

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO-NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Bacillus megaterium* B2 A PARTIR DE
GLICEROL CRUDO BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE AIREACIÓN Y
pH.**

DIANA PAOLA CARRILLO MARTINEZ

MÓNICA PAOLA PARRA LÓPEZ

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

2017

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO-NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Bacillus megaterium* B2 A PARTIR DE
GLICEROL CRUDO BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE AIREACIÓN Y
pH**

DIANA PAOLA CARRILLO MARTINEZ

MÓNICA PAOLA PARRA LÓPEZ

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

Ingeniero Químico

Director

Humberto Escalante Hernández

Ing. Químico, PhD

Codirectores

Víctor Alexis Lizcano González

Ing. Químico

Mabel Juliana Quintero Silva

Bacterióloga, M. Sc

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

2017

“Encomienda a Jehová tu camino, confía en él y él hará” Salmos 37:5

A Dios por ser mi guía, mi sustentador y fortaleza, por regalarme la oportunidad de culminar esta linda etapa.

*A mi madre Doris Martínez, fuente de apoyo, lucha y ejemplo de vida. Gracias por tus consejos, tu entrega incondicional, tu amor y paciencia durante estos años.
Para ti es este logro.*

A mi padre Carlos Carrillo, por su apoyo y valiosos consejos.

A mi tío Samuel Martínez, por enseñarme a luchar por mis sueños, por guiarme y ser un ejemplo en mi vida.

A mi hermana Valentina Carrillo, por regalarme siempre una sonrisa y ser mi motivación para cada día ser mejor.

A mi amiga Mónica Parra, por su amistad durante todos estos años de carrera, su compromiso y su total entrega para el desarrollo de esta investigación.

A mi familia, quien siempre me apoyo y confió en mí.

Diana Carrillo

A Dios por darme la tranquilidad y destreza necesaria para cumplir esta meta.

A mi Madre Ana Irene por ser la persona encargada de guiarme, ayudarme, darme ejemplo de perseverancia, amor y entrega, es ella la total responsable de hacer que mis sueños se cumplan, por ser el motivo más grande que mueve mi alma.

A mis hermanos Fabian y Andrea por su motivación, cariño, compañía y muestra de comprensión; por ser ejemplo en mi vida y por creer en mí. A mi novio Daniel por su amor, por su constante apoyo y por su ejemplo de responsabilidad durante los años compartidos.

A mi compañera de investigación Diana por su amistad, compromiso y acompañamiento. Por nuestro trabajo en equipo; el que hizo posible la culminación de este propósito.

A mis demás amigos, familiares, compañeros y todos aquellos partícipes de una de las etapas más gratificantes de mi vida.

Mónica Parra

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirnos culminar esta etapa, por brindarnos las aptitudes necesarias.

Al Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales CEIAM por brindarnos la oportunidad de tener este proceso de aprendizaje.

Al profesor Humberto Escalante y la profesora Mabel Quintero por su tiempo, la confianza depositada y el acompañamiento.

Al ingeniero Víctor Lizcano, por su constante colaboración, dedicación y esfuerzo para lograr nuestro objetivo.

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos CICTA, por sus colaboraciones, y al Parque Tecnológico Guatiguara, por poner a nuestra disposición sus instalaciones.

A nuestros maestros, compañeros y amigos de la escuela de Ingeniería Química. A nuestra Alma Mater Universidad Industrial de Santander.

Gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. OBJETIVOS.....	22
1.1.1. General	22
1.1.2. Específicos.....	22
2. METODOLOGIA.....	23
2.1. REACTIVACION Y PREINOCULACION DE <i>B. megaterium</i> B2.....	23
2.2. MEDIO DE CULTIVO.....	23
2.3. CALIBRACIÓN Y ADECUACIÓN DEL BIORREACTOR	24
2.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA RELACIÓN C/N.....	25
2.5. TÉCNICAS DE MEDICIÓN.....	25
3. RESULTADOS	27
4. CONCLUSIONES.....	36
5. RECOMENDACIONES	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXOS.....	46

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Metabolismo de síntesis de PHB en bacterias	20
Figura 2 Cinética de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> B2 para relaciones C/N 10, 25 y 40.	27
Figura 3 Consumo de glicerol para relaciones C/N de 10, 25 y 40	28
Figura 4. Consumo de nitrógeno para relaciones C/N de 10, 25 y 40.	29
Figura 5. Cinética de producción de PHB para relaciones C/N de 10, 25 y 40.	31
Figura 6 Consumo de Oxígeno para relaciones C/N de 10, 25 y 40	34
Figura 7 Producción de PHB para diferentes relaciones C/N.	35

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1 Relaciones C/N reportadas en la literatura para producción de PHB a partir de <i>Bacillus megaterium</i>	19
Tabla 2. Concentración Sulfato de amonio a diferentes relaciones C/N	24
Tabla 3. Condiciones de Operación para la Fermentación Batch	25
Tabla 4 Parámetros relevantes en la producción de PHB para relaciones C/N evaluadas.	33

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Análisis de desviación media	46
Anexo B. Tipo de metabolito según la relación C/N.....	55
Anexo C. Tendencias de las variables cinéticas	58
Anexo D. Variables cinéticas para una relación C/N 5.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

C/N: Carbono Nitrógeno

GRAS: Generally Recognized As Safe

LPS: Lipopolisacáridos

OD: Oxígeno Disuelto

PHAS: Polihidroxialcanoatos

PHB: Polihidroxibutirato

RESUMEN

TÍTULO: EFECTO DE LA RELACION CARBONO NITRÓGENO EN LA PRODUCCION DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) POR *Bacillus megaterium* B2 A PARTIR DE GLICEROL CRUDO, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE AIREACIÓN Y pH*.

AUTORES: DIANA PAOLA CARRILLO MARTINEZ**, MÓNICA PAOLA PARRA LÓPEZ**.

PALABRAS CLAVE: POLIHIDROXIBUTIRATO, GLICEROL CRUDO, RELACIÓN CARBONO NITRÓGENO

DESCRIPCIÓN:

Los plásticos son uno de los materiales más usados a nivel global, pero el uso continuo de plásticos no biodegradables genera problemas de contaminación debido a su acumulación, alterando los ecosistemas y acelerando la disminución de las reservas de combustibles fósiles. Los biopolímeros resultan ser una solución prometedora frente a esta problemática ya que estos bioplásticos son generados por microorganismos, a partir de fuentes de carbono económicas, como es el caso del glicerol crudo. En el presente trabajo se evalúa la influencia que tiene la relación CARBONO NITRÓGENO (C/N) en la producción de PHB empleando *Bacillus megaterium* B2, bajo condiciones controladas de pH y oxígeno disuelto. Se realizaron cultivos Batch en un biorreactor 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 y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Las relaciones C/N seleccionadas se tomaron con el fin de asegurar una alta y baja disponibilidad de nitrógeno para observar el comportamiento de producción de PHB en el microorganismo. La máxima concentración alcanzada de PHB tuvo un valor de 1.5927 g/L en la hora 36 para una relación C/N 10, mientras que la máxima concentración de biomasa se obtuvo para una relación C/N 25 con un valor de 2.7331 g/L.

* 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: EFFECT OF THE NITROGEN CARBON RELATION IN THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYBUTIRATE (PHB) BY *Bacillus megaterium* B2 FROM CRUDE GLYCEROL, UNDER CONTROLLED AIR CONDITIONS AND pH*

AUTHORS: DIANA PAOLA CARRILLO MARTINEZ, MÓNICA PAOLA PARRA LÓPEZ**

KEYWORDS: POLYHYDROXYBUTIRATE, CRUDE GLYCEROL, NITROGEN CARBON RATIO

DESCRIPTION:

Plastics are one of the most widely used materials worldwide, but the continuous use of non-biodegradable plastics generates pollution problems due to their accumulation, altering the ecosystems and accelerating the decrease in fossil fuel reserves. Biopolymers turn out to be a promising solution to this problem since these bioplastics are generated by microorganisms, from economic sources of carbon, as is the case of crude glycerol. In the present work, the influence of NITROGEN CARBON (C/N) ratio in the production of PHB using *Bacillus megaterium* B2 under controlled conditions of pH and dissolved oxygen is evaluated. Batch cultures were performed in a bioreactor with a work volume of 4 L; crude glycerol was used as the sole carbon source with an initial concentration of 20 g/L and ammonium sulfate as a source of nitrogen. The selected C/N ratios were taken to ensure high and low nitrogen availability to observe the production behavior of PHB in the microorganism. The maximum concentration reached of PHB had a value of 1.5927 g/L at the 36th hour for a C/N 10 ratio, while the maximum concentration of biomass was obtained for a C/N 25 ratio with a value of 2.7331 g/L.

* 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.

1. INTRODUCCIÓN

Los plásticos derivados del petróleo poseen propiedades y características específicas convenientes para su uso en la manufactura de una amplia variedad de productos. Éstos han sido empleados en el empaquetamiento, la construcción, electrónica, usos médicos, entre otros. “No obstante, el uso constante de plásticos no biodegradables, genera problemas de contaminación ambiental debido a su acumulación”¹, y acelera la disminución de las reservas de combustibles fósiles². Los métodos utilizados para el manejo de los desechos generados resultan infructuosos respecto a la gran cantidad de artículos plásticos que se producen en el planeta³. Por consiguiente, es necesario hacer hincapié en utilizar materiales que no sean causales de este impacto, como los biopolímeros⁴.

Los biopolímeros son materiales cuyas estructuras pueden ser reducidas o transformadas a sustancias de menor complejidad por la acción de organismos vivos como hongos y levaduras⁵. Dentro de este grupo se encuentran los polihidroxicanoatos (PHAs), candidatos prometedores para reemplazar una gran variedad de plásticos sintéticos al ser termoplásticos con propiedades similares a los elastómeros⁶.

¹ OMAR, S. *et al.* Optimization of cell growth and Poly (3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain, Citado por SERRANO, Julieth. Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. Teoría y praxis investigativa. Bogotá D.C, 2010. Vol.5, No. 2. p.80.

² DE ALMEDIJA, Alejandra, *et al.* Bioplásticos: una alternativa ecológica. Química viva. Buenos Aires, 2004. Vol.3, No. 3. p.124

³ SERRANO. Op. cit., p.80.

⁴ BANACORE, Analia. Estudio de la producción de polihidroxicanoatos (PHA) por *Bacillus* sp. utilizando glicerol como fuente de carbono. Montevideo: Universidad de la República, 2014. p. 9

⁵ LÓPEZ JIMENEZ, Jimmy Andrés. Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxibutirato (PHB). Bahía Blanca: Universidad Nacional del Sur, 2011. p.3.

⁶ GANGURDE, N. S. y SAYYED, R. Z. Poly-β-hydroxybutyrate (PHB): A Biodegradable Polymer of Microbial Origin. 1 ed. 2012. p.45.

Dentro de la familia de PHAs se destaca el Poli-3-hidroxi-butilato (PHB), que por sus propiedades mecánicas puede ser usado como sustituto del polipropileno; uno de los plásticos sintéticos más utilizados⁷. En su aplicación industrial, “el PHB ha sido usado como agente liberador de drogas, soporte para ingeniería de tejidos, transporte de medicamentos y en una gran variedad de materiales biomédicos como jeringas, hilos de sutura, entre otros”⁸.

El PHB es acumulado como reserva de carbono y energía en condiciones limitantes de algún nutriente esencial para el crecimiento celular y en exceso de una fuente de carbono⁹. “En el año de 1958, los científicos Macrae y Wilkinson propusieron que el PHB tenía un papel funcional, tras observar que *B. megaterium* acumulaba el homopolímero a una relación carbono nitrógeno (C/N) alta en el medio y que su degradación ocurría rápidamente en ausencia de una fuente de carbono y energía exógena”¹⁰.

“Colombia al igual que algunos países Suramericanos no presenta avances significativos en la orientación y producción de PHAs. En los últimos años se han desarrollado avances a escalas de laboratorio”¹¹, entre los que se encuentra la producción de PHB empleando fuentes de carbono como el glicerol, lactosa y lactosuero a partir de *Bacillus megaterium*, obteniendo porcentajes de acumulación de PHB de hasta el 62.4%, 76% y 70% respectivamente¹². Adicionalmente se han reportado el aislamiento e identificación de cepas microbianas productoras de PHB¹³.

⁷ DELGADO LEMOS, Ana Carolina y MINA CÓRDOBA, Alexis. Polyhydroxyalkanoates (PHA's) produced by bacteria and its potential application to industrial level. Informador técnico SENA. Cali, 2015. Vol.79, No. 1. p.94.

⁸ LÓPEZ. Op. cit., p.40.

⁹ Doi, Y. Microbial Polyesters. VCH: New York, 1990. Citado por LÓPEZ. Op. cit., p.12.

¹⁰ GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda, *et al.* Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano. Int. Contam. Ambie. Guadalajara, 2013. Vol 29, No.1. p.82.

¹¹ DELGADO LEMOS, Ana Carolina y MINA CÓRDOBA, Alexis. Op. cit., p.98.

¹² CAMPUZANO, Catalina Álvarez. Análisis de la producción de polihidroxi-butilato usando lactosuero como materia prima. Manizales: Universidad Nacional de Colombia, 2015. p. 32.

¹³ 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. New Biotechnology ELSEVIER. Bucaramanga, 2013. Vol. 32, No.6. p.683.

“Mundialmente, el microorganismo más estudiado ha sido *R. eutropha* debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de PHAs, especialmente polihidroxiбутirato, en un 80% en peso”¹⁴. Las bacterias Gram negativas a pesar de poseer una excelente capacidad para acumular PHB, presentan cadenas de lipopolisacáridos (LPS), que contienen endotoxinas en su membrana celular causando reacciones inmunogénicas al contacto con seres humanos. Por lo tanto el PHB producido por estos microorganismos debe ser sometido a drásticos procesos de purificación si el producto final es usado en la biomedicina o en aplicaciones en organismos vivos.¹⁵

B. megaterium no posee membrana de LPS, por lo tanto, el PHB producido por estos microorganismos es más conveniente para aplicaciones biomédicas. Adicionalmente las cepas de *Bacillus* presentan un mayor y más rápido crecimiento en diversos sustratos¹⁶.

Bacillus megaterium es una bacteria Gram positiva, aeróbica, con forma de bastón y puede encontrarse sola o formando cadenas de longitudes considerables, que puede crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono¹⁷; dentro de los que se encuentra el glicerol crudo. Éste es un subproducto en la producción de biodiesel. Se reporta una producción de 70 millones de galones anualmente por lo que su uso como fuente de energía en la industria microbiológica resulta ser una solución para la alta disponibilidad del mismo¹⁸.

Los microorganismos del género *Bacillus* son considerados atractivos industrialmente por factores como, alta tasa de crecimiento haciendo los tiempos de

¹⁴ DELGADO LEMOS, Ana Carolina y MINA CÓRDOBA, Alexis. Op. cit., p. 97.

¹⁵ LOPEZ. Op. cit., pp. 59-60.

¹⁶ CAMPUZANO. Op. cit., pp. 23-24.

¹⁷ TORTOLÓ CABAÑAS, Keyla y BELL GARCÍA, Antonio. Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). La Habana, 2015. Vol. 49, No.1. p. 23.

¹⁸ MAYORGA, Manuel Alejandro y MEJÍA, Wilson Alfonso. Aprovechamiento integral del glicerol residual en la industria del biodiesel: caso 1,3-propanodiol (1,3-pd). TECCIENCIA. 2012. Vol. 6, No. 12. p. 83.

de fermentación más cortos, su capacidad de secreción de proteínas al medio extracelular y su estatus de Generally Recognized as Safe¹⁹(GRAS).

