

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) POR
Bacillus sp. UTILIZANDO GLICEROL RESIDUO DE LA INDUSTRIA DEL
BIODIESEL COMO FUENTE DE CARBONO**

PAALO ANDREA MORENO YAÑEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) POR
Bacillus sp. UTILIZANDO GLICEROL RESIDUO DE LA INDUSTRIA DEL
BIODIESEL COMO FUENTE DE CARBONO**

PAALO ANDREA MORENO YAÑEZ

**Tesis presentada como requisito para acceder al título de:
Doctor en Ingeniería Química**

Directores:

CAROLINA GUZMÁN LUNA

Bacterióloga, Ph.D

MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA

Química, Ph.D

HUMBERTO ESCALANTE HERNÁNDEZ

Ingeniero Químico, Ph.D

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

DEDICATORIA

A mi querida hija Sarita.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios por darme la fortaleza y perseverancia necesaria para cumplir con esta meta.

A mi mamá y a mi papá por apoyarme y darme ánimo en todo momento. Además por cuidar a Sarita.

A mí amado esposo, Luis Alejandro por la paciencia y amor que me demostró en estos seis años. Por todos esos días que no durmió por ayudarme.

A Sarita por quererme tanto, ser tan colaboradora y perdonar las semanas en las que tan poco tiempo pude darle.

A mis hermanos, Juliana, Nicolás y Germán por su amor y apoyo.

A mi tía Olga y mi tía Mary por viajar a Brasil a ayudarme con Sarita.

A mis directores, los profesores Carolina Guzmán Luna, Marianny Yajaira Combariza y Humberto Escalante por todo el conocimiento transmitido, el apoyo brindado y la revisión de este documento. Les agradezco además por toda la confianza depositada y por darme tanta seguridad.

Al profesor Nilo Sérgio Medeiros Cardozo, Maria Patricia Muñoz y a Débora Jung Luvizetto Faccin por recibirme en la UFRGS, ayudarme con el modelo y ser mis amigos.

A Yeimmy Rodriguez, Juan Fernando Cancino, Javier Gómez, Nathaly Ramirez, Natalia Tarazona, David Prieto, Leidy Rojas, Katherine Carreño, Camilo Yañez, Victor Lizcano, Mario Ordoñez, Leslie Atencia, Liliana López y Eliana Cardenas por el trabajo en el laboratorio, las trasnochadas y el inmenso apoyo recibido

Gracias! Muchas Gracias!

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer a la Universidad industrial de Santander por aceptarme como estudiante de pregrado y posteriormente posgrado y al centro de estudios e investigaciones ambientales – CEIAM por recibirme como investigadora. Agradezco a la Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS por recibirme para la pasantía y a COLCIENCIAS por otorgarme la beca de sostenimiento por medio de la convocatoria 511 “Generación del bicentenario”.

Esta tesis doctoral fue desarrollada gracias al apoyo económico de tres proyectos de investigación:

10/2009 – 05/2011 “Obtención de biocombustibles a partir de procesos de fermentación anaerobia del glicerol crudo producto del biodiesel utilizando microorganismos nativos” financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) – UIS.

10/2010 – 01/2012 “Búsqueda de cepas nativas para procesos de fermentación de glicerol crudo, proveniente del biodiesel de aceite de palma africana, orientados a la obtención de subproductos de mayor valor agregado” financiado por la Gobernación de Santander - NEOMUNDO.

01/2013 – 07/2015 “Producción de Bioplásticos a partir de residuos de la industria del Biodiesel” financiado por el Banco interamericano de desarrollo BID.

Adicionalmente agradezco a BIO-D por suministrar el glicerol residuo de la industria de biodiesel necesario para realizar la parte experimental de la tesis.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	18
CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE UN MICROORGANISMO NATIVO DEL GÉNERO <i>Bacillus</i> CON CAPACIDAD PARA PRODUCIR PHB UTILIZANDO GRIB.....	28
RESUMEN	28
1.1. INTRODUCCIÓN	29
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	38
1.2.1. Caracterización del GRIB..	38
1.2.2. Muestreo y aislamiento de bacterias del género <i>Bacillus</i>	39
1.2.3. Identificación de <i>Bacillus</i> productores de PHB.	40
1.2.4. Caracterización bioquímica de <i>Bacillus</i> productores de PHB..	41
1.2.5. Adaptación de <i>Bacillus</i> productores de PHB al GRIB.....	41
1.2.6. Producción de PHB por las cepas de <i>Bacillus</i> seleccionadas.	42
1.2.7. Análisis Estadístico.....	42
1.2.8. Métodos analíticos.....	42
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
1.3.1. Caracterización del GRIB..	43
1.3.2. Aislamiento, identificación y caracterización de <i>Bacillus</i> productores de PHB.....	44
1.3.3. Adaptación al GRIB de <i>Bacillus</i> productores de PHB.....	45

1.3.4. Producción del PHB.....	46
1.3.5. Caracterización del PHB.....	50
1.4. CONCLUSIONES	51
1.5. REFERENCIAS.....	51
CAPÍTULO 2. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES FISICOQUÍMICAS Y NUTRICIONALES QUE FAVORECEN LA PRODUCCIÓN DE PHB EN <i>Bacillus megaterium</i> B2	62
RESUMEN	62
2.1. INTRODUCCIÓN	63
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	66
2.2.1. Microorganismo	66
2.2.2. Diseño de experimentos	66
2.2.3. Análisis Estadístico.....	69
2.2.4. Producción de PHB en un biorreactor de 7.5L.....	69
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
2.3.1. Diseño de experimentos.....	70
2.3.2. Producción de PHB en un biorreactor de 7.5L.....	81
2.4. CONCLUSIONES	83
2.5. REFERENCIAS.....	83
CAPÍTULO 3. MODELO MATEMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE PHB POR <i>Bacillus megaterium</i> B2 UTILIZANDO GRIB COMO FUENTE DE CARBONO	88
RESUMEN	88
3.1. INTRODUCCIÓN	89
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	105
3.2.1. Experimentos <i>batch</i> y <i>fed-batch</i>	106

3.2.2.	Modelo matemático para la producción de PHB por <i>B. megaterium</i> B2 .	107
3.2.3.	Simulaciones y estimación de parámetros.....	109
3.2.4.	Análisis estadístico del modelo propuesto	112
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	114
3.3.1.	Experimentos en operación <i>fed-batch</i>	114
3.3.2.	Modelo matemático para la producción de PHB.....	117
3.3.3.	Estimación de parámetros	120
3.3.4.	Evaluación de la calidad del modelo obtenido	123
3.4.	CONCLUSIONES	126
3.5.	REFERENCIAS.....	127
	CONCLUSIONES GENERALES	132
	ANEXOS.....	134

