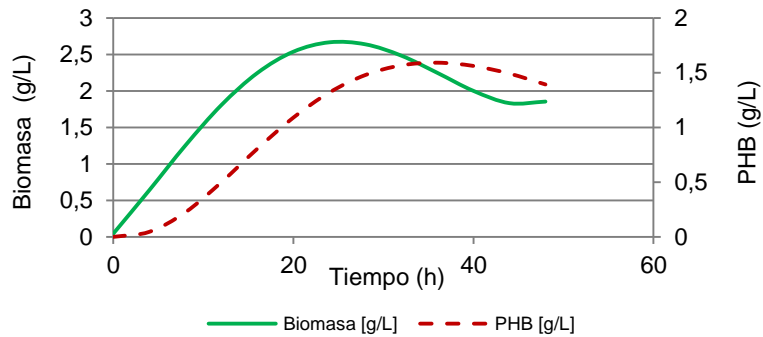


Figura C3. Producción de PHB en la fase exponencial de de *Bacillus megaterium* B2 para la concentración de 50 % de OD



Se observa en la figura C3 que para la condición de 50% de OD el 95% de la producción de PHB se dio durante la fase exponencial de crecimiento de *Bacillus megaterium*, de esta manera se concluye que el PHB es un metabolito primario dado que está asociado al crecimiento de la bacteria.

#### Anexo D. Cinéticas para la concentración de 75 % de OD.

Figura D1. Tendencia para la cinética de *Bacillus megaterium* B2 para la concentración de 5 % de OD