La producción de PHB por *Bacillus megaterium* requiere que los medios de cultivo presenten la mejor relación entre las fuentes de carbono y los nutrientes esenciales²⁰. “Una limitación prematura de algún nutriente esencial puede dar como resultado una baja concentración celular y por tanto baja producción del polímero y productividad en el proceso”²¹. Según esto, *Bacillus megaterium* acumula el biopolímero bajo condiciones de estrés, es decir, limitando algún nutriente, cómo la fuente de nitrógeno. Autores como Moreno, *et al.*²² y Naranjo, *et al.*²³ impusieron distintas limitaciones en la fuente de nitrógeno. (ver Tabla 1).

Tabla 1 Relaciones C/N reportadas en la literatura para producción de PHB a partir de *Bacillus megaterium*.

Variable	Unidad	Naranjo	Moreno
Relación C/N	-	36.9	9.43
Nitrógeno	g/L	0.21	0.32
Glicerol	g/L	20.00	7.60

Con el fin de entender la influencia de algunos de los principales componentes del medio, se debe analizar el metabolismo de la producción de PHB. La Figura 1 presenta la ruta metabólica de producción de PHB por *Bacillus megaterium*.

¹⁹ SCHALLMEY, Marcus; SINGH, Ajay y WARD Owen P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Citado por BANACORE Op. cit., p.22.

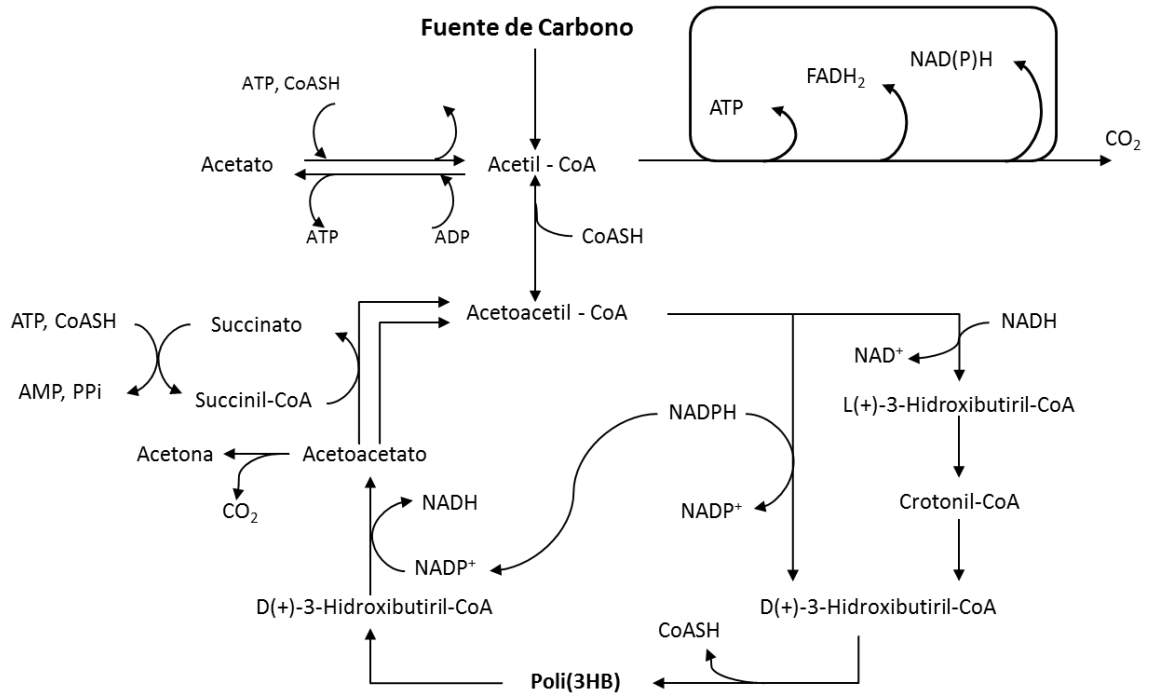
²⁰BABEI, Wolfgang; ACKERMANN, Jorg-Uwe y BREUER, Uta. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology .Berlin, 2001. Vol. 71. p. 129.

²¹ MARTÍNEZ, Guadalupe. Producción de plásticos Biodegradables en Bacterias. Montevideo: Universidad de la República, 2013. p. 31.

²² MORENO, *et al.* Op. cit., pp. 683-689.

²³ NARANJO, Javier M, *et al.* Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. Bioresource Technology ELSEVIER. Manizales, 2013. Vol.133, No.1. pp. 38-43.

Figura 1. Metabolismo de síntesis de PHB en bacterias



Fuente: Adaptado de Babel, et al., (2001)

El metabolismo de la bacteria es secuencial y por tal razón cualquier modificación afecta todo su funcionamiento; inicialmente el glicerol (fuente de carbono), sufre una serie de transformaciones enzimáticas que lo convierten en la molécula intermediaria Acetil-CoA que puede tomar tres rutas: Cumplir el ciclo de Krebs (respiración celular), formar acetato o sintetizar PHB, si no hay limitación de nitrógeno la bacteria realiza el proceso de respiración celular y logra reproducirse²⁴.

Al inducir una limitación de nitrógeno la bacteria no produce aminoácidos eficientemente, sin estas proteínas la formación de biomasa se detiene²⁵, por otro lado “mantener una saturación de oxígeno (por encima del 30%) y una restricción de la fuente de nitrógeno es importante para lograr promover la producción de PHB;

²⁴ BABEL, Wolfgang; ACKERMANN, Jorg-Uwe y BREUER, Uta. Op. cit., pp. 127-131.

²⁵ *Ibíd.*, pp. 131-136.

las limitaciones de nitrógeno además de generar un incremento en la relación NADPH/NADP, enzimas claves para el ciclo de síntesis de PHB, inhiben las enzimas responsables de la asimilación de Acetil-coA, por lo que el flujo de este metabolito hacia el ciclo de respiración celular disminuye, induciendo la ruta metabólica hacia la producción de PHB²⁶.

Se han realizado diversas investigaciones para la producción de PHB a partir de *Bacillus megaterium*. Moreno, *et al.*²⁷, empleo una cepa nativa identificada como *Bacillus megaterium* B2; mediante ensayos en matraces con agitación y biorreactor obtuvieron acumulaciones de PHB de 0.43 g/L a las 14 horas de cultivo y 1.20 g/L a las 11 horas de cultivo respectivamente.

López, *et al.*²⁸, utilizó la cepa de *Bacillus megaterium* (BBTS4) y glucosa y glicerol como fuentes de carbono, observando que al aumentar la relación C/N se incrementa el peso seco de las células y los niveles de biomasa, pero la acumulación de PHB disminuyó con ambos sustratos.

Adicionalmente, Campuzano²⁹, reportó un 62.4% de acumulación de PHB bajo fermentación Batch, empleando *Bacillus megaterium* y glicerol crudo como fuente de carbono bajo condiciones de pH y saturación de oxígeno controladas. Se demostró que al realizar un control del pH se mejoran funciones metabólicas ya que no se lleva la energía hacia mecanismos para sobrevivir a ambientes con condiciones de pH no óptimas. Lo anterior acoplado a las condiciones de estrés nutricional, permiten obtener mayores productividades de PHB que cuando no se tiene el control del pH y aireación.

²⁶ CAMPUZANO. Op. cit., p. 46.

²⁷ MORENO, *et al.* Op. cit., p. 688.

²⁸ LÓPEZ, Jimmy A, *et al.* Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2012. Vol. 17, No. 2. p. 253.

²⁹ CAMPUZANO. Op. cit., p. 31.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de esta investigación es evaluar en qué medida una variación de relación C/N influye en la producción de PHB empleando *Bacillus megaterium* B2 en cultivos Batch utilizando un biorreactor de 7 litros (4 L de volumen de trabajo) y glicerol crudo como fuente de carbono, garantizando el control de pH (en 7) y manteniendo un valor de oxígeno disuelto que asegure un exceso de este componente (50% OD).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. General

Estudiar la relación carbono nitrógeno y el efecto que ésta tiene en la producción de polihidroxibutirato por *Bacillus megaterium* B2 utilizando glicerol crudo, en un biorreactor de 4 litros con condiciones controladas de aireación y pH.

1.1.2. Específicos

Evaluar la influencia de la relación carbono nitrógeno sobre las cinéticas de producción de PHB en condiciones controladas de oxigenación y pH.

Determinar y validar el valor de la relación carbono nitrógeno que presente una mayor concentración de PHB.

2. METODOLOGIA

La metodología se orientó a la producción de PHB a partir de *Bacillus megaterium* B2 bajo diferentes relaciones C/N con condiciones controladas de oxigenación y pH.

2.1. REACTIVACION Y PREINOCULACION DE *B. megaterium* B2

Para la presente investigación, se empleó una cepa nativa bajo el nombre de *Bacillus megaterium* B2. Ésta bacteria fue aislada e identificada en un estudio previo realizado por la Universidad Industrial de Santander, adaptada para producir PHB a partir de glicerol crudo con una concentración inicial de 20 g/L.

La reactivación del microorganismo que se tenía criopreservado a -70 °C, se realizó con aumentos graduales de temperatura. Luego de alcanzar la temperatura ambiente, se traspasaron 1000 µL contenidos en un eppendorf a un Erlenmeyer de 250 mL con 50 ml de medio de sales más glicerol (20g/L). Se dejó en incubación durante 12 horas a 34°C y 200 rpm. Pasadas 12 horas, se tomaron 4 ml del Erlenmeyer con medio fermentado y se traspasaron a un Erlenmeyer con 200 ml de medio de sales más glicerol (20g/L); éste se dejó por 12 horas a 34°C y 200 rpm y fue empleado como inóculo para las fermentaciones.

2.2. MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo se preparó con la con la siguiente composición de sales: KH_2PO_4 , 1.5 g/L; Na_2HPO_4 , 1.18 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L y 0.1 mL/L de solución de elementos traza. Esta misma composición del medio fue empleada en la reactivación, preinoculación y fermentación. La fuente de nitrógeno usada fue sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; en la Tabla 2 se reportan cada una de las concentraciones para las diferentes relaciones C/N evaluadas (detalladas en la sección 2.4).

Tabla 2. Concentración Sulfato de amonio a diferentes relaciones C/N

Relación C/N	Concentración sulfato de amonio [g/L]
10	3.6912
25	1.4765
40	0.9228

La fuente de carbono usada fue glicerol crudo y se mantuvo a una concentración de 20 g/L para todos los montajes. Éste no fue sometido a ningún proceso de purificación, debido a que el contenido de cenizas, metanol y jabones no representaba inhibición para el crecimiento del microorganismo y su caracterización fue realizada previamente por el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales CEIAM.

2.3. CALIBRACIÓN Y ADECUACIÓN DEL BIORREACTOR

La esterilización del material (medio de sales, filtros, botellas Schoot, y sistemas de adición) se realizó en autoclave, con ciclos de 15 minutos a 121 °C. Luego de esterilizado el material, se introdujo al biorreactor el medio de sales; se encendió el control de la agitación y temperatura en 400 rpm y 34°C respectivamente para acondicionar y homogeneizar el medio. Los sensores de OD y pH se calibraron post esterilización; con el fin de asegurar que el medio se estabilizara a un pH de 7. El pH fue controlado durante la fermentación mediante adición automática de solución de KOH 2M. El flujo de aire se mantuvo en 1 L/min y las revoluciones variaron automáticamente con el fin de asegurar que el OD se mantuviera con un exceso del 50% de saturación durante las fermentaciones.

2.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA RELACIÓN C/N

Se ensayaron las relaciones C/N: 10, 25 y 40. Los valores extremos 10 y 40 se seleccionaron con base en las investigaciones de Naranjo, *et al.* y Moreno, *et al.* El valor intermedio se estimó como el promedio de los dos niveles anteriores.

Cada una de las fermentaciones se realizó por duplicado. El tiempo de fermentación para la producción de PHB fue de 48 h, en un biorreactor de 7 L. El volumen de trabajo fue de 4 L. Las condiciones de operación se mantuvieron constante durante el proceso y se encuentran especificadas en la Tabla 3. Se tomaron muestras cada 4 horas para medición de concentraciones de biomasa, PHB, glicerol y nitrógeno.

Tabla 3. Condiciones de Operación para la Fermentación Batch

Variable proceso	Valor
pH	7
Temperatura	34 °C
Volumen Trabajo	4 L
OD	50%
Caudal de aire	1 L/min
Revoluciones	200-600 r.p.m

Estas condiciones de operación fueron determinadas previamente por el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales CEIAM.

2.5. TÉCNICAS DE MEDICIÓN

La cuantificación de la biomasa se realizó mediante gravimetría como se describe a continuación: 15 mL de medio fermentado fueron centrifugados en un tubo falcón previamente pesado, a 6000 rpm por 7 minutos. Se separó el sobrenadante y el

pellet resultante se llevó a secado en horno a 60°C por 24 h. La masa del pellet seco se calculó por diferencia de peso con respecto al tubo vacío.

La concentración de nitrógeno amoniacal fue medida mediante titulación de ion borato: 5 mL de sobrenadante se llevaron a reacción con 150 mL de solución de NaOH 8.3 M. Paso seguido la mezcla se sometió a destilación por arrastre con vapor en un destilador kjeldahl UDK 129 (Velp Scientifica) por cinco minutos. El destilado fue condensado en una solución de ácido bórico 1% p/v. La presencia de amoniaco genera un viraje al color verde en la solución de ácido bórico debido a la presencia de indicador Mixto para titulaciones de amoniaco. Finalmente, el condensado es llevado a titulación con ácido clorhídrico 0.05 M.

La concentración de oxígeno disuelto fue medida mediante un sensor polarográfico InPro 6800 conectado en línea al biorreactor. La estimación de la concentración se realizó mediante calibración previa del sensor, determinándose la máxima concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo estéril en 7 mg O₂/L.

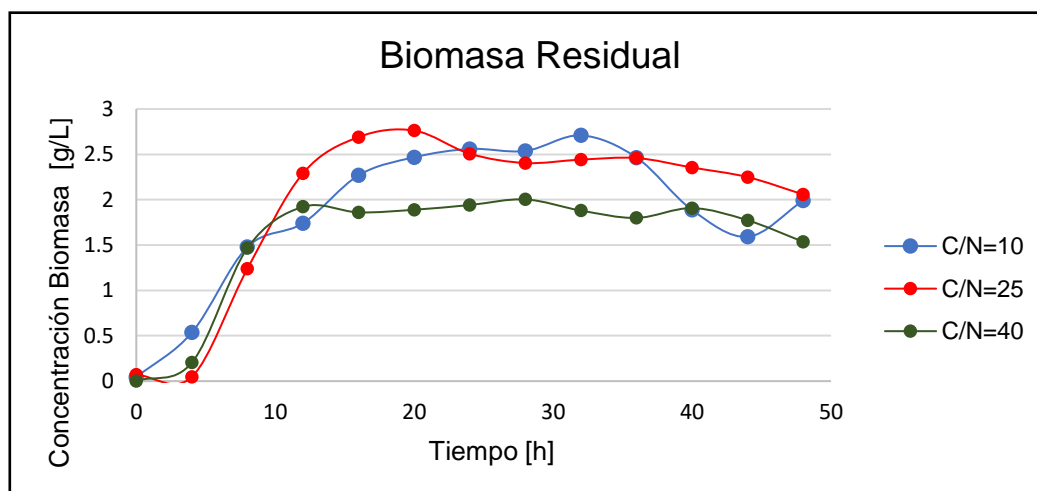
El glicerol y el PHB fueron cuantificados mediante HPLC en un equipo UltiMate 3000 UHPLC System. 1.5 mL de sobrenadante fueron filtrados mediante una membrana PVDF de 0.45 µm y llevados a análisis empleando una columna SupelcoGel C610H de intercambio de iones. Se empleó como fase móvil H₂SO₄ 5 mM a un flujo de 0.6 mL/min y una temperatura en la columna de 60 °C. La detección de glicerol se realizó mediante un detector de índice de refracción con temperatura en la celda de 35°C. Para la cuantificación de PHB, 2 mL de medio fermentado fueron centrifugados y el pellet resultante se secó mediante liofilización. Se llevó a digestión en 1 mL de ácido sulfúrico al 97% a 96 °C por 20 minutos, con el fin de obtener ácido crotónico a partir del PHB presente en la muestra. La solución de digestión se diluyó 50 veces y se almacenó en viales de cromatografía. Se emplearon las mismas condiciones de análisis que para glicerol y la detección del ácido crotónico se llevó a cabo mediante un detector de UV-VIS a una longitud de onda de 221 nm.