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. . Estructura del polihidroxibutirato (PHB)	19
Figura 2. Reacción de transesterificación para la producción de biodiesel.....	30
Figura 3. Dispositivos médicos realizados con PHB. (A) suturas quirúrgicas bioabsorbibles; (B) tornillos y placas para reparaciones óseas; (C) membranas biodegradables para el tratamiento periodontal; (D) mallas quirúrgicas recubiertas de PHB para cirugías de hernias	35
Figura 4. Células teñidas por la coloración de sudan negro. a) <i>B. megaterium</i> ATCC114581 b) <i>B. megaterium</i> B1 c) <i>B. megaterium</i> B2 d) <i>B. megaterium</i> B8. 1. Antes de la adaptación. 2. Después de la adaptación (microfotografías de campo claro, 100 X).....	45
Figura 5. Producción de biomasa y concentración de glicerol por las cepas <i>B. megaterium</i> B1, B2, B8 y ATCC14581 durante 28 horas de fermentación en matraces de 250 mL	46
Figura 6. Producción de PHB por las cepas <i>B. megaterium</i> B1, B2, B8 y ATCC14581 durante 28 horas de fermentación en matraces de 250 mL	48
Figura 7. Espectros RMN del patrón de PHB (arriba) y del PHB producido por <i>B. megaterium</i> B2 (abajo)	50
Figura 8. Diagrama de Pareto de los resultados del diseño de Plackett-Burman ..	71
Figura 9. Residuos contra niveles de factores del diseño Plackett-Burman	73
Figura 10. Superficies de respuesta del DCC	77
Figura 11 Superficie de respuesta del segundo DCC	79
Figura 12. Dinámica del pH, producción de Biomasa, PHB y concentración de glicerol por <i>B. megaterium</i> B2 en las condiciones optimizadas	80
Figura 13 Dinámica de producción de Biomasa, PHB, concentración de glicerol y nitrógeno por <i>B. megaterium</i> B2 en un biorreactor con las condiciones optimizadas	81

Figura 14. Perfil de oxígeno disuelto por <i>B. megaterium</i> B2 en un biorreactor con las condiciones optimizadas	82
Figura 15. Esquema de la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida	103
Figura 16 Metodología utilizada para desarrollar el modelo matemático de producción de PHB	105
Figura 17. Estrategias de alimentación utilizadas en los experimentos <i>fed-batch</i>	106
Figura 18. Esquema de la fermentación en (a) <i>batch</i> y (b) <i>fed-batch</i>	108
Figura 19 Producción de a. biomasa, b. PHB, concentración de c. glicerol, d. nitrógeno y e. porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de fermentación en experimentos <i>fed-batch</i>	115
Figura 20. Porcentaje de acumulación intracelular de PHB por <i>B. megaterium</i> B2 con respecto a la concentración de glicerol del experimento <i>batch</i> y los seis <i>fed-batch</i> realizados.....	116
Figura 21. Perfil de la velocidad específica de crecimiento de los experimentos <i>batch</i> , FB-A, FB-D y FB-C.	119
Figura 22 Perfiles de las velocidades específicas de crecimiento en experimentos <i>batch</i> y <i>fed-batch</i> . Las líneas continuas representan los valores simulados.....	123
Figura 23 Comparación entre los valores simulados (líneas continuas) y experimentales (puntos) de los experimentos <i>batch</i> y <i>fed-batch</i>	124
Figura 24 Porcentaje de OD en el medio de fermentación con un valor mínimo de 30%.....	153
Figura 25. Producción de biomasa, PHB y consumo de glicerol por <i>B. megaterium</i> B2 manteniendo el OD en un valor mínimo de 30%	154

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Principales empresas productoras de PHB.....	19
Tabla 2. Plantas productoras de Biodiesel en Colombia.....	29
Tabla 3. Composición del GRIB en distintos países	30
Tabla 4. Producción de PHB utilizando residuos agro-industriales como fuente de carbono	34
Tabla 5. Producción de PHB por <i>Bacillus</i> nativos utilizando matraces	37
Tabla 6. Métodos y equipos utilizados en la caracterización del GRIB.....	38
Tabla 7 Resultados de la caracterización del GRIB.....	43
Tabla 8 Optimización de la producción de PHB empleando diseño de Plackett-Burman y MSR.....	65
Tabla 9 Variables y niveles evaluados en la producción de PHB por <i>B. megaterium</i> B2	67
Tabla 10 Diseño de Plackett-Burman para la producción de PHB por <i>B. megaterium</i> B2.....	68
Tabla 11. Resultados del diseño de Plackett Burman.....	70
Tabla 12. ANOVA de los resultados del diseño de Plackett-Burman.....	71
Tabla 13. Resultados del DCC.....	74
Tabla 14 ANOVA del DCC	75
Tabla 15. Resultados del segundo DCC	78
Tabla 16. ANOVA del segundo DCC	78
Tabla 17. Generalidades de los modelos matemáticos desarrollados para la producción de PHB	96
Tabla 18. Tipo de reactor utilizado, condiciones de aireación, agitación y % de OD empleados en los modelos matemáticos desarrollados para la producción de PHB	101

Tabla 19. Formulación general del modelo propuesto modificado para fermentaciones en <i>fed-batch</i>	109
Tabla 20. Análisis de la estructura linealizada de las ecuaciones de variación de PHB y sustratos con respecto al tiempo	110
Tabla 21. Parámetros estimados linealizando los balances de glicerol, nitrógeno y PHB.	121
Tabla 22 Parámetros estimados utilizando el software EMSO	122
Tabla 23 Coeficientes de ajuste y error estándar de estimación del modelo propuesto	125
Tabla 24. Valores de F_0 calculados para todos los posibles subconjuntos de datos de los experimentos realizados. F_{TAB} : 1.8193	125

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
ANEXO A PRECIO COMERCIAL DEL PHB.....	134
ANEXO B INFORME PRESENTADO POR CORPOGEN.....	136
ANEXO C EXPERIMENTO FED-BATCH A OXÍGENO CONSTANTE.....	152

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) POR *Bacillus sp.* UTILIZANDO GLICEROL RESIDUO DE LA INDUSTRIA DEL BIODIESEL COMO FUENTE DE CARBONO*

AUTOR: Paolo Andrea Moreno Yáñez**

PALABRAS CLAVE: Polihidroxibutirato, *Bacillus sp.*, glicerol residuo de la industria de biodiesel

DESCRIPCIÓN

El polihidroxibutirato (PHB) es un biopolímero biodegradable, biocompatible y termoplástico sintetizado por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Este estudio reporta diversos *Bacillus* nativos con la capacidad de acumular PHB utilizando glicerol residuo de la industria de biodiesel como fuente de carbono. De 15 *Bacillus* aislados, *B. megaterium* B2 fue seleccionado para la posterior optimización estadística. Los diseños Plackett-Burman y central compuesto fueron utilizados para encontrar las variables clave y las condiciones óptimas en la producción de PHB. La temperatura y las concentraciones de glicerol y Na_2HPO_4 son las variables experimentales con mayor influencia en la producción de PHB por B2. Después de 14 horas de fermentación en matraz con las condiciones óptimas, B2 produce 0.43g/L de PHB con un 34% de acumulación intracelular. En un biorreactor de 7.5 L bajo las mismas condiciones se alcanzó una concentración máxima de 1.20g/L en 11 horas. Estos valores corresponden a un incremento del 48% y 314% de la producción de PHB con respecto a las condiciones iniciales de cultivo. Para lograr un mejor entendimiento del proceso, se desarrolló un modelo matemático que permite describir el crecimiento del microorganismo, el consumo de sustratos, la formación de producto y simular diferentes estrategias de cultivo. La velocidad de crecimiento del microorganismo se simuló teniendo como sustratos limitantes el oxígeno y el glicerol de acuerdo con las ecuaciones Monod y sigmoideal, respectivamente. Para describir la producción de PHB se utilizó la ecuación de Luedeking-Piret. La simulación y la estimación de parámetros se llevaron a cabo utilizando el software EMSO. Los parámetros se estimaron utilizando los datos obtenidos en fermentaciones *batch* y *fed-batch* realizadas en un biorreactor de 7.5 L. La mejor estrategia de alimentación en *fed-batch*, permitió una producción de PHB de 2.06g/L. Este valor corresponde a un incremento del 72% con respecto a la producción en *batch*.