3. RESULTADOS

Los datos reportados a continuación corresponden a los promedios de los duplicados realizados para cada relación C/N, consiguiendo tener desviaciones relativas para PHB, Biomasa residual, glicerol, nitrógeno y oxígeno no mayores a 12.4%, 9.5%, 5.4%, 5.9% y 3.1% respectivamente. El análisis de las desviaciones para cada relación C/N se encuentra en el **Anexo A**

En la Figura 2 se presentan los perfiles de concentración de biomasa para cada una de las relaciones C/N evaluadas.

Figura 2 Cinética de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 para relaciones C/N 10, 25 y 40.

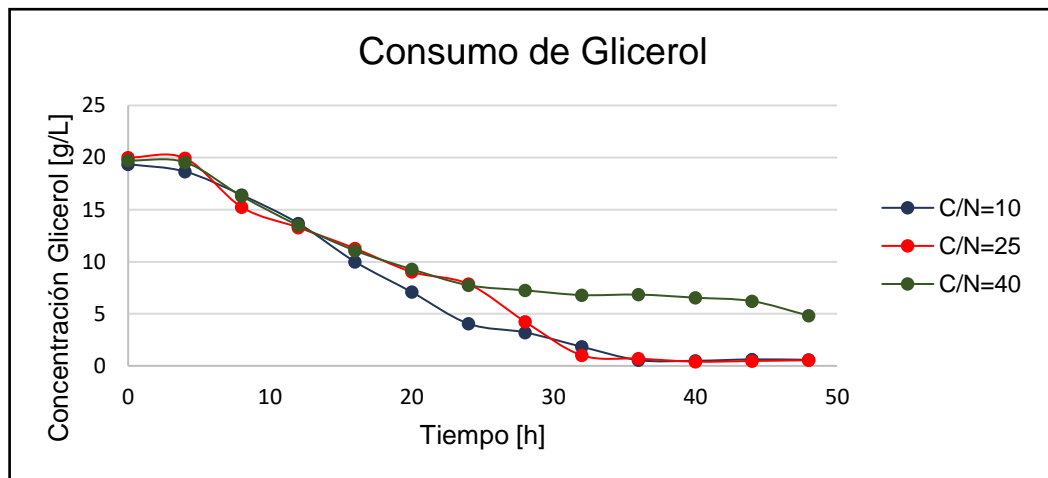


Se observan claras fases de latencia de cuatro horas para las relaciones C/N 25 y C/N 40. Para la relación C/N 10, no se observa fase de latencia, lo cual puede ser explicado debido a la mayor disponibilidad de nitrógeno, el cual es usado por *B. megaterium* B2 principalmente para la producción de biomasa. Con respecto a la fase exponencial de crecimiento, se observa que la de mayor duración corresponde a la condición C/N 10 con 16 horas, seguida de C/N 25 con 12 horas y C/N 40 con

8 horas. Nuevamente, la mayor duración de la fase exponencial de crecimiento coincide con la mayor disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo, sin embargo, la máxima concentración de biomasa fue alcanzada para la condición C/N 25 con 2.7331 g/L a las 20 horas de cultivo. Banacore³⁰, reporta una máxima concentración de biomasa de 2.2 g/L para una relación C/N 5 utilizando glicerol crudo, observándose que las concentraciones finales de biomasa y por ende de PHB son demasiado bajas en *Bacillus megaterium* con miras a la producción industrial³¹.

La Figura 3, presenta la variación de la concentración de glicerol en la fermentación, para relaciones C/N 40, 25 y 10.

Figura 3 Consumo de glicerol para relaciones C/N de 10, 25 y 40



Se observa una correlación en el comportamiento de los perfiles de glicerol y biomasa: durante las primeras cuatro horas no se presenta consumo de glicerol ni producción de biomasa en las relaciones C/N=25 y C/N=40. Comportamiento contrario se observa para C/N 10 en donde hay consumo de glicerol y producción de biomasa en las primeras cuatro horas de cultivo. Se evidencia que, al iniciar la

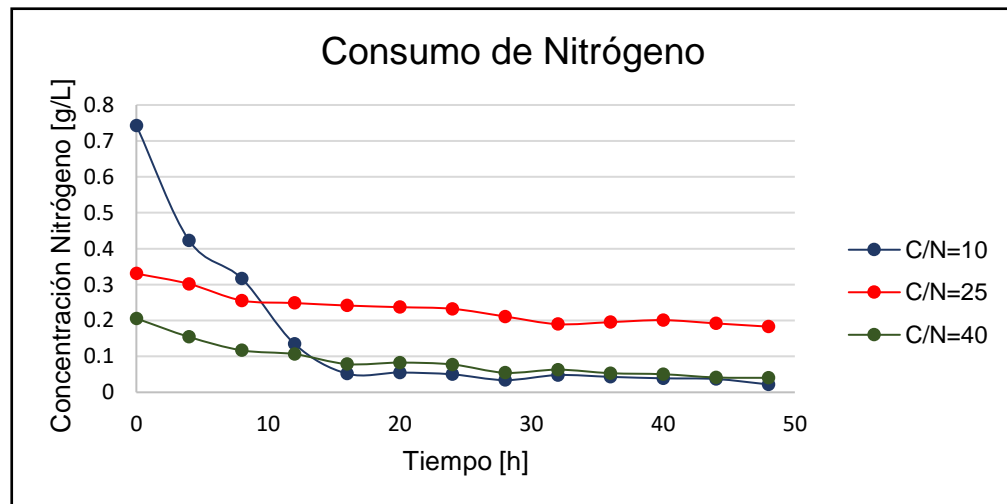
³⁰ BANACORE. Op. cit., p. 55.

³¹ LÓPEZ. Op. cit., p. 63.

fase exponencial de crecimiento, la concentración de glicerol decrece rápidamente para las tres condiciones evaluadas. Es de destacar que de acuerdo con la Figura 2, en los tres experimentos había cesado la producción de biomasa antes de las 20 horas de fermentación y sin embargo se observa consumo de glicerol después de este tiempo para las tres condiciones evaluadas. Por este comportamiento se pudo inferir que “el flujo de carbono en estas situaciones se dirige por vías metabólicas que no implican la producción de biomasa (sintetizar PHB o respiración celular)”³². Las fermentaciones con C/N 25 y C/N 10 agotaron el glicerol en un 96.50% y 97.18% respectivamente, ambas en la hora 36. Sólo para el experimento con C/N 40 se tuvo un remanente de glicerol (36.78 %) y su consumo fue muy lento a partir de la hora 24, lo que permite inferir que presentó el agotamiento de otro macronutriente.

La Figura 4, presenta la variación de la concentración de nitrógeno en la fermentación, para relaciones C/N 10, 25 y 40.

Figura 4. Consumo de nitrógeno para relaciones C/N de 10, 25 y 40.



³² BANACORE. Op. cit., p. 49.

Se observa un consumo acelerado (93%) de la fuente de nitrógeno para la condición C/N 10 desde la hora cero hasta la hora 16 de la fermentación. Dicho comportamiento indica que una alta disponibilidad de nitrógeno favorece la producción de biomasa. Para la relación C/N 25 se observa un consumo lento de nitrógeno (45.45% en 32 horas), el cual se detiene a la hora 32, coincidiendo con el punto de agotamiento del glicerol. Finalmente, para C/N 40 se tuvo consumo casi total de nitrógeno en las primeras 28 horas del cultivo, punto a partir del cual se observa una disminución en la velocidad de consumo de glicerol.

Se observa por lo tanto que *B. megaterium* B2 puede consumir glicerol aún en ausencia de fuente de nitrógeno, pero no presenta consumo de nitrógeno en ausencia de fuente de carbono. Babel; Ackermann y Breuer.³³, concluyen que cuando hay una limitación fuerte de nitrógeno, la bacteria no logra reproducirse eficientemente debido a que no puede producir aminoácidos por lo que la formación de biomasa se detiene. Así mismo López *et al.*³⁴, avala que la bacteria puede dejar de reproducirse ante una alta relación C/N debido a que esta condición induce a la bacteria a esporular como mecanismo de protección, razón por la cual la acumulación de PHB es menor. De esta misma forma, Banacore³⁵ reporta que el fenómeno de esporulación puede inducir el consumo del PHB producido.

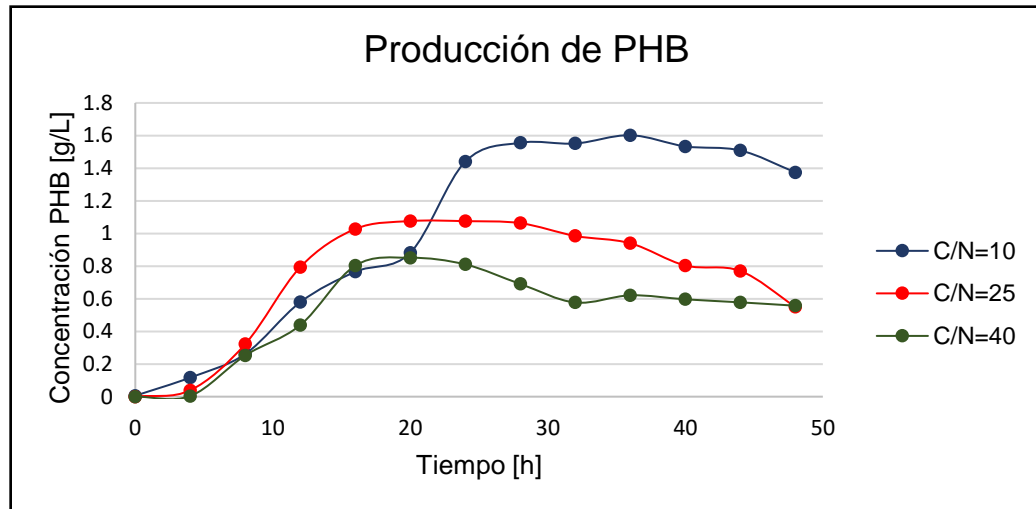
La cinética de producción de PHB para las tres relaciones C/N estudiadas se presenta en la Figura 5.

³³ BABEL, Wolfgang; ACKERMANN, Jorg-Uwe y BREUER, Uta. Op. cit., p.131-136.

³⁴ LÓPEZ, *et al.* Op. cit., p. 256.

³⁵ BANACORE. Op. cit., p. 22.

Figura 5. Cinética de producción de PHB para relaciones C/N de 10, 25 y 40.



La curva de producción de PHB muestra que para la relación C/N 10, se obtiene una producción acelerada hasta la hora 24, seguida de un pequeño incremento hasta la hora 36. La máxima concentración de PHB alcanzada, fue de 1.5927 g/L en la hora 36.

Así mismo se observa un consumo de PHB a partir de esta hora, coincidiendo con el punto de agotamiento de la fuente de carbono, fenómeno se puede explicar debido a que el microorganismo utiliza PHB como fuente de energía cuando así lo requiere³⁶.

Para las relaciones C/N 25 y 40, la producción del biopolímero inició a la hora 4, y se obtuvo un comportamiento similar para estas dos relaciones, con una máxima producción de PHB a las 20 horas con valores de 1.1057 g/L y 0.8307 g/L respectivamente. Es de resaltar el inicio temprano del consumo de PHB para la relación C/N 40 (hora 24), comportamiento que puede ser provocado por la limitación de nitrógeno ya que en esa hora aún se tenía una concentración de glicerol cercana a los 8 g/L.

³⁶ CAMPUZANO. Op. cit., p. 29.

La máxima producción de PHB alcanzada (1.5927 g/L) es mayor a las acumulaciones reportadas en la literatura, en biorreactor utilizado glicerol crudo (1.20 g/L a las 11 horas de cultivo³⁷) y jarabe de dátil (0.85 g/L³⁸).

Según los datos obtenidos, el PHB se produce mayoritariamente en la fase exponencial de la bacteria, ya que la producción del biopolímero sigue el mismo comportamiento que la curva de crecimiento del microorganismo. Se obtuvieron porcentajes de producción de PHB en la fase exponencial de 68.48%, 90.88% y 62.6% para las relaciones C/N 10, 25 y 40, respectivamente. De acuerdo a lo anterior se puede decir que el PHB es producido por *Bacillus megaterium* B2 principalmente como un metabolito primario. El análisis completo se presenta en el **Anexo B**.

En la Tabla 4 se encuentran los parámetros más relevantes del proceso obtenidos durante las fermentaciones por *Bacillus megaterium* B2 en cultivo Batch para las relaciones C/N 10, 25 y 40. Para realizar el cálculo de estas variables, se utilizaron datos tomados de tendencias realizadas para cada una de las variables. Estas tendencias se consignan en el **Anexo C**.

³⁷ MORENO, *et al.* Op. cit., p. 688

³⁸ OMAR, S. *et al.* Optimization of cell growth and Poly (3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. Biotechnol. 2001. Vol. 23, No. 14. p. 1119-1123

Tabla 4 Parámetros relevantes en la producción de PHB para relaciones C/N evaluadas.

Variable	Unidades	C/N=10	C/N=25	C/N=40
Máxima producción de PHB peso seco	[g/L]	1.5927	1.1057	0.8307
Producción de biomasa residual	[g/L]	2.2493	2.7331	1.8723
Acumulación PHB en la célula peso seco	%	41.46	28.80	30.73
Productividad de PHB	[g/L*h]	0.044	0.055	0.041

La producción de biomasa reportada en la Tabla 4, corresponde al valor medido en el punto donde la concentración de PHB fue mayor. Así también, la productividad se calculó tomando la máxima producción de PHB y dividiéndola sobre las horas en la que esta producción fue alcanzada.

Los valores de productividad alcanzados en el proceso de fermentación, para las diferentes relaciones C/N, fueron muy similares. Estos resultados comparados con los reportados por Naranjo³⁹ son marcadamente menores, el cuál obtiene una productividad de PHB de 0.0771 g/L*h; caso similar es reportado por López⁴⁰ el cual obtiene una productividad de PHB de 0.082 g/L*h empleando glucosa como fuente de carbono, considerando “que el cambio de sustrato de glucosa a glicerol no representa una influencia considerable en la producción de PHB”⁴¹. No obstante, teniendo en cuenta el objetivo de la investigación, la productividad puede ser tenida en cuenta en procesos continuos, donde este parámetro influye directamente en los costos del proceso.

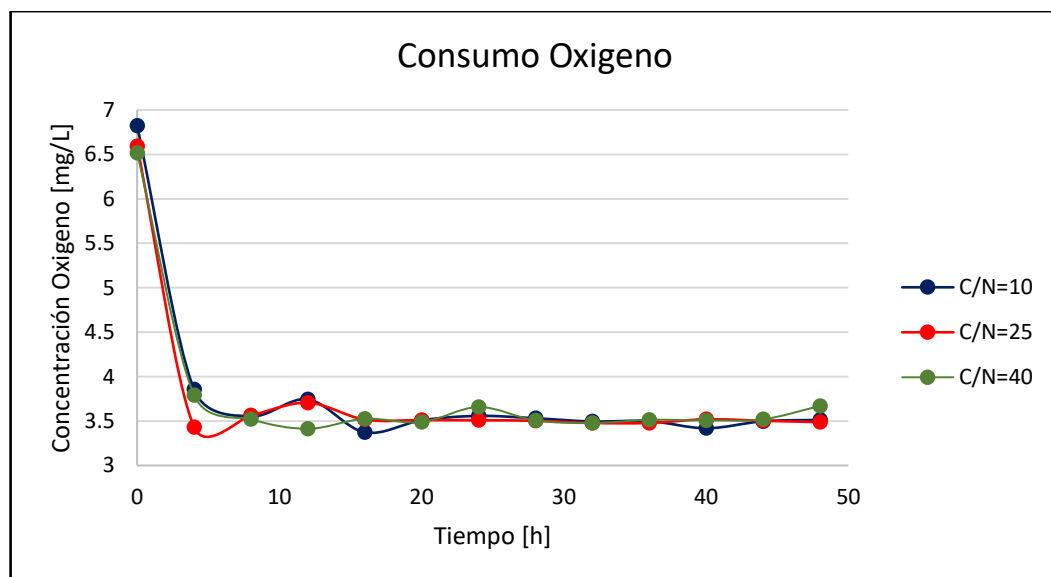
³⁹ NARANJO. Op. cit., p. 100.

⁴⁰ LÓPEZ. Op. cit., p. 72.

⁴¹ NARANJO. Op. cit., p. 99.

La Figura 6 presenta el consumo de oxígeno para las diferentes relaciones C/N. Esta variable, a diferencia de las demás, se mantuvo controlada y su valor se fijó en 50% de oxígeno disuelto los cuales equivalen a 3.5 mg O₂/L. Se puede observar que para la relación carbono nitrógeno 25, el oxígeno, aunque se estabiliza más rápido a diferencia de las otras, fue la fermentación que presentó más fluctuaciones en su control.

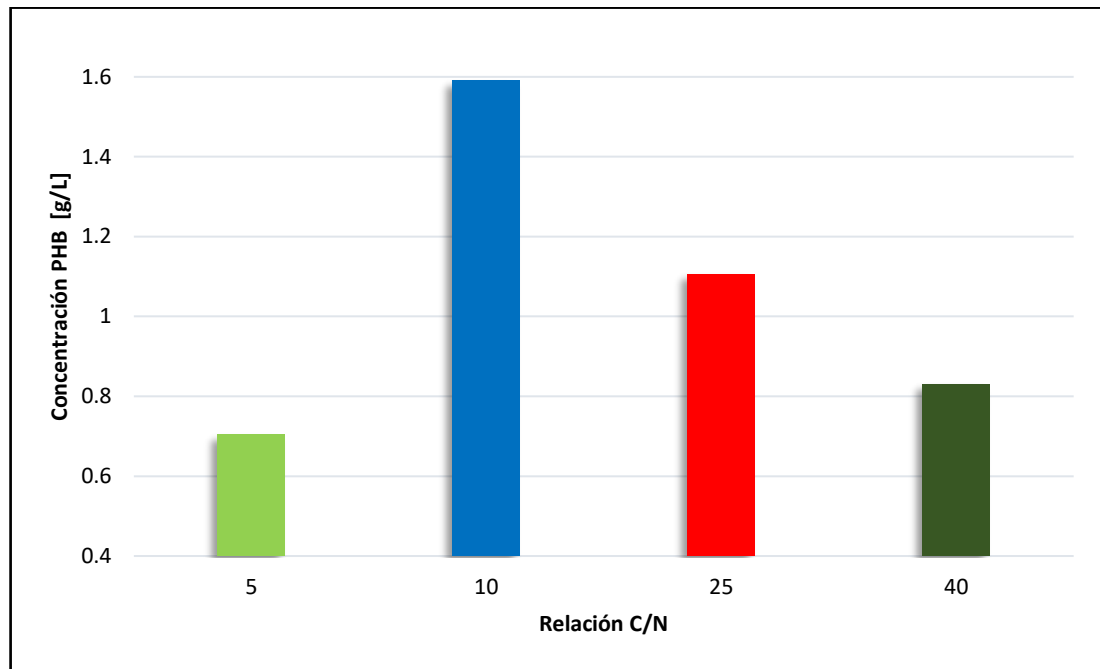
Figura 6 Consumo de Oxígeno para relaciones C/N de 10, 25 y 40



En la Tabla 5 se observa que una mayor disponibilidad de nitrógeno favorece la producción de PHB, por lo que se consideró conveniente realizar una fermentación adicional con una relación C/N 5, con el fin de verificar la tendencia al someter la bacteria a una disponibilidad de nitrógeno mayor que la ofrecida por la relación C/N 10. Se valoró esta relación debido a que se quería conocer si el comportamiento seguía una tendencia ascendente para para una relación C/N menor a 10.

La Figura 7 muestra la máxima concentración de PHB alcanzada para cada relación carbono nitrógeno.

Figura 7 Producción de PHB para diferentes relaciones C/N.



De acuerdo con la Figura 7, se puede observar que la concentración máxima de PHB obtenida para la relación C/N 5 es inferior a la relación C/N 10, con una concentración de PHB de 0.7035 g/L. El comportamiento de las variables cinéticas para una relación C/N 5 se consigna en el **Anexo D**.

Dicha disminución de la concentración de PHB alcanzada para la relación C/N 5 puede ser debida a que a partir de valores menores que una relación C/N 10, la alta disponibilidad de nitrógeno favorece la producción de biomasa y a pesar de presentarse acumulación de PHB, es necesario un grado de limitación de algún nutriente para su eficiente acumulación.

4. CONCLUSIONES

Se demostró que la variable C/N tiene influencia en el metabolismo de *Bacillus megaterium* hacia la producción de PHB. Por ende, para la acumulación de PHB a partir de glicerol crudo (fuente de carbono en exceso), una baja disponibilidad de nitrógeno (C/N 40) no favorece la producción del biopolímero debido a la naturaleza de la bacteria a esporular. Así también, una alta disponibilidad de nitrógeno (C/N 5) favorece mayoritariamente el crecimiento de biomasa comparado con la producción de PHB ante estas condiciones. La mayor concentración de polímero (1.5927 g/L) se alcanzó para una relación carbono nitrógeno C/N 10.

Bacillus megaterium B2 logró crecer a partir de glicerol crudo como fuente de carbono, alcanzando una máxima concentración para la condición C/N 25 con un valor de 2.7331 g/L. Además, el PHB es producido por el microorganismo principalmente como un metabolito primario

5. RECOMENDACIONES

Las relaciones C/N 10 y 25 presentaron las mayores concentraciones de PHB, se recomienda tomar esta región como objetivo para maximizar la producción del biopolímero, teniendo en cuenta las condiciones estudiadas y determinando que otros factores pueden incrementar la acumulación del biopolímero.

Se pueden realizar muestreos con menor intervalo de tiempo durante las primeras horas de cultivo, con el fin de determinar si las fases de latencia son más cortas, o si realmente no se presentan.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABEL, Wolfgang. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2001, Vol. 71., pp. 128-139.

BANACORE, Analia. Estudio de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por *Bacillus* sp. utilizando glicerol como fuente de carbono. Tesis de grado de Licenciatura en Biología opción Biotecnología. Montevideo: Universidad de la República. Facultad de Ciencias, 2014. 83 p.

CAMPUZANO ÁLVAREZ, Catalina. Análisis de la producción de polihidroxibutirato usando Lactosuero como materia prima. Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ingeniería- Ingeniería Química. Manizales: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ingeniería y arquitectura, 2015. 94p.

DE ALMEDIA, Alejandra, *et al.* Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Quimiva viva*. Septiembre, 2004, vol.3, No. 3., pp. 122-133. ISSN 1666-7948

DELGADO LEMOS, Ana Carolina y MINA CÓRDOBA, Alexis. Polyhydroxyalkanoates (PHA's) produced by bacteria and its potential application to industrial level. *Informador técnico SENA*. Mayo, 2015, vol.79, No. 1., pp. 93-101.

DOI, Y. Microbial Polyesters. *General Polymer Science & Technology*. Nueva York. 1990. ISBN: 978-0-471-18732-5. 166p

GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda, *et al.* Síntesis y biodegradación de Polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambie.* Noviembre, 2012, Vol. 29 No. 1., pp. 77-115.

GANGURDE, N. S. y SAYYED, R. Z. Poly- β -hydroxybutyrate (PhB): a Biodegradable Polymer of microbial origin. *Natural Polymers, Biopolymers,*

Biomaterial and their composites, Blends and IPNs. Canadá, Apple Academic, 2012. pp. 45-59

LÓPEZ, Jimmy A, *et al.* Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Noviembre, 2012, Vol 17., pp. 250-258.

LÓPEZ JIMÉNEZ, Jimmy Andrés. Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxibutirato (PHB). Tesis de doctor en ingeniería química. Bahía Blanca: Universidad Nacional del Sur, 2011. 215p.

MAYORGA, Manuel Alejandro y MEJÍA, Wilson Alfonso. Aprovechamiento integral del glicerol residual en la industria del biodiesel: caso 1,3-propanodiol (1,3-pd). *TECCIENCIA*. 2012. Vol. 6, No. 12. p. 83.

MORENO, Paalo. 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 Elsevier*. Diciembre, 2015, Vol.32 No. 6., pp. 682-689.

NARANJO, Javier M, *et al.* Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology Elsevier*. Junio, 2013, Vol. 32 No. 6., pp. 38-44.

NARANJO VASCO, Javier Mauricio. 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. 127p.

OMAR, S, *et al.* Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters*. Julio 2001, vol. 23. pp. 1119-1123.

SCHALLMEY, Marcus; SINGH, Ajay y WARD Owen P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. NRC: Research Press. Enero, 2004. Vol. 50 No.1. pp. 1-17.

SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Teoría y Praxis Investigativa*. Julio-Diciembre, 2010, vol. 5 No. 2., pp. 79-84.

TORTOLÓ CABAÑAS, Keyla; BELL GARCÍA, Antonio. Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*. Abril, 2015, Vol. 49 No.1. pp 22-26

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*. Vol. 71 (2001); p. 128-139.

BANACORE, Analia. Estudio de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por *Bacillus sp.* utilizando glicerol como fuente de carbono. Montevideo, 2014, 83p. Tesis de grado de Licenciatura en Biología opción Biotecnología. Facultad de ingeniería.

BARBOSA, Marcela, *et al.* Producción de poli-b-hidroxibutirato (phb) por *Ralstonia Eutropha atcc 17697*. En: *Universitas Scientiarum*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Vol. 10, No. 1 (Ene-Jun, 2005); p. 45-54.

CAMPUZANO, Catalina. Análisis de la producción de polihidroxibutirato usando lactosuero como materia prima. Manizales, 2015, 94p. Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería y Arquitectura. Departamento de Ingeniería Química.

CAVALHEIRO, Joao, *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. En: *Process Biochemistry, Elsevier*. Vol. 44, No. 5 (May, 2009). p. 509-515.

COLIN W, Pouton. y SAGHIR, Akhtar. Biosynthetic Polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. En: *Advande Drug Delivery Reviews*. Vol., 18. No 2 (Ene, 1996); p. 133-162.

DE ALMEDIA, A, *et al.* Bioplásticos: una alternativa ecológica. En: *Revista QuímicaViva*. Vol. 3, No.3 (Sept, 2004). p.122-133.

DELGADO, Carolina y MINA, Alexis. Polyhydroxyalkanoates (PHA's) produced by bacteria and its potential application to industrial level. En: *Dialnet*. Vol.79 No. 1. (Abr, 2015). p. 93-101.

DOI, Y. Microbial Polyesters. En: *General Polymer Science & Technology*. ISBN: 978-0-471-18732-5 (1990); p. 166.

GANGURDE, N. S., y SAYYED, R. Z. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB): A Biodegradable Polymer of Microbial Origin. En *Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends, and IPNs*. Apple Academic Press, Inc. 2012. pp. 46-59.

GONZÁLEZ, Yolanda, *et al.* Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos. En: *Rev. Int. Contam. Ambie.* Vol. 29 No.1 (Nov, 2013). p. 77-115.

JIMÉNEZ, Mónica. Producción de un polímero tipo polihidroxicanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel. Bogota, 2013, 112p. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

K.R.Shah. Optimization and production of Polyhydroxybutyrate(PHB) by *Bacillus subtilis* G1S1 from soil. En: *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Vol. 3, No. 5 (2014). p. 377-387.

LÓPEZ, Javier. Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxicbutirato (PHB). Bahía blanca, 2011, 215p. Tesis de Doctor en Ingeniería Química. Universidad Nacional del Sur.

LÓPEZ, Jimmy A., *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*. Vol.,17. (Nov, 2012); p. 250-258.

LUENGO, J. M., *et al.* Bioplastics from microorganisms. En: *Curr Opin in Microbiol.* Vol., 6. No 3 (Jun, 2003); p. 251-260.

MACRAE, R. M y WILKINSON, J. F. Poly- β -hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. En: *J. gen. Microbiol.* Vol., 19. (1958); p. 210-222.

MARTÍNEZ, Guadalupe. Produccion de plásticos biodegradables en bacterias, maestría en Biotecnología. Montevideo, 2013, 207p. Maestría en Biotecnología. Universidad de la República. Facultad de Ciencias

MAYORGA, Manuel Alejandro y MEJÍA, Wilson Alfonso. Aprovechamiento integral del glicerol residual en la industria del biodiesel: caso 1,3-propanodiol (1,3-pd). *TECCIENCIA.* 2012. Vol. 6, No. 12. p. 83.

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.* Vol., 32. No 6 (Dic, 2015); p. 682-689.

NARANJO, Javier *et al.* Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. En: *Bioresource Technology Elsevier.* Vol.32 No. 6 (Nov, 2013). p. 38-34.

NARANJO VASCO, Javier Mauricio. Producción de Polihidroxitirato a partir de residuos agroindustriales. Manizales, 2010, 127p. Tesis para optar por el título de Magister en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia.

NATIONAL INSTITUTE OF CHEMISTRY. Biopolymers and Bioplastics: Plastics aligned with nature. Ljubljana, 2012.

OJUMU, T.V.; YU, J. y SOLOMON, B. O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. En: *African journal of Biotechnology*. Vol., 3, No 1 (Ene, 2004); p. 18-24.

OMAR S., *et al.* Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. En: *Biotechnology Letters*. Vol., 23. No 14 (Jul, 2001); p. 1119-1123. ISSN: 0141-5492.

PACHECO, Gina; FLORES, Nydia C. y RODRÍGUEZ SANOJA, Romina. Bioplásticos. En: *BioTecnología*. Vol., 18. No 2 (2014); p. 27-36.

REDDY, C.S., *et al.* Polyhydroxyalkanoates: an overview. En: *Bioresource Technology*. Vol., 87. No 2 (Abr, 2003); p. 137-146.

RODRIGUEZ CONTRERAS, A., *et al.* High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. En: *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 114. No. 5 (May, 2013); p. 1378-1387.

SALAZAR MARTÍNEZ, Diana Paola. Estudio del desarrollo industrial en la producción de Polihidroxialcanoatos en la primera década del siglo XXI. Bogota D.C, 2010, 28p. Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.

SCHALLMEY, Marcus; SINGH, Ajay y SALA, Owen. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. En: *NRC: Research Press*. 2004. Vol., 50. No.1; p. 1-17.