* Tesis para optar el título de Doctor en Ingeniería Química.

**Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Directores: Carolina Guzman Luna, Ph.D; Marianny Yajaira Combariza, PhD y Humberto Escalante Hernandez, PhD.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION (PHB) BY *Bacillus sp* USING RAW GLYCEROL FROM BIODIESEL INDUSTRY AS CARBON SOURCE*

AUTHOR: Paalo Andrea Moreno Yañez**

KEYWORDS: Polyhydroxybutyrate, *Bacillus sp.*, raw glycerol from biodiesel industry

DESCRIPTION

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable, biocompatible and thermoplastic biopolymer, synthesized as cytoplasmic inclusions by Gram-positive and Gram-negative bacteria. This study reports several wild-type *Bacillus* strains with the ability to accumulate PHB using raw glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. Out of 15 strains from different sources, *B. megaterium* B2 was selected as the most promising strain for further statistical optimization of the medium composition. Plackett–Burman and central composite designs were used to establish key variables and optimal culture conditions for PHB production. Temperature and concentrations of glycerol and Na_2HPO_4 are the experimental variables with the most significant influence on PHB production by B2. After 14 hours of fermentation in shake flasks with optimized medium, B2 produced 0.43 g/L of PHB with a 34% accumulation in the cells. In contrast, under the same conditions, a maximum PHB concentration of 1.20 g/L in a 7.5 L bioreactor was reached at 11 hours. These values correspond to a 48% and 314% increase in PHB production compared to the initial culture conditions. Aiming for a better understanding of the process, a mathematical model that allows to describe the kinetics of microbial growth, substrate consumption, product formation and also to simulate different cultivation strategies was developed. The specific growth rate was simulated using as limiting substrates the oxygen and the carbon source according to the Monod and sigmoidal equations, respectively. The product formation was described by the Luedeking–Piret equation. Model implementation and parameter estimation were carried out in the EMSO process simulator. Key model parameters were estimated from experimental data obtained in batch and fed-batch cultivation using a 7.5 L bioreactor. The best feeding strategy in fed-batch cultures, allowed a PHB production of 2.06 g/L. This value corresponds to an increase of 72% over the batch production.

* Thesis to obtain the Ph.D. degree in Chemical Engineering

**Faculty of physicochemical engineering, School of chemical engineering. Directors: Carolina Guzman Luna, Ph.D; Marianny Yajaira Combariza, PhD and Humberto Escalante Hernandez, PhD.

INTRODUCCIÓN

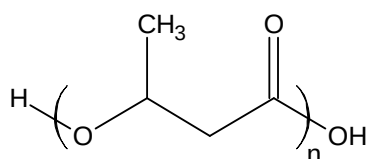
Los polihidroxicanoatos (PHA), poliésteres compuestos por monómeros de hidroxiácidos, son materiales termoplásticos, no tóxicos y biocompatibles. Los PHA se emplean en la fabricación de envases, productos desechables, medicinas, suplementos alimenticios y aplicaciones biomédicas. Los PHA se sintetizan naturalmente, como inclusiones citoplasmáticas, por diferentes géneros de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas como *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Cupriavidus* y *Pseudomonas* (Chen, 2009; Reddy *et al.*, 2003).

Una de las características más sobresalientes de los PHA es su biodegradabilidad que puede producirse por la acción de bacterias y hongos presentes en suelos, en lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), y en aguas superficiales. Estos microorganismos degradan PHA por acción de las enzimas PHA hidrolasa y PHA depolimerasa. La actividad de estas enzimas depende de la composición del polímero y de factores ambientales como temperatura, nivel de humedad, pH y concentración de nutrientes (Madison & Huisman, 1999; Sudesh *et al.*, 2000).

El polihidroxibutirato (PHB) es el PHA más conocido (Figura 1), fue descubierto en 1925 por el Bacteriólogo francés Maurice Lemoigne en colonias de *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926). El PHB presenta propiedades térmicas y mecánicas similares al polipropileno, lo que posibilita la total sustitución del último por el primero (Crank *et al.*, 2005). Otra posible aplicación del PHB es en la industria biomédica, dónde ha sido utilizado para fabricar suturas quirúrgicas (Shishatskaya *et al.*, 2004), reparaciones oseas (Ni & Wang, 2002), y como recubrimiento de mallas quirúrgicas (Bonartsev *et al.*, 2007). Moléculas de PHB de bajo peso molecular son producidas naturalmente en la sangre humana

descomponiéndose en ácido 3-hidroxibutírico, por lo cual es altamente biocompatible y no tóxico (Reusch *et al.*, 1992).

Figura 1. . Estructura del polihidroxibutirato (PHB)



La producción a escala industrial del PHB inició en la década de los 60's en Estados Unidos (Chanprateep, 2010); y actualmente se ha extendido a Europa, Sur América y Asia. En la Tabla 1 se presentan algunas de las empresas que actualmente producen PHB, el microorganismo que lo biosintetiza y la fuente de carbono que se utiliza.

Tabla 1. Principales empresas productoras de PHB

Empresa, País	Nombre comercial	Bacteria (Gram)	Sustrato	Periodo de operación
Biotechnology Co, Alemania	Biomer®	<i>Azohydromonas lata</i> (-)	Sacarosa	1994-presente
PHB Industrial S/A company, Brasil	Biocycle®	Bacteria del genero alcalígeno (-)	Azúcar de caña (Sacarosa)	1995-presente
Metabolix, Estados Unidos	Mirel™	<i>Cupriavidus necator</i> (-)	Glucosa de maíz	1992-presente
Bio-On, Italia	Minerv-PHATM	<i>Cupriavidus necator</i> (-)	Residuos de remolacha (sacarosa)	2007-presente

El precio del PHB depende de varios factores, entre ellos: el proceso de producción; el campo de aplicación; las propiedades físicas como pureza y peso molecular; la demanda; y las políticas ambientales presentes en el país de

producción y de venta. El precio del PHB se encuentra en un rango de 5 a 37 USD/kg, lo que lo hace de 5 a 37 veces más costoso que el polipropileno*.

La investigación sobre la producción de PHB se ha enfocado principalmente en reducir costos de producción e incrementar la productividad del proceso. Entre las estrategias para lograr estos objetivos se encuentran: utilizar como fuente de carbono residuos agro-industriales, buscar nuevas y eficientes cepas nativas, optimizar las condiciones de cultivo y realizar un modelo que permita describir y predecir el proceso de producción.

Puesto que el mayor obstáculo para alcanzar la viabilidad económica en la producción de PHB es el costo de la fuente de carbono (Choi & Lee, 1999), en los últimos años se ha investigado el uso de residuos agro-industriales tales como melaza de caña de azúcar (Gouda *et al.*, 2001), jarabe de dátil (Omar *et al.*, 2001) y glicerol residuo de la industria de biodiesel (GRIB) (Cavalheiro *et al.*, 2009) como materias primas para su producción. Producir PHB a partir de corrientes residuales presenta beneficios económicos y ambientales, puesto que estos sustratos se transforman en un polímero biodegradable de alto valor agregado.