SERRANO RIAÑO, Julieth. Yadira. Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. En: *Teoría y Praxis Investigativa*. Vol., 5. No 2 (Dic, 2010); p. 79-84.

TIAN, Jiamin.; SINSKEY, Anthony. J. y STUBBE, JoAnne. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. En: *Journal of Bacteriology*. Vol., 187. No 11 (Jun, 2005); p. 3814-3824.

TORTOLÓ CABAÑAS, Keyla y BELL GARCÍA, Antonio. Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*. En: *ICIDCA*. Vol., 49. No 1 (Abr, 2015); p. 22-26.

ANEXOS

Anexo A. Análisis de desviación media

Para comprobar la repetibilidad de las fermentaciones hechas por duplicado, se realizó en Excel un análisis de desviación media para las concentraciones de PHB, biomasa, glicerol, nitrógeno y Oxígeno.

Como ejemplo, para la fermentación con relación carbono nitrógeno 40 se obtuvieron los siguientes resultados.

Biomasa Residual

Figura A 1 Crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40, por duplicado.

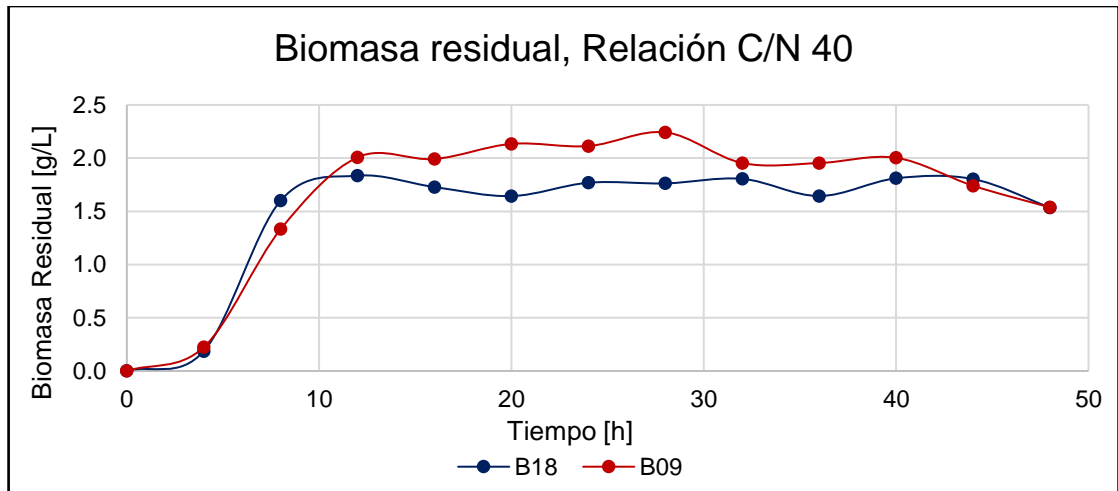


Figura A 2 Desviaciones medias de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40.

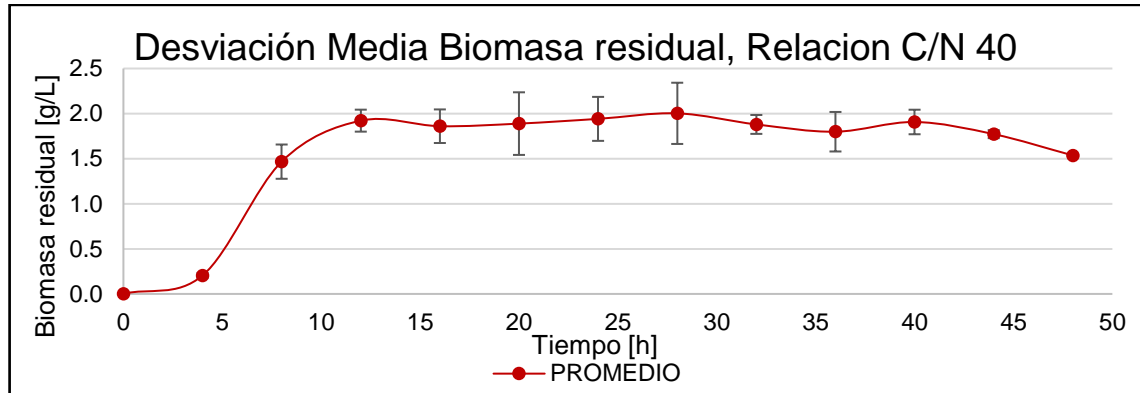


Tabla A 1 Desviaciones medias y relativas para crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40.

Hora	Desviación	
	Media	Relativa
0	0.0004	17.5%
4	0.0267	13.0%
8	0.1901	13.0%
12	0.1218	6.3%
16	0.1862	10.0%
20	0.3473	18.4%
24	0.2437	12.6%
28	0.3394	16.9%
32	0.1049	5.6%
36	0.2192	12.2%
40	0.1360	7.1%
44	0.0443	2.5%
48	0.0007	0.0%
Promedio	Desviación Relat	9.5%

PHB

Figura A 3 Producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40, por duplicado.

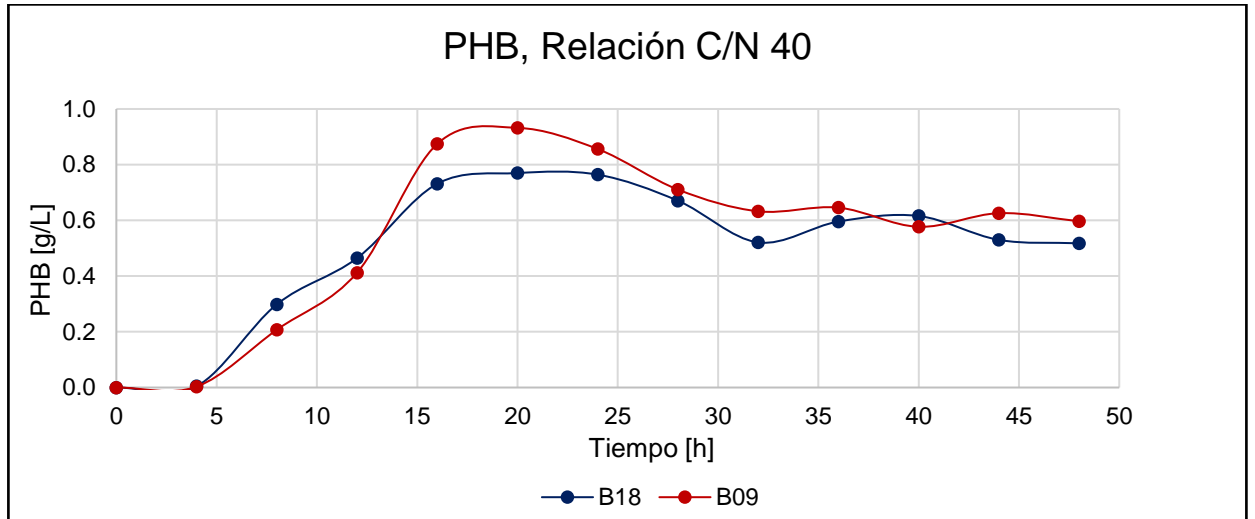


Figura A 4 Desviaciones medias de producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40.

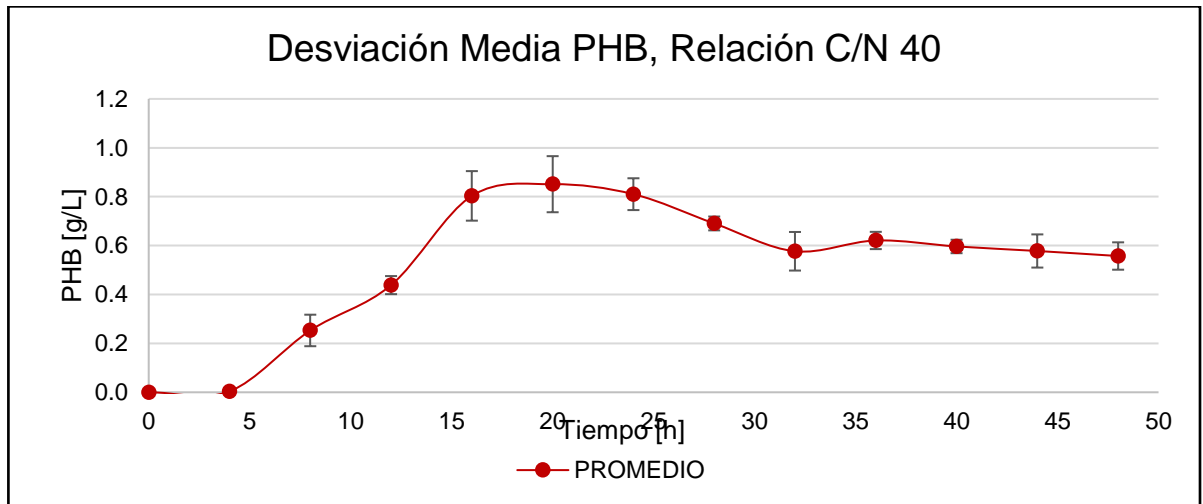


Tabla A 2 Desviaciones medias y relativas de producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40.

Hora	Desviación	
	Media	Relativa
0	0.0000	0.0%
4	0.0012	30.5%
8	0.0645	25.5%
12	0.0370	8.4%
16	0.1013	12.6%
20	0.1147	13.5%
24	0.0650	8.0%
28	0.0283	4.1%
32	0.0789	13.7%
36	0.0354	5.7%
40	0.0275	4.6%
44	0.0678	11.7%
48	0.0559	10.0%
Promedio Desviación Relativa		10.7%

Glicerol

Figura A 5 Consumo de glicerol por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40, por duplicado.

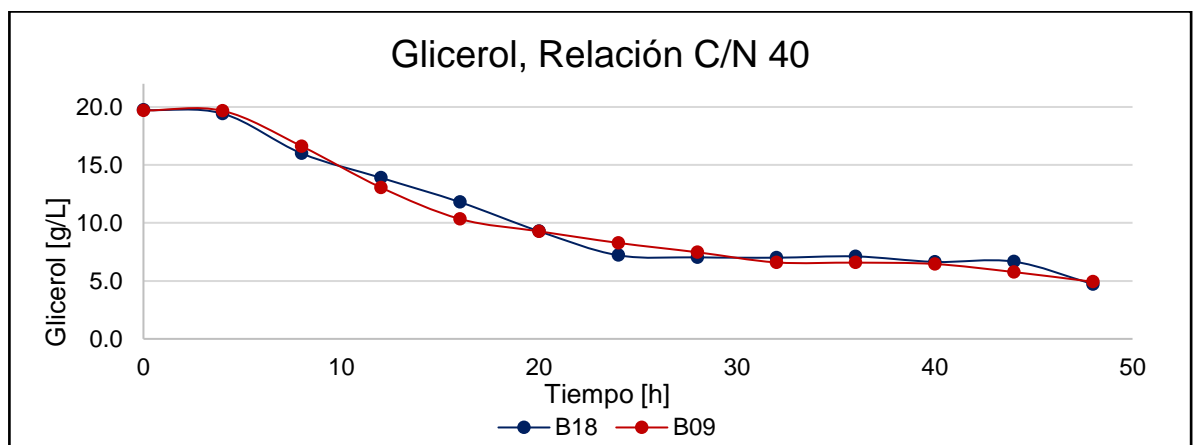


Figura A 6 Desviaciones medias para el consumo de glicerol por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40.

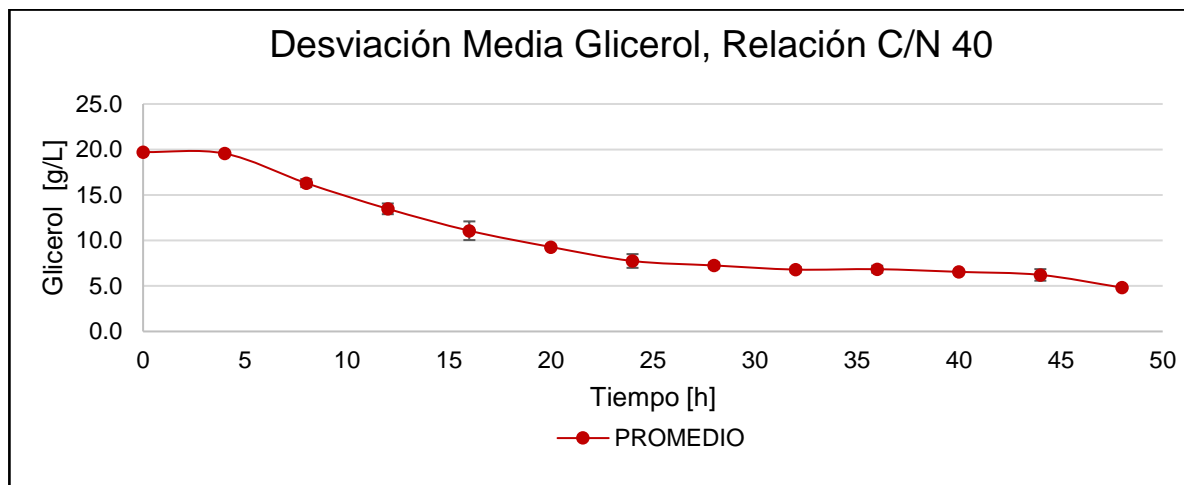


Tabla A 3 Desviaciones medias y relativas para el consumo de glicerol por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40.

Hora	Desviación	
	Media	Relativa
0	0.0315	0.0%
4	0.1700	0.9%
8	0.4382	2.7%
12	0.5894	4.4%
16	1.0271	9.3%
20	0.0042	0.0%
24	0.7540	9.7%
28	0.3089	4.3%
32	0.2882	4.2%
36	0.3781	5.5%
40	0.1271	1.9%
44	0.6362	10.2%
48	0.1417	2.9%
Promedio Desviación Relativa		4.3%

Nitrógeno

Figura A 7 Consumo de nitrógeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40, por duplicado

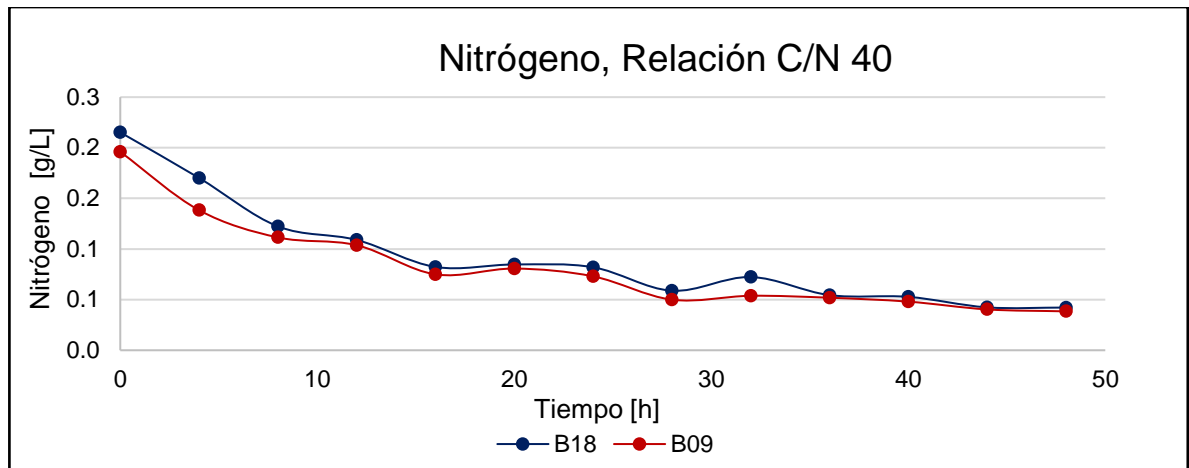


Figura A 8 Desviaciones medias para el consumo de nitrógeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40.