Actualmente, Colombia es uno de los principales productores de biodiesel en Latinoamérica con una producción de 518 kilotoneladas en el 2014 ("Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia,"). El principal subproducto de este biocombustible es el glicerol que corresponde aproximadamente al 10% en peso del biodiesel producido. Aunque el glicerol tiene gran aplicación en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica, el generado a partir de la Industria del

* El rango del precio del PHB se obtuvo por correos electrónicos con las empresas Biotechnology Co y PHB Industrial S/A. La información suministrada se encuentra en el Anexo A.

biodiesel ha creado un superávit, bajando su precio a nivel mundial, ofreciendo una fuente de carbono económica para transformaciones microbiológicas (Johnson & Taconi, 2007).

La capacidad de los microorganismos para aprovechar el GRIB como fuente de carbono depende de su composición. El proceso de transesterificación y la catálisis básica determinan que, entre los componentes presentes en el GRIB, se encuentren metanol, jabones, sales y agua (Asad-ur-Rehman *et al.*, 2008; K. Yong *et al.*, 2001; K. C. Yong *et al.*, 2001). Dependiendo de la concentración, estos compuestos pueden actuar como inhibidores o nutrientes para el microorganismo productor de PHB.

Como se observa en la Tabla 1, actualmente, la producción a escala industrial de PHB es liderada por bacterias Gram negativas como *Cupriavidus necator*^{*}, *Azohydromonas lata*^{**}, *Escherichia coli* recombinante y *Pseudomonas putida* (Chen, 2009). Estos microorganismos contienen en su membrana externa lipopolisacáridos (LPS), los cuales se coextraen junto con los PHA y causan fuertes reacciones inmunogénicas que impiden su aplicación en el campo biomédico. Por otra parte, las bacterias Gram positivas carecen de LPS, por lo tanto, son más aptas para la producción de PHA para aplicaciones biomédicas. En este grupo, sobresalen los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, siendo el género *Bacillus* mejor candidato para la producción de PHA debido a su mayor rendimiento, menores restricciones en las condiciones de fermentación, rápido crecimiento en sustratos económicos y tolerancia a altas temperaturas. Sin

^{*} *Cupriavidus necator* primero se conoció como *Alcaligenes eutropha*, posteriormente *Ralstonia eutropha*, seguido de *Wautersia eutropha* y actualmente como *C. necator*, que es el nombre utilizado en todo el documento para citar los trabajos realizados con esta bacteria.

^{**} Previamente llamado *Alcaligenes latus*.

embargo, es necesario evitar la esporulación de este microorganismo, ya que en este proceso se consume el PHA acumulado (Valappil *et al.*, 2007).

Identificar cepas nativas con nula patogenicidad, rápido crecimiento y alta producción de PHB en sustratos no convencionales, constituyen una importante herramienta para incrementar la producción de PHB. Además, el uso de microorganismos nativos ofrece una diversidad de rutas metabólicas, mayor adaptación durante las condiciones de fermentación y disminuye el uso de antibióticos en comparación con los microorganismos genéticamente modificados.

Los procesos biotecnológicos de producción de PHB, se basan en el uso de cepas desarrolladas en países como Brasil, Estados Unidos, Alemania e Italia. Por esta razón, para Colombia es pertinente desarrollar el proceso productivo de PHB a partir de microorganismos nativos Gram positivos del género *Bacillus* utilizando GRIB como fuente de carbono; constituyéndose este en el objetivo principal de la presente tesis doctoral.

Para el desarrollo de este objetivo principal se plantearon tres objetivos específicos así: identificar y seleccionar un microorganismo del género *Bacillus* con capacidad de producir PHB utilizando GRIB; seleccionar las condiciones fisicoquímicas y nutricionales que favorezcan la producción de PHB en el microorganismo nativo y; plantear un modelo que describa la producción de PHB a nivel de laboratorio. El desarrollo de cada objetivo específico constituye un capítulo del presente documento.

En el capítulo uno, se presenta el aislamiento, identificación y selección de cepas nativas de *Bacillus* con la capacidad de producir PHB utilizando GRIB como única

fuentes de carbono. Adicionalmente, se presentan y discuten los resultados de la caracterización del GRIB utilizado en este trabajo.

En el capítulo dos, se describen los diseños de experimentos empleados para la optimización del proceso de producción de PHB por una cepa nativa de *Bacillus* utilizando GRIB como fuente de carbono. Primero se realizó un diseño de Plackett - Burman para seleccionar las variables con mayor influencia en el proceso y después se empleó un diseño central compuesto para hallar los valores óptimos de las variables seleccionadas.

Los procesos que involucran sustratos tipo residuos industriales, pueden ser descritos mediante modelos matemáticos, basados en resultados experimentales. Estos modelos pueden ser empleados para describir, predecir, optimizar y controlar diferentes técnicas de cultivos. Así mismo, son la base para el estudio y diseño del escalamiento de un bioproceso (Koller *et al.*, 2006). Por consiguiente, en el capítulo tres se desarrolla un modelo matemático que describe la producción de PHB por una cepa nativa de *Bacillus* utilizando GRIB como fuente de carbono. Los parámetros del modelo, se estimaron utilizando datos experimentales obtenidos de fermentaciones en un biorreactor de 7.5 litros en operaciones *batch* y *fed-batch*.

La ejecución de esta tesis doctoral permitió la identificación de una cepa nativa de *Bacillus megaterium*, con capacidad de producir PHB utilizando GRIB como única fuente de carbono. Realizando el proceso de producción de PHB en un biorreactor de 7.5 L en operación *fed-batch*, fue posible alcanzar una acumulación del 31.38% de polímero en la célula y una productividad de 0.147 g/(L*h), siendo estos valores comparables con otras investigaciones similares. El modelo matemático propuesto permite una adecuada descripción de la producción de PHB a partir de GRIB

colombiano y se constituye como una valiosa herramienta para el escalado industrial del proceso.

REFERENCIAS

Asad-ur-Rehman, Wijesekara, S., Nomu, N., Sato, S., & Matsumura, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. En *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2008. vol. 83, p. 1072-1080.

Bonartsev, A. P., Myshkina, V. L., Nikolaeva, D. A., Furina, E. K., Makhina, T. A., Livshits, V. A., Boskhomdzhiyev, A. P., Ivanov, E. A., Iordanskii, A. L., & Bonartseva, G. A. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. En A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007. Vol. 1, pp. 295-307.

Cavalheiro, J. M. B. T., de Almeida, M. C. M. D., Grandfils, C., & da Fonseca, M. M. R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. En *Process Biochem*. 2009. vol. 44, p. 509-515.

Crank, M., Patel, M., Marscheider-Weidemann, F., Schleich, J., Hüsing, B., & Angerer, G. Techno-economic feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe. In O. Wolf (Ed.), *Technical Report Series*. Spain: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Prospective Technological Studies. 2005.

Chanprateep, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. En *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010. vol. 110 (no. 6), p. 621-632.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>

Chen, G.-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. En *Chem. Soc. Rev.* 2009. vol. 38, p. 2434-2446.

Choi, J., & Lee, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. En *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. vol. 51, p. 13-21.

Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia.

<http://www.fedebiocombustibles.com> (Revisado 06/04/2015)

Gouda, M. K., Swellam, A. E., & Omar, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. En *Microbiol. Res.* 2001. p. 201-207.

Johnson , D. T., & Taconi, K. A. The Glycerin Glut: Options for the Value-Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiesel Production. En *Environmental Progress*. 2007. vol. 26, p. 338-348.

Koller, M., Horvat, P., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlic, A., & Braunegg, G. Assessment of formal and low structured kinetic modeling of polyhydroxyalkanoate synthesis from complex substrates. En *Bioprocess Biosyst Eng.* 2006. vol. 29, p. 367-377.

Lemoigne, M. Products of dehydration and of polymerization of b-hydroxybutyric acid. En *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique*. 1926. vol. 8, p. 770-782.

Madison, L. L., & Huisman, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. En *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. vol. 63, p. 21-53.

Ni, J., & Wang, M. In vitro evaluation of hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composite. En *Materials Science and Engineering: C*. 2002. vol. 20(no. 1–2), p. 101-109.
doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00019-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00019-X)

Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., Voß, I., & Steinbüchel, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. En *Biotechnol. Lett.* 2001. vol. 23, p. 1119-1123.

Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, & Kalia, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. En *Bioresour. Technol.* 2003. vol. 87, p. 137-146.

Reusch, R. N., Sparrow, A. W., & Gardiner, J. Transport of poly- β -hydroxybutyrate in human plasma. En *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992. vol. 1123, p. 33-40.

Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., Puzyr, A. P., Mogilnaya, O. A., & Efremov, S. N. Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures. En *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004. vol. 15(no. 6), p. 719-728.
doi: 10.1023/B:JMSM.0000030215.49991.0d

Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. En *Prog. Polym. Sci.* 2000. vol. 25, p. 1503-1555.

Valappil, S., Boccaccini, A., Bucke, C., & Roy, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. En *Antonie van Leeuwenhoek*. 2007. vol. 91, p. 1-17.

Yong, K., Ooi, T. L., Dzulkefly, K., Wan Yunus, W. M. Z., & Hazimah, A. H. Characterization of Glycerol Residue From a Palm Kernel Oil Methyl Ester Plant. En *Journal of Oil Palm Research*. 2001. vol. 13, p. 1-6.

Yong, K. C., Ooi, T. L., Dzulkefly, K., Wan Yunus, W. M. Z., & Hazimah, A. H. Refining of crude glycerine recovered from glycerol residue by simple vacuum distillation. En *Journal of Oil Palm Research*. 2001. vol. 13, p. 39-44.

CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE UN MICROORGANISMO NATIVO DEL GÉNERO *Bacillus* CON CAPACIDAD PARA PRODUCIR PHB UTILIZANDO GRIB

RESUMEN

Los polihidroxicanoatos (PHA) son termoplásticos biodegradables, no tóxicos y biocompatibles que pueden ser producidos por múltiples microorganismos y diversas fuentes de carbono. El polihidroxibutirato (PHB) es el integrante más conocido de esta familia y el pionero en las aplicaciones comerciales y biomédicas de los PHA. La producción industrial de PHB está limitada por su viabilidad económica, siendo la fuente de carbono uno de los costos más significativos. El glicerol residuo de la industria del biodiesel (GRIB) es un sustrato atractivo para la producción de estos biopolímeros, ya que de esta forma se ayuda a la viabilidad económica de dos industrias. Entre los géneros bacterianos con capacidad para producir el PHB, sobresale el género *Bacillus* debido a su alta productividad, menores restricciones en las condiciones de fermentación, rápido crecimiento en sustratos económicos y tolerancia a altas temperaturas. Este género no posee lipopolisacáridos en su membrana (LPS), los cuales se coextraen con el PHB y causan reacciones inmunogénicas en aplicaciones biomédicas.

En este capítulo se presentan los resultados del primer objetivo de la presente tesis doctoral: “identificar y seleccionar un microorganismo nativo del género *Bacillus* con capacidad de producir PHB utilizando GRIB”. A partir del procesamiento de diferentes matrices ambientales, incluyendo el GRIB, se aislaron 15 cepas, de las cuales de acuerdo con la coloración lipofílica de Sudán negro, tres (B1, B2 y B8), identificadas por pruebas bioquímicas y moleculares como *B. megaterium*, tienen potencial como productoras de PHB utilizando GRIB. Las tres cepas, junto con el microorganismo de referencia *Bacillus megaterium*

ATCC14581, fueron sometidas a un proceso de adaptación al GRIB. *B. megaterium* B2 produjo más PHB que *B. megaterium* B1, *B. megaterium* B8 y *B. megaterium* ATCC14581 (0.37 ± 0.04 g/L, 0.04 ± 0.003 g/L, 0.27 ± 0.001 g/L y 0.32 ± 0.03 g/L a las 18 horas de fermentación respectivamente); y alcanzó su máxima productividad a las 14 horas de fermentación ($0.021 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$).

1.1. INTRODUCCIÓN

Colombia ha incentivado la generación y consumo de biocombustibles en los últimos años. Como consecuencia, actualmente el país cuenta con seis plantas productoras de biodiesel en operación (Tabla 2), las cuales cubren la demanda interna correspondiente a mezclas de biodiesel en diésel del 2% al 10%.

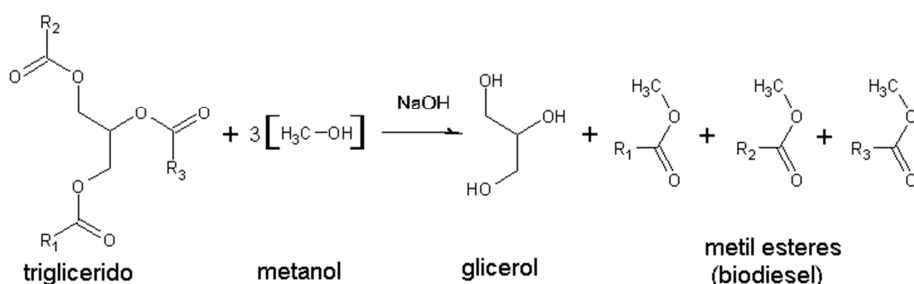
Tabla 2. Plantas productoras de Biodiesel en Colombia

Nombre de la Planta	Ubicación	Capacidad t/año
Aceites Manuelita	San Carlos de Guaroa (Meta)	120.000
Biocastilla	Castilla la Grande (Meta)	15.000
Biocombustibles sostenibles del Caribe	Santa Marta (Magdalena)	100.000
Bio D	Facatativá (Cundinamarca)	120.000
Ecodiesel	Barrancabermeja (Santander)	120.000
Oleoflores	Codazzi (Cesar)	60.000
TOTAL		535.000

Fuente: ("Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia,")

El biodiesel se obtiene por reacciones de transesterificación de los glicéridos de los aceites vegetales o las grasas animales con un alcohol, comúnmente metanol, utilizando un catalizador, usualmente una sal básica como hidróxido de sodio o potasio (Figura 2). Este proceso, genera un 10% (p/p) de glicerol como subproducto (da Silva *et al.*, 2009).

Figura 2. Reacción de transesterificación para la producción de biodiesel.



El glicerol puro es usado en la manufactura de productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos. Sin embargo, el glicerol residuo de la industria del biodiesel (GRIB) contiene impurezas como metanol, sales, metales, jabones y agua (Hájek & Skopal, 2010). Como se observa en la Tabla 3, la proporción de las impurezas en el GRIB es muy variable; depende de la materia prima (aceite vegetal o grasa), el catalizador utilizado en el proceso de transesterificación y el proceso de separación y purificación del biodiesel.

Tabla 3. Composición del GRIB en distintos países

País (Autor)		Japón (Asad-ur-Rehman <i>et al.</i> , 2008)	Francia (Papanikolaou <i>et al.</i> , 2008)	Corea del Sur (Moon <i>et al.</i> , 2010)		Tailandia (Manosak <i>et al.</i> , 2011)
Materia prima		Aceite de girasol	-	Aceite de soya	Residuos de aceite vegetal	Residuos de aceite vegetal
Catalizador		NaOH	Alcalino	Alcalino	Alcalino	Alcalino
pH		12.5	-	-	-	9.08
% Glicerol		30	65	75.56	63.7	36.7
% Humedad		2	26	12.6	0.07	14.7
% Cenizas		2-3	4-5	3.93	2.27	4.31
MONG	% Metanol	50	3	0.2	2.66	44.0
	% Jabones	13	0.5	7.91	33.96	
	% OMO	2-3				

MONG: materia orgánica no glicerol; OMO: otra materia orgánica

Las plantas productoras de biodiesel refinan el glicerol para venderlo a otras industrias, no obstante, estos pretratamientos son costosos. Por lo tanto, es importante encontrar alternativas para la utilización del GRIB, sin ningún o con los menores pretratamientos posibles. Una alternativa es su uso directo como alimento para cerdos y aves de corral (Hansen *et al.*, 2009), aunque es necesario mezclarlo con precaución debido al contenido de metanol, el cual es altamente tóxico. Otra alternativa es transformarlo en un producto de mayor valor.

Existen dos tipos de alternativas para la transformación del GRIB en productos de mayor valor agregado: procesos químicos y procesos microbiológicos; cada proceso tiene sus pros y contras. Los procesos químicos presentan baja especificidad del producto, requieren del uso de alta presión y temperatura, y no se pueden aplicar con glicerol impuro (Johnson & Taconi, 2007).

Los procesos microbiológicos, además de no tener las desventajas anteriormente citadas, aprovechan la capacidad que tienen algunos organismos de utilizar el glicerol como fuente de carbono para producir sustancias de interés industrial a través de diversas rutas metabólicas. Utilizar glicerol en procesos de fermentación, presenta en algunos casos mayores ventajas que el uso de glucosa (da Silva *et al.*, 2009; Johnson & Taconi, 2007).

Entre la gran variedad de productos obtenidos en las transformaciones microbiológicas del glicerol, sobresalen como metabolitos extracelulares: alcoholes y ácidos de bajo peso molecular como el butanol y 1,3- propanodiol producidos por *Clostridium pasterianum* (Biebl, 2001) y el ácido cítrico producido por *Yarrowia lipolytica* (Papanikolaou *et al.*, 2002). Como producto intracelular se destaca la acumulación de polihidroxialcanoatos (PHA) (Vishnuvardhan Reddy *et al.*, 2009). Estos polímeros son de interés industrial gracias a sus propiedades

termoplásticas, de biodegradabilidad, de no toxicidad y biocompatibilidad. Su peso molecular está en el rango de 50.000 a 1.000.000 Da, y pueden ser empleados en la fabricación de envases, productos desechables, medicinas, suplementos alimenticios y en aplicaciones biomédicas. Se han identificado aproximadamente 150 PHAs, siendo el polihidroxibutirato (PHB) el integrante más conocido de esta familia por su aplicabilidad comercial y biomédica (Chee *et al.*, 2010; Koller *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 2003). Los PHA son poliésteres sintetizados y acumulados intracelularmente en forma de gránulos por más de 90 géneros bacterianos. Su función dentro de la célula es la de reserva de alimento y energía para situaciones de escasez de nutrientes. Los gránulos están cubiertos por una monocapa de fosfolípidos y proteínas, por esta razón es posible determinar la presencia de PHA en las células con coloraciones lipídicas como el Sudán negro (Madison & Huisman, 1999; Zinn *et al.*, 2001).

En la literatura se reportan una gran cantidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas con la capacidad de producir PHA; sin embargo, solo algunas especies han sido empleadas en su biosíntesis, entre ellas están: *Cupriavidus necator* (Daneshi *et al.*, 2010; Franz *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2010), *Bacillus megaterium* (Faccin *et al.*, 2009; Naranjo *et al.*, 2013; Vishnuvardhan Reddy *et al.*, 2009), *Azohydromonas lata* (Penloglou *et al.*, 2012), *Pseudomonas putida* (Annuar *et al.*, 2008; Escapa *et al.*, 2013; Wampfler *et al.*, 2010) y cepas de *Escherichia coli* modificadas genéticamente (Lo *et al.*, 2011; Nikel *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013).

Las bacterias productoras de PHA pueden ser clasificadas en dos grupos de acuerdo con las condiciones de cultivo necesarias para la síntesis del polímero. En el primer grupo están las bacterias que acumulan el polímero exclusivamente en la fase estacionaria cuando se limita un nutriente esencial como N, P, Mg, K, O, S, como es el caso de *Cupriavidus necator* y *Pseudomonas putida*. En el segundo grupo se encuentran las bacterias que pueden acumular el PHA durante el

crecimiento. Algunos microorganismos pertenecientes a este grupo son *Escherichia coli* modificada genéticamente, *Azohydromonas lata* y *Bacillus megaterium* (Choi & Lee, 1999; Kessler *et al.*, 2001; Lee, 1996).

El tamaño del monómero del PHA producido depende de la fuente de carbono utilizada, por lo tanto, siendo el glicerol una molécula pequeña, el PHA que sintetizará será el PHB (ver Figura 1)(Reddy *et al.*, 2003).

Muchos autores coinciden en afirmar que el mayor obstáculo para alcanzar la viabilidad económica en la producción de PHB es el costo de la fuente de carbono (Choi & Lee, 1999); por esta razón, en los últimos años se ha investigado ampliamente sobre el uso de residuos agro-industriales como materias primas para su producción (Tabla 4).

Los residuos agroindustriales (Tabla 4) permiten alcanzar acumulaciones y productividades de PHB similares o incluso mayores a las obtenidas con fuentes de carbono convencionales como sacarosa, glucosa y fructosa (Faccin *et al.*, 2009; Khanna & Srivastava, 2005; Wei *et al.*, 2011)

Un factor importante cuando se trabaja con GRIB, es la presencia de sales derivadas del catalizador, usualmente NaCl. Estas sales, dependiendo de su concentración pueden inhibir el crecimiento celular y la producción de PHB. De acuerdo al estudio realizado por (Mothes *et al.*, 2007) con *Cupriavidus necator* JMP 134 si la concentración de NaCl en el medio supera un valor de 5 g/L el contenido de PHB dentro de la célula disminuye y cuando la concentración de NaCl alcanza un valor de 20 g/L, la acumulación de PHB se reduce en un 80% comparado con el máximo valor posible. En el estudio realizado por (Cavalheiro *et*

al., 2009) con *Cupriavidus necator* DSM 545 utilizando GRIB con un 3% p/p de sodio la producción de PHB disminuyó en un 50% con respecto a los resultados obtenidos con glicerol puro. Por lo anterior, es indispensable caracterizar el glicerol, con el fin de formular adecuadamente el medio de fermentación más apto para la producción de PHB.