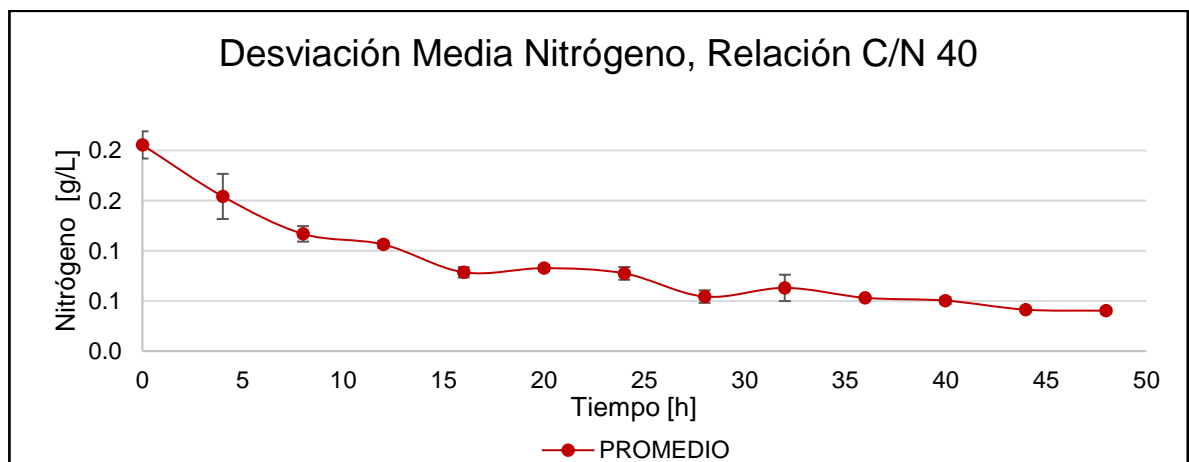


Tabla A 4 Desviaciones medias y relativas para el consumo de nitrógeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40.

Hora	Desviación	
	Media	Relativa
0	0.0136	6.6%
4	0.0225	14.6%
8	0.0077	6.6%
12	0.0037	3.4%
16	0.0052	6.6%
20	0.0029	3.4%
24	0.0064	8.2%
28	0.0062	11.5%
32	0.0131	20.8%
36	0.0018	3.4%
40	0.0033	6.6%
44	0.0014	3.4%
48	0.0027	6.6%
Promedio Desviación Relativa		7.3%

Oxígeno

Figura A 9 Consumo de oxígeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40, por duplicado.

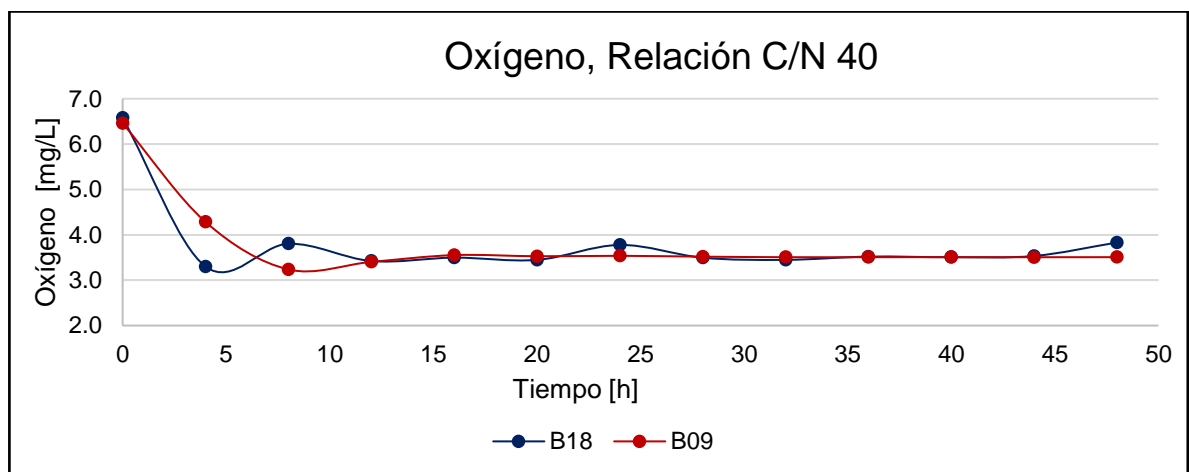


Figura A 10 Desviaciones medias para el consumo de oxígeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40.

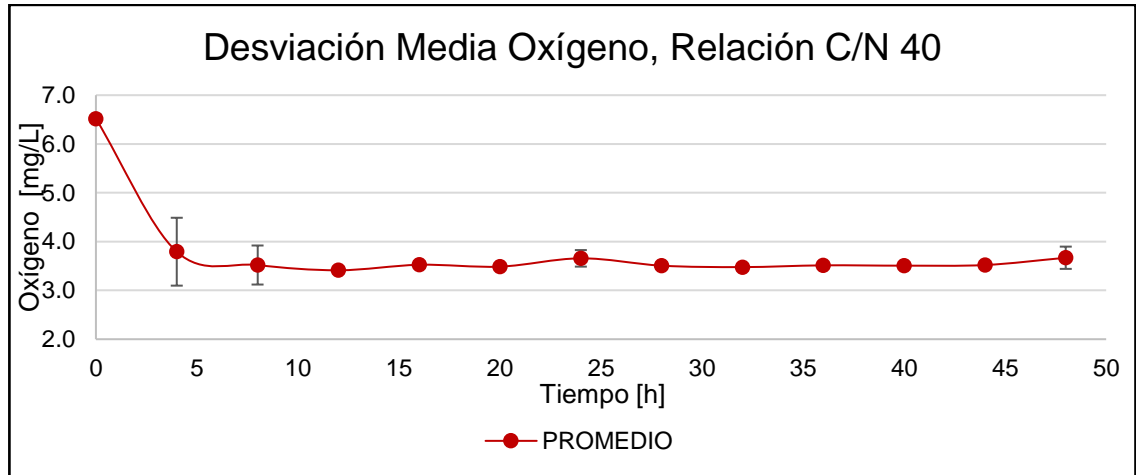


Tabla A 5 Desviaciones medias y relativas para el consumo de oxígeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 40.

Hora	Desviación	
	Media	Relativa
0	0.0136	6.6%
4	0.0225	14.6%
8	0.0077	6.6%
12	0.0037	3.4%
16	0.0052	6.6%
20	0.0029	3.4%
24	0.0064	8.2%
28	0.0062	11.5%
32	0.0131	20.8%
36	0.0018	3.4%
40	0.0033	6.6%
44	0.0014	3.4%
48	0.0027	6.6%
Promedio Desviación Relativa		7.3%

A continuación se muestran las desviaciones para las demás relaciones C/N:

Tabla A 6 Promedios de desviación relativa por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 25.

Relación C/N 25	Promedio desviación relativa [%]
PHB	12.4
Biomasa residual	5.7
Biomasa	7.6
Glicerol	8.1
Nitrógeno	5.9
Oxígeno	1.3

Tabla A 7 Promedios de desviación relativa por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 10.

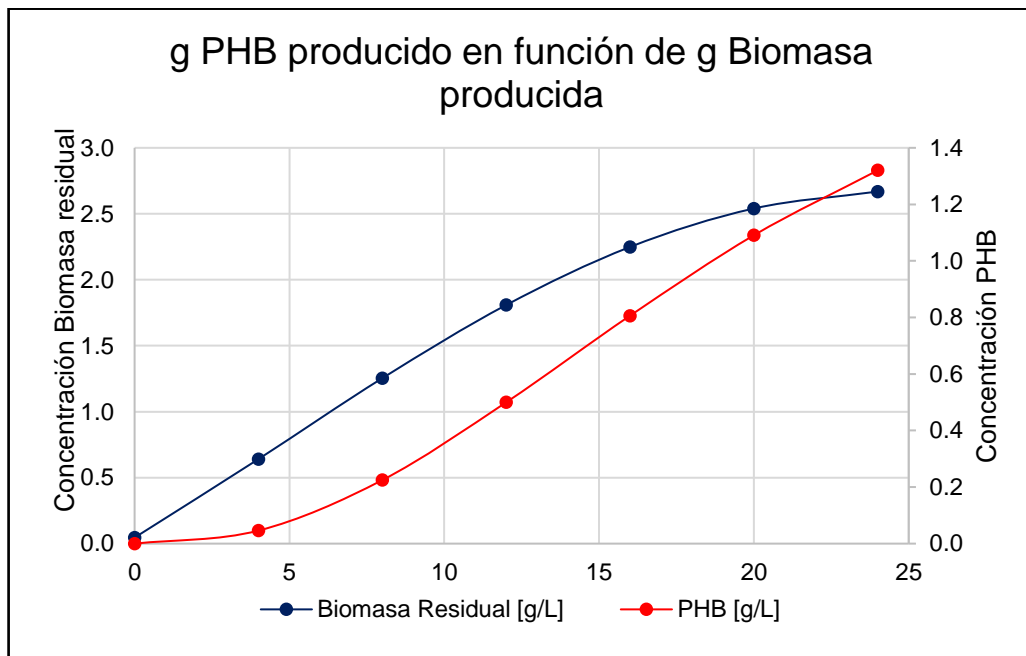
Relación C/N 10	Promedio desviación relativa [%]
PHB	8.5
Biomasa residual	5.1
Biomasa	6.7
Glicerol	5.4
Nitrógeno	75.8
Oxígeno	3.1

Según la Tabla A 7 para la relación C/N 10, la variable nitrógeno presenta un valor promedio de desviación relativa alto, debido a que la tolerancia de la operación para encontrar dicha desviación es muy sensible cuando se trata de números pequeños.

Anexo B. Tipo de metabolito según la relación C/N

Relación C/N 10

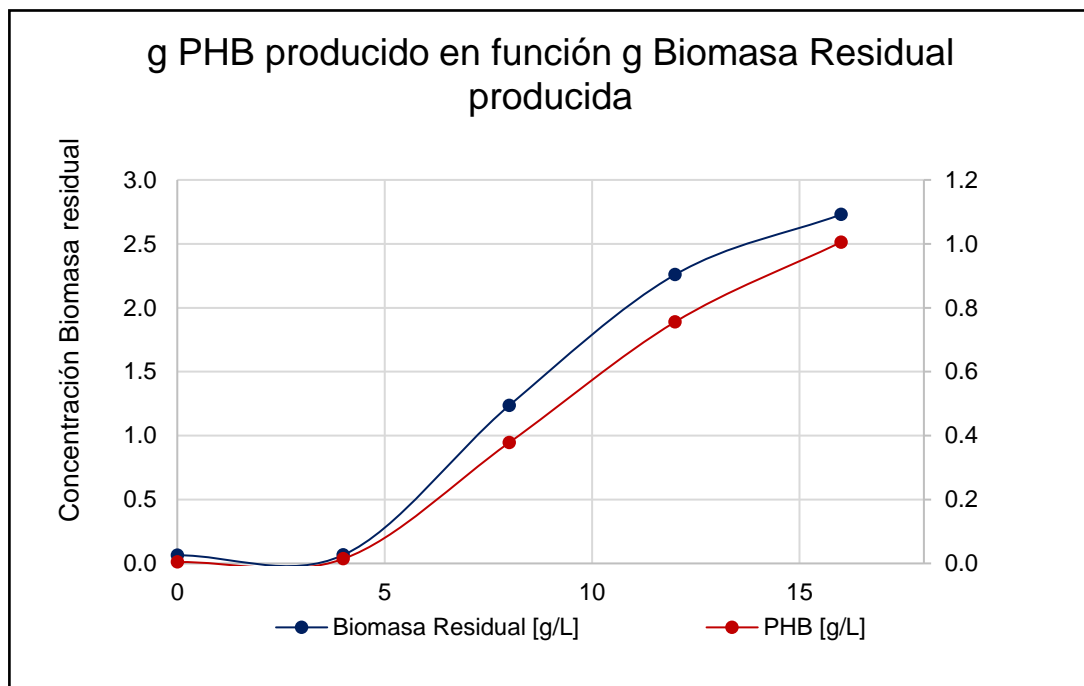
Figura B 1 Producción de PHB en la fase exponencial de la bacteria para una relación C/N 10



Máxima producción
PHB=1.5927 g/L
Fase Exponencial 68.48%
Fase Estacionaria 31.52%

Relación C/N 25

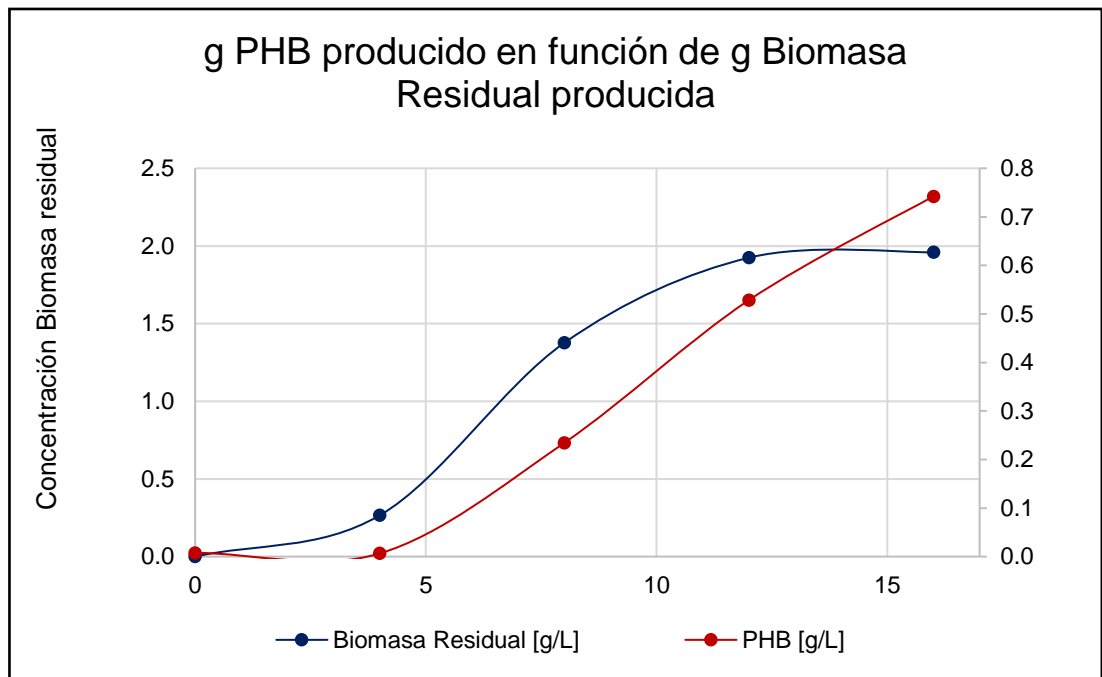
Figura B 2 Producción de PHB en la fase exponencial de la bacteria para una relación C/N 25



Máxima producción
PHB= 1.1057 g/L
Fase Exponencial 90.88%
Fase Estacionaria 9.12%

Relación C/N 40

Figura B 3 Producción de PHB en la fase exponencial de la bacteria para una relación C/N 40