Tabla 4. Producción de PHB utilizando residuos agro-industriales como fuente de carbono

País (Autor)	Fuente de carbono	Microorganismo/ Tipo (Gram)	PHB (g/L)	%Y _{P/X} (g/g)	q (g/(L*h))
España (Cerrone <i>et al.</i> , 2010)	Residuos de aceite de oliva	<i>Azotobacter chroococcum</i> / nativo de suelo (-)	0.74	31.0	0.01
Portugal (Cavalheiro <i>et al.</i> , 2009)	GRIB	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545 (-)	26.14	38.0	0.84
Alemania (Ibrahim & Steinbüchel, 2009)	GRIB	<i>Zobellella denitrificans</i> / nativo de lodos (-)	2.72	73.5	0.03
Alemania (Mothes <i>et al.</i> , 2007)	GRIB	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 4058 (-)	24.00	48.0	0.48
Egipto (Gouda <i>et al.</i> , 2001)	Melaza de caña	<i>Bacillus megaterium</i> / nativo de PTAR (+)	2.20	59.4	0.05
Egipto (Omar <i>et al.</i> , 2001)	Jarabe de dátil	<i>Bacillus megaterium</i> / nativo de PTAR (+)	3.40	25.0	0.24
China (Wu <i>et al.</i> , 2001)	Melaza de caña	<i>Bacillus sp.</i> / nativo de suelo (+)	24.50	35.0	0.82

+: Microorganismo Gram positivo

-: Microorganismo Gram negativo

Y_{P/X}: Rendimiento de producto con respecto a la biomasa

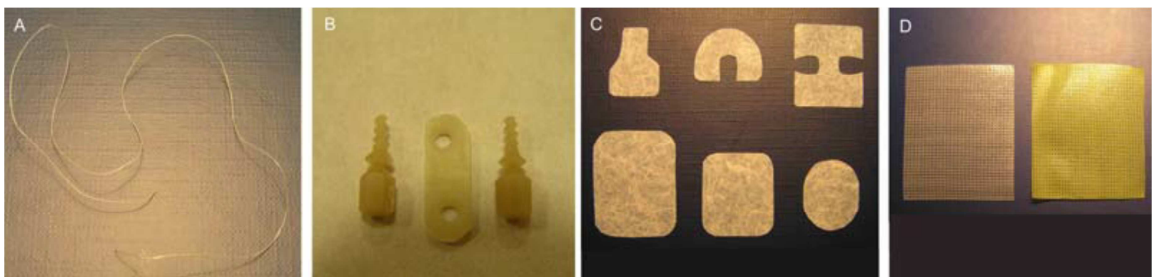
q: Productividad volumétrica

Por otra parte, estudios realizados en los últimos años para la producción de PHB (Tabla 4) permiten concluir que los microorganismos nativos pueden tener rendimientos similares o incluso mayores que los presentados por las cepas de referencia. El uso de microorganismos nativos ofrece una diversidad de rutas metabólicas, mayor adaptación durante las condiciones de fermentación y

disminuye el uso de antibióticos en comparación con los microorganismos genéticamente modificados. Es posible encontrar microorganismo nativos con la capacidad de producir PHB en diversos ambientes acuáticos y terrestres (Tabla 4) como agua de río, agua de lago, agua de mar, lodos de planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y suelos (Koller *et al.*, 2011).

Una de las principales áreas de aplicación del PHB es en la industria biomédica, donde se ha utilizado para fabricar suturas quirúrgicas bioabsorbibles (Figura 3A), tornillos y placas para reparaciones óseas (Figura 3B), membranas biodegradables para el tratamiento periodontal (Figura 3C) y mallas quirúrgicas recubiertas de PHB para cirugías de hernias (Figura 3D) (Bonartsev *et al.*, 2007).

Figura 3. Dispositivos médicos realizados con PHB. (A) suturas quirúrgicas bioabsorbibles; (B) tornillos y placas para reparaciones óseas; (C) membranas biodegradables para el tratamiento periodontal; (D) mallas quirúrgicas recubiertas de PHB para cirugías de hernias



Fuente: (Bonartsev *et al.*, 2007)

Como se observa en la Tabla 1 y la Tabla 4, actualmente, la producción de PHB es liderada por bacterias Gram negativas. Estos microorganismos contienen en su membrana externa lipopolisacáridos (LPS), los cuales se coextraen con los PHA y causan fuertes reacciones inmunogénicas. Las bacterias Gram positivas carecen de LPS, por lo tanto, son mejores fuentes de PHA para aplicaciones biomédicas (Valappil *et al.*, 2007).

Entre los géneros de bacterias Gram positivas con la capacidad de producir PHB se encuentran *Bacillus*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Nocardia* y *Staphylococcus*. El género *Bacillus* se considera el mejor candidato para la producción de PHB; debido a su mayor productividad, menores restricciones en las condiciones de fermentación, rápido crecimiento en sustratos económicos y tolerancia a altas temperaturas. Cuando se trabaja con este género, es necesario tener en cuenta que la máxima cantidad de PHB se acumula justo antes de la formación de esporas y se consume en el proceso de esporulación (Valappil *et al.*, 2007).

La ruta metabólica para la producción de PHB en el género *Bacillus* comprende cinco etapas e involucra tres enzimas (Kumar *et al.*, 2013; Valappil *et al.*, 2007): a) Catabolismo de la fuente de carbono a piruvato; b) Conversión del piruvato en dos moléculas de Acetil Coenzima A (Ac-CoA); c) Condensación de dos moléculas de Ac-CoA en acetoacetil-CoA catalizado por la enzima β -ketotiolasa (codificada por el gen *phaA*); d) Reducción de acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA por acción de la enzima acetoacetil-CoA reductasa (codificada por el gen *phaB*); finalmente e) Polimerización del monómero 3-hidroxibutiril-CoA a PHB por la enzima PHA sintasa (codificada por el gen *phaC*).

Como se presenta en la tabla 5, los microorganismos del género *Bacillus* con capacidad de producir PHB se encuentran en diversos ambientes, entre los que sobresalen el suelo y las PTAR. Este género puede aprovechar diferentes fuentes de carbono, desde azúcares de fácil asimilación como la sacarosa, glucosa y maltosa, hasta residuos industriales como el GRIB y las melazas.

El corto tiempo de cultivo necesario para la producción de PHB por el Género *Bacillus* (Tabla 5) se debe a su rápido crecimiento en comparación con otros microorganismos como *Cupriavidus necator*, en el que los tiempos de fermentación requeridos están entre 70 y 120 horas (Daneshi *et al.*, 2010; Mothes *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010).

Tabla 5. Producción de PHB por *Bacillus* nativos utilizando matraces

Autor	<i>Bacillus</i>	Fuente de aislamiento	Fuente de carbono	t. f. (horas)	PHB (g/L)	%Y _{P/X} (g/g)	q (g*L/h)
(Bhagowati <i>et al.</i> , 2015)	<i>B. cereus</i> SE-1	Basura orgánica	Maltosa	72	5,63	40,0	0,0782
(Dhangdhariya <i>et al.</i> , 2015)	<i>B. megaterium</i> JK4h	Agua de mar	Glucosa	24	0,34	56,8	0,0142
(Israni & Shivakumar, 2015)	<i>Bacillus</i> sp. Ti3	Suelo	Glucosa	24	0,60	44,1	0,0250
(Kumar <i>et al.</i> , 2015)	<i>B. thuringiensis</i> EGU45	PTAR	GRIB	48	1,37	47,0	0,0284
(Bora, 2013)	<i>B. megaterium</i>	Suelo	Glucosa	48	1,38	49,0	0,0288
(Rodriguez-Contreras <i>et al.</i> , 2013)	<i>B. megaterium</i> uyuni S29	Agua de lago	Glucosa	48	1,30	31,0	0,0271
(Narayanan & Ramana, 2012)	<i>B. mycoides</i> DFC1	Suelo	Glucosa	72	3,32	76,3	0,0461
(Sangkharak & Prasertsan, 2012)	<i>B. subtilis</i> PHA012	Residuos de pepinillos	Glicerol	96	0,35	18,9	0,0036
(Verma <i>et al.</i> , 2011)	<i>Bacillus</i> SLD110	Suelo	Melaza de caña	48	0,34	64,2	0,0071
(Thirumala <i>et al.</i> , 2010)	<i>Bacillus</i> spp. 871	Suelo	Glucosa	32	1,90	70,0	0,0594
(Kaynar & Beyatli, 2009)	<i>B. lentus</i> P18	Pescado	Extracto de carne	48	0,15	23,4	0,0031
(Kulpreecha <i>et al.</i> , 2009)	<i>B. megaterium</i> BA019	Suelo	Melaza de caña	36	3,91	55,5	0,1086
(Pal <i>et al.</i> , 2009)	<i>B. thuringiensis</i> IAM12077	Suelo	Glucosa	28	1,20	43,4	0,0429
(Somashekara <i>et al.</i> , 2009)	<i>B. flexus</i>	Suelo	Sacarosa	36	1,30	46,4	0,0361
(Rohini <i>et al.</i> , 2006)	<i>B. thuringiensis</i> R1	Suelo	Glicerol	72	3,90	64,0	0,0542
(Aslim <i>et al.</i> , 2002)	<i>B. megaterium</i> Y6	Suelo	Glucosa	48	0,21	48,1	0,0043
(Gouda <i>et al.</i> , 2001)	<i>B. megaterium</i>	PTAR	Melaza de caña	48	0,69	46,3	0,0145
(Omar <i>et al.</i> , 2001)	<i>B. megaterium</i>	PTAR	Melaza de remolacha	48	1,85	50,0	0,0385

t. f. : tiempo de fermentación

Y_{P/X}: Rendimiento de producto con respecto a la biomasa

q: Productividad volumétrica

En la tabla 5, se presenta la producción y acumulación intracelular de PHB por diversas especies del género *Bacillus* utilizando matraces. La concentración y Y_{P/X} de PHB alcanzado, dependen de la especie evaluada, la fuente de carbono y las

condiciones de fermentación. Entre las especies más estudiadas se encuentran *B. megaterium* y *B. thuringiensis*. Los máximos rendimientos reportados han sido alcanzados con glucosa por *B. mycoides* DFC1 y *Bacillus* spp. 871.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Caracterización del GRIB. El GRIB utilizado en este trabajo 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 aguas de lavado del biodiesel para disminuir la viscosidad. Las muestras de GRIB fueron recolectadas en recipientes de vidrio color ámbar y almacenadas a 4°C. El GRIB fue caracterizado de acuerdo con los parámetros presentados en la Tabla 6. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Tabla 6. Métodos y equipos utilizados en la caracterización del GRIB

Parámetro Fisicoquímico		Método/Equipo	Norma/Referencia
pH		pH metro	
Densidad		Picnómetro	
% Glicerol		HPLC-RI	Descrito en la sección 1.2.8
% Humedad		Titulación Karl Fischer	ISO 662:1998
% Cenizas		Calcinación	(Manosak <i>et al.</i> , 2011)
MONG	% Metanol	HPLC-RI	Descrito en la sección 1.2.8
	% Jabones	Titulación colorimétrica	AOCS Cc 17-79 modificado (Van Gerpen <i>et al.</i> , 2004)
	% OMO	Balance de masa	

MONG: Materia orgánica no glicerol

OMO: Otra materia orgánica

1.2.2. Muestreo y aislamiento de bacterias del género *Bacillus*. Se recolectaron muestras de cinco fuentes diferentes: sal de mar, lodos de PTAR, GRIB, suelo de un jardín de la UIS y agua estancada de una fuente de la UIS. Un gramo o un mililitro de cada muestra se suspendió en 9mL de solución peptonada estéril (0.1% p/v) y se homogeneizó en un agitador orbital (Unimax 1010) a 200 rpm durante dos horas. Después, las muestras se sometieron a un choque térmico de 60°C durante una hora para destruir las células, asegurando la obtención de únicamente microorganismos esporulados. A continuación 1 mL de cada muestra se sembró en agar nutritivo y se incubó a 37°C durante 24 horas (Yilmaz *et al.*, 2005).

Con el fin de lograr cultivos axénicos, en las cajas en las que se observó el crecimiento de más de un tipo de microorganismo se realizó un aislamiento en agar nutritivo de cada morfología. Para verificar que las cepas aisladas pertenecieran al género *Bacillus*, a cada microorganismo aislado se le realizaron las coloraciones Gram y verde malaquita.

1.2.3. Identificación de *Bacillus* productores de PHB. *Bacillus megaterium* ATCC 14581, fue utilizado como el microorganismo de referencia debido a su habilidad para producir PHB en distintas fuentes de carbono como: rafinosa, xilosa y maltosa (Full *et al.*, 2006). Las cepas de *Bacillus* aisladas y *B. megaterium* ATCC 14581 se incubaron a 37°C durante 48 horas, en un medio de sales sólido de composición: 15 g/L agar, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L ácido cítrico, 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/L MOPS y 11 g/L glicerol (en términos de glicerol puro). El medio fue suplementado con 1 mL de solución de elementos traza que contiene: 20 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g/L H_3BO_4 , 0.01 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Faccin *et al.*, 2009).

Con el fin de identificar los microorganismos que producen la mayor cantidad de gránulos de PHB, se llevó a cabo la coloración lipofílica Sudán negro (Budde, 2010). Para realizar esta coloración, se fijaron por calor los microorganismos en una lámina, se agregó una solución al 0.3% p/v de Sudán negro durante 10 minutos, se enjuagó con agua y se agregó una solución al 0.5% p/v de Safranina durante 5 segundos. Finalmente, las muestras se observaron bajo microscopio óptico (Singh & Parmar, 2011).

1.2.4. Caracterización bioquímica de *Bacillus* productores de PHB. Las cepas de *Bacillus* que de acuerdo con la coloración de Sudán negro acumulan mayor cantidad de gránulos de PHB, fueron caracterizadas utilizando el kit API (*Analytical Profile Index*) 50CHB (BioMérieux S.A). Cada una de las cepas seleccionadas se ajustó a la escala 2 de McFarland en 10 mL del medio 50CHB, y un volumen de 100 µL fue transferido a cada uno de los 50 pozos del panel API 50CHB. Los paneles fueron incubados durante 24 horas a 37°C y los resultados fueron analizados utilizando el software Apiweb (versión 4.0; BioMérieux S.A). Los resultados de la caracterización bioquímica fueron corroborados por la secuenciación del fragmento 16S rRNA en la corporación CORPOGEN.

1.2.5. Adaptación de *Bacillus* productores de PHB al GRIB. Las