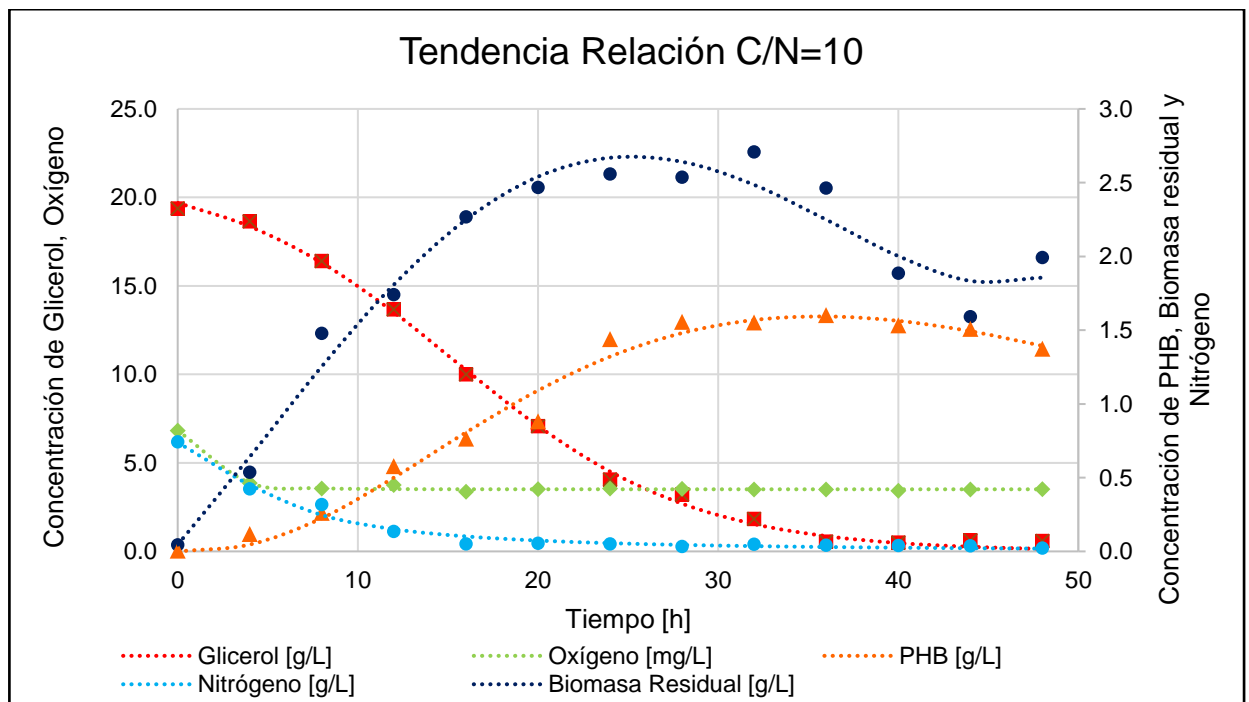
Máxima producción
PHB= 0.8307 g/L
Fase Exponencial 62.6%
Fase Estacionaria 36.4%

Anexo C. Tendencias de las variables cinéticas

Para poder realizar cálculos de parámetros exactos de manera más limpia, se optó por realizar tendencias a cada una de las variables cinéticas analizadas en *Bacillus megaterium* B2. Las siguientes graficas presentan los datos obtenidos como promedios de los respectivos duplicados para las diferentes relaciones carbono nitrógeno (marcadores) y las líneas de tendencia seleccionadas para las cinéticas de producción y consumo (línea de punteo), las cuales fueron construidas a partir de funciones obtenidas por ajuste a los datos experimentales.

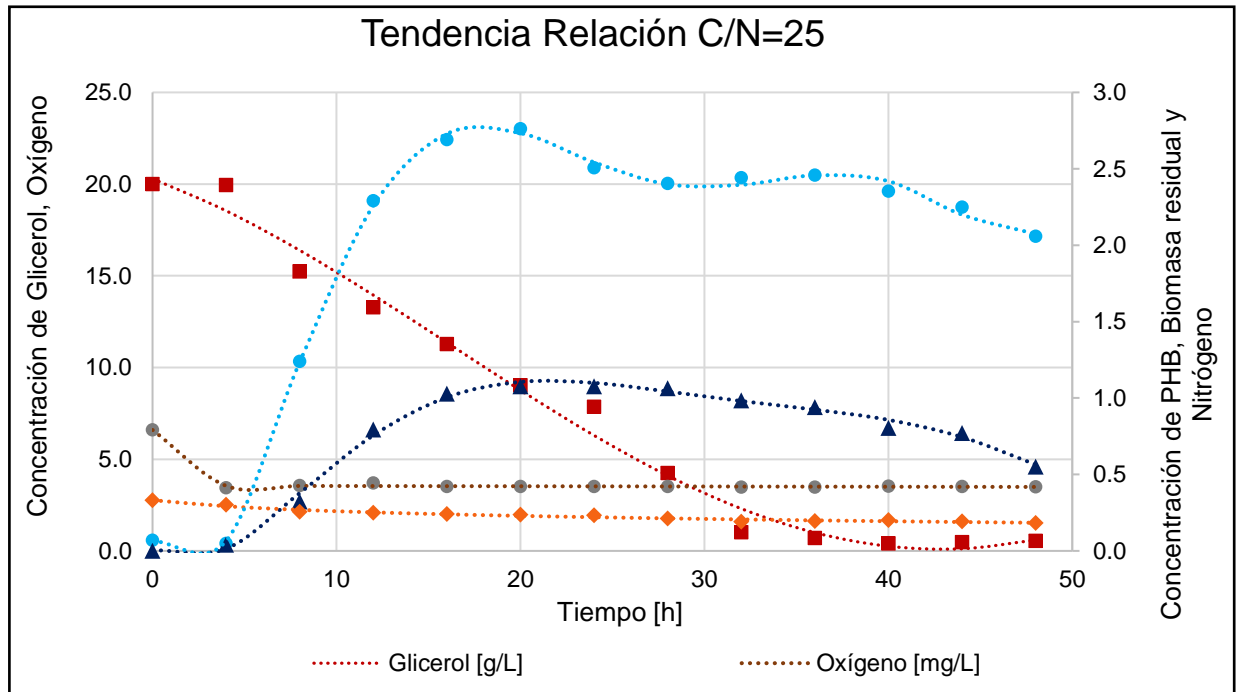
Fermentación con relación C/N 10

Figura C 1 Tendencia para la cinética de *Bacillus megaterium* B2 con relación C/N de 10.



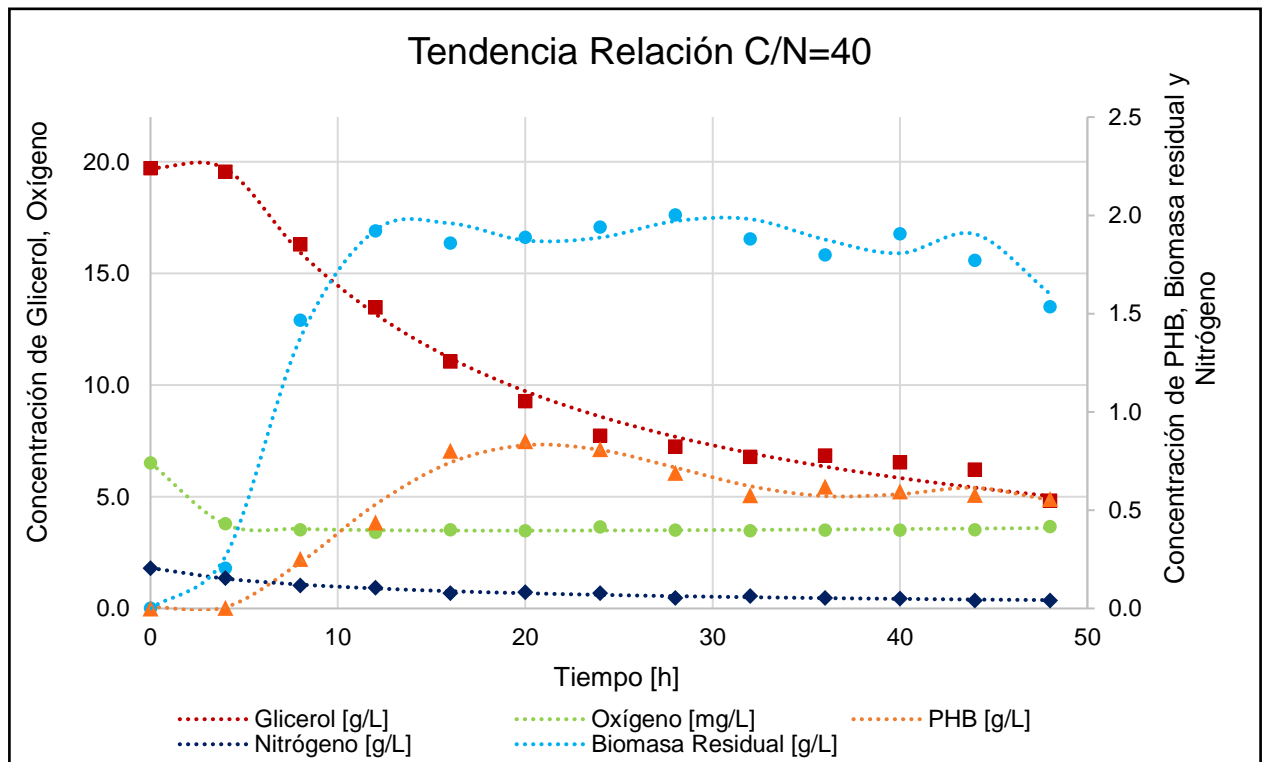
Fermentación con relación C/N 25

Figura C 2 Tendencia para la cinética de *Bacillus megaterium* B2 con relación C/N de 25.



Fermentación con relación C/N 40

Figura C 3 Tendencia para la cinética de *Bacillus megaterium* B2 con relación C/N de 40.



Anexo D. Variables cinéticas para una relación C/N 5

A continuación, se muestra los resultados de la cinética de producción de PHB en *Bacillus megaterium* B2 en cultivo Batch, con una relación carbono nitrógeno de 5. Y las desviaciones presentadas por los dos duplicados realizados.

Biomasa Residual

Figura D 1 Crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5, por duplicado.

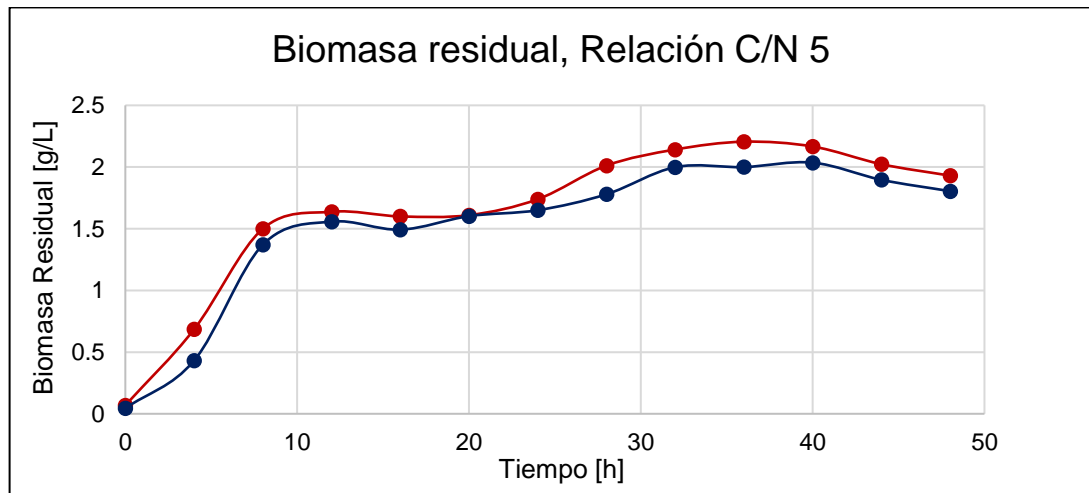


Figura D 2 Desviaciones medias de crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5.

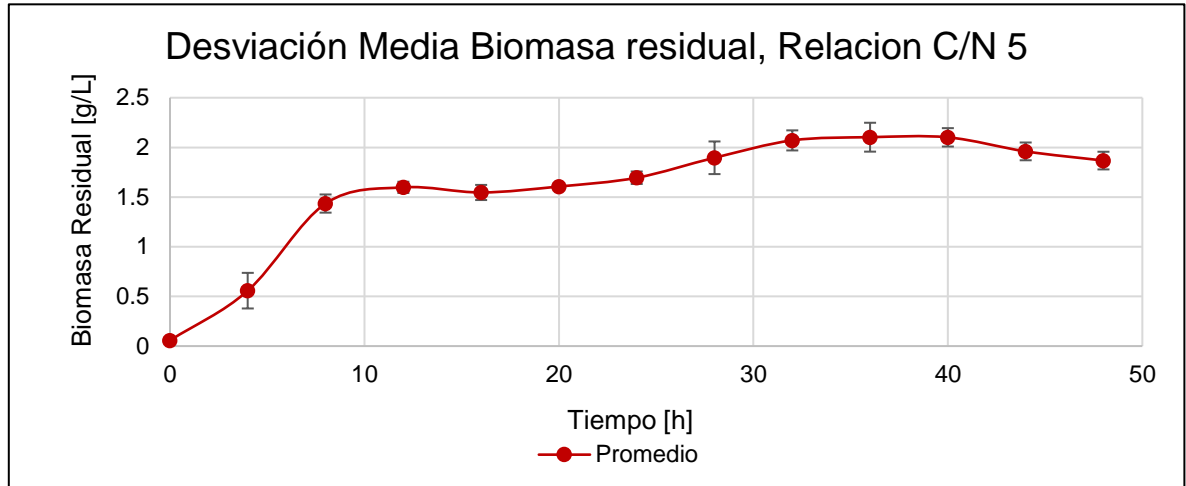


Tabla D 1 Desviaciones medias y relativas para crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5.

Hora	DESVIACIÓN	
	MEDIA	RELATIVA
0	0.0167	1.7%
4	0.1791	17.9%
8	0.0915	9.1%
12	0.0564	5.6%
16	0.0760	7.6%
20	0.0055	0.5%
24	0.0628	6.3%
28	0.1643	16.4%
32	0.1011	10.1%
36	0.1453	14.5%
40	0.0925	9.3%
44	0.0895	8.9%
48	0.0890	8.9%
Promedio Desviación Relativa		8.80%

PHB

Figura D 3 Producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5, por duplicado.

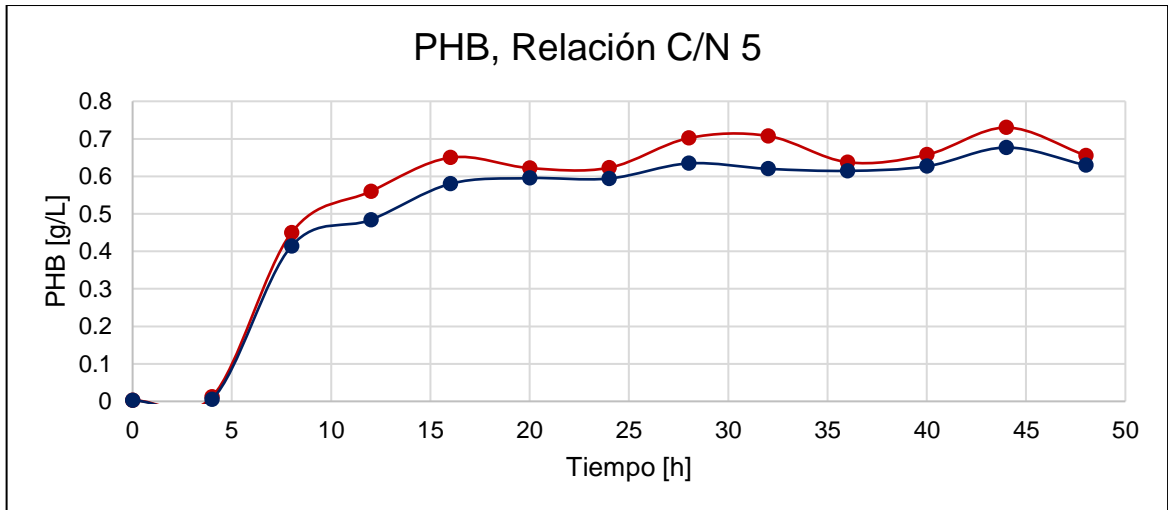


Figura D 4 Desviaciones medias de producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5.

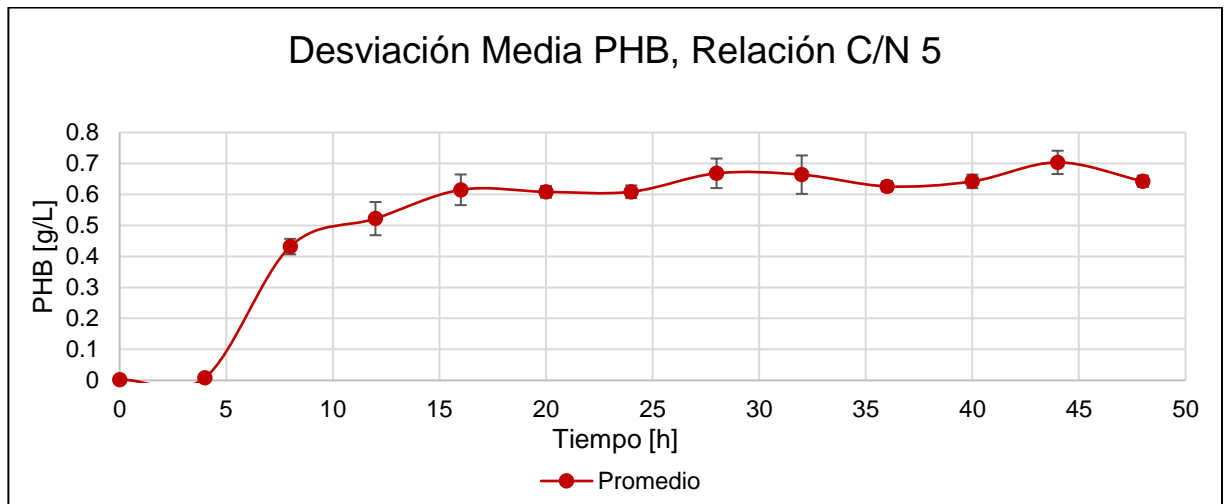


Tabla D 2 Desviaciones medias y relativas de producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5.

Hora	Desviación	
	Media	Relativa
0	0.0001	3.8%
4	0.0046	52.9%
8	0.0251	5.8%
12	0.0536	10.3%
16	0.0495	8.0%
20	0.0189	3.1%
24	0.0204	3.3%
28	0.0476	7.1%
32	0.0620	9.3%
36	0.0163	2.6%
40	0.0218	3.4%
44	0.0375	5.3%
48	0.0183	2.8%
Promedio Desviación Relativa		9.07%

Glicerol

Figura D 5 Consumo de glicerol por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5, por duplicad

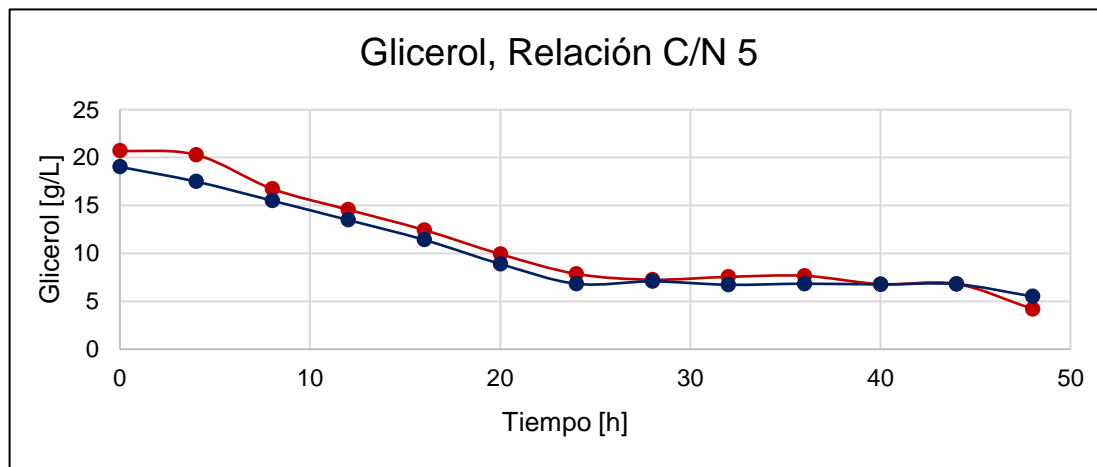


Figura D 6 Desviaciones medias para el consumo de glicerol por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5.

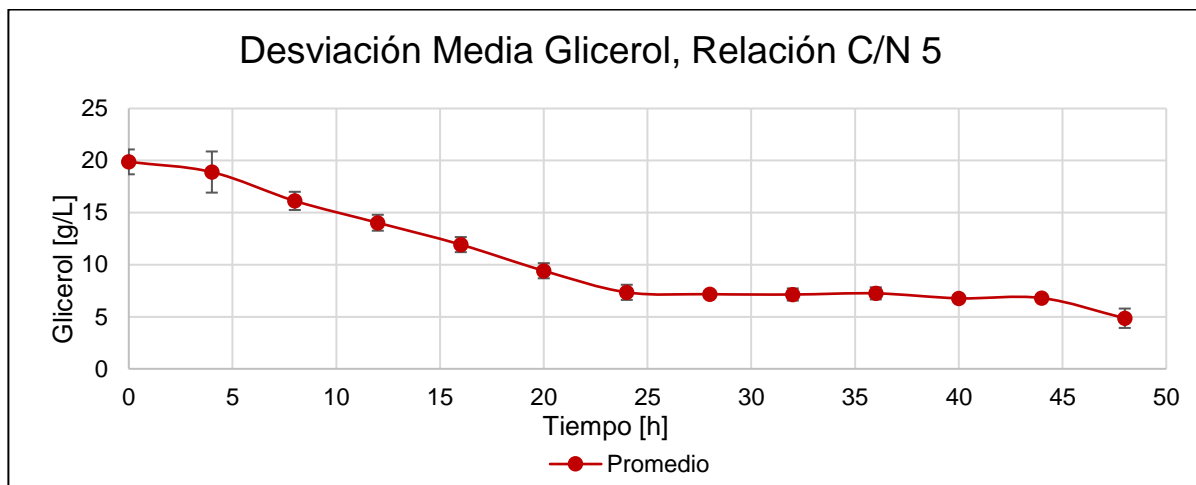


Tabla D 3 Desviaciones medias y relativas para el consumo de glicerol por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5.

Hora	Desviación	
	Media	Relativa
0	1.1950	6.0%
4	1.9747	10.5%
8	0.8737	5.4%
12	0.7635	5.4%
16	0.7235	6.1%
20	0.7260	7.7%
24	0.7275	9.9%
28	0.1289	1.8%
32	0.5819	8.2%
36	0.5820	8.0%
40	0.0218	0.3%
44	0.0188	0.3%
48	0.9299	19.1%
Promedio Desviación Relativa		6.82%

Nitrógeno

Figura D 7 Consumo de nitrógeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5, por duplicado.

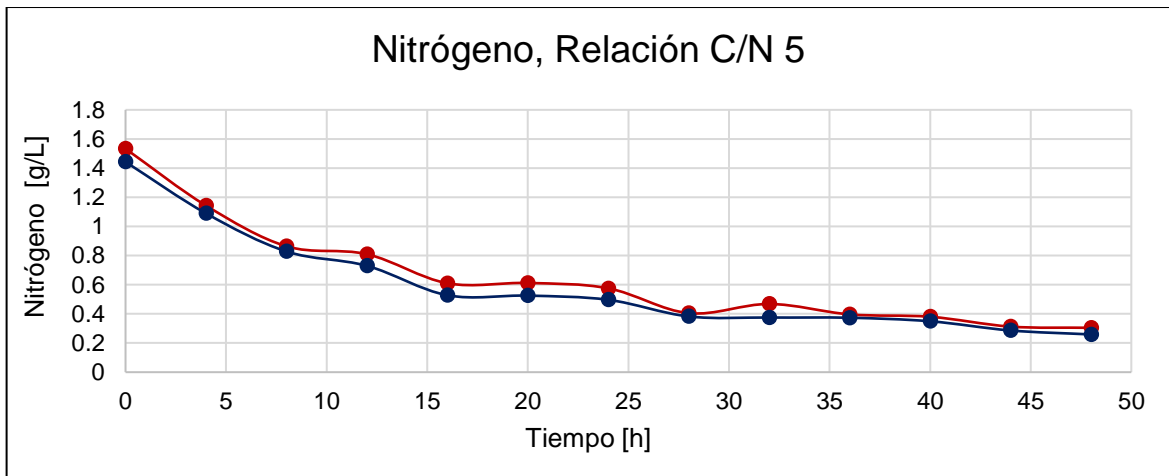


Figura D 8 Desviaciones medias para el consumo de nitrógeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5.

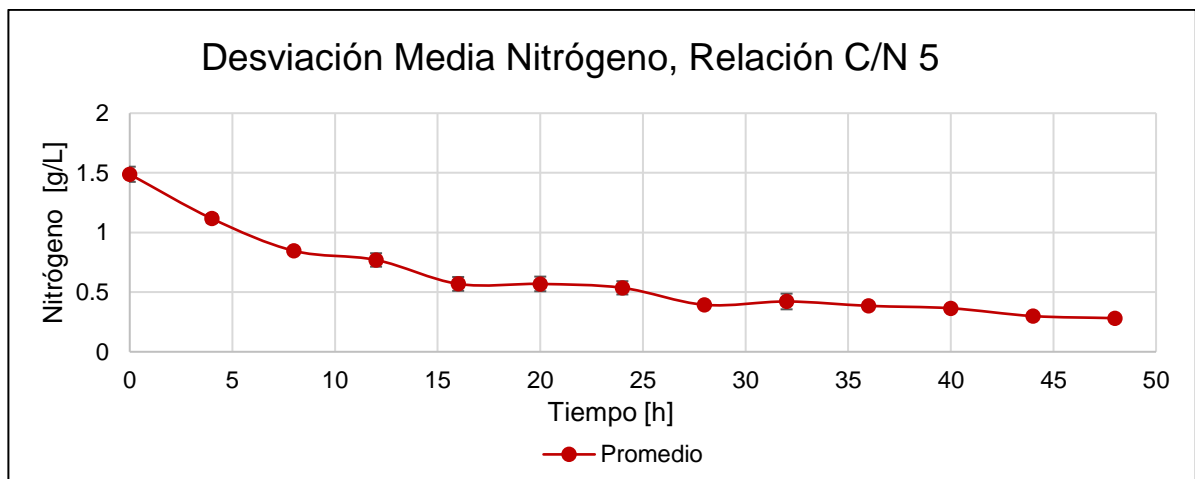


Tabla D 4 Desviaciones medias y relativas para el consumo de nitrógeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5.

Hora	Desviación	
	Media	Relativa
0	0.0636	4.3%
4	0.0377	3.4%
8	0.0251	3.0%
12	0.0564	7.3%
16	0.0581	10.2%
20	0.0613	10.8%
24	0.0557	10.4%
28	0.0158	4.0%
32	0.0657	15.6%
36	0.0163	4.2%
40	0.0218	6.0%
44	0.0188	6.3%
48	0.0324	11.5%
Promedio Desviación Relativa		7.45%

Oxígeno

Figura D 9 Consumo de oxígeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5, por duplicado.

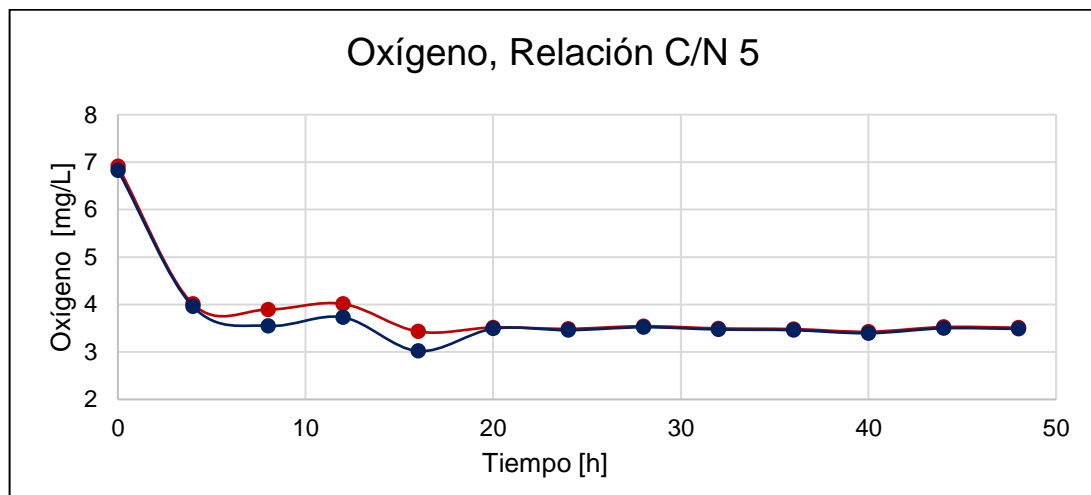


Figura D 10 Desviaciones medias para el consumo de oxígeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5.

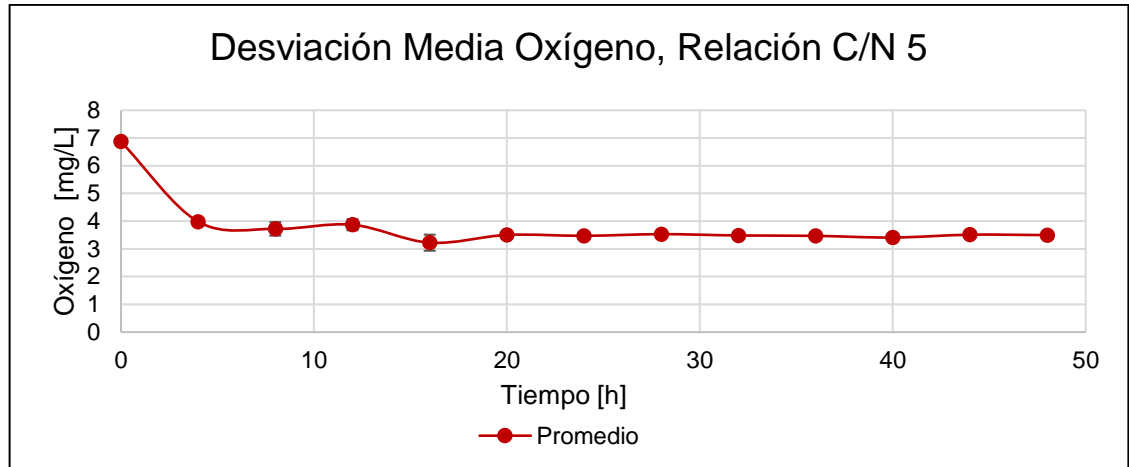


Tabla D 5 Desviaciones medias y relativas para el consumo de oxígeno por *Bacillus megaterium* B2 para una relación C/N 5

Hora	Desviación	
	Media	Relativa
0	0.0636	0.9%
4	0.0377	0.9%
8	0.2434	6.5%
12	0.2006	5.2%
16	0.2904	9.0%
20	0.0189	0.5%
24	0.0204	0.6%
28	0.0158	0.4%
32	0.0163	0.5%
36	0.0163	0.5%
40	0.0218	0.6%
44	0.0188	0.5%
48	0.0183	0.5%
Promedio Desviación Relativa		2.06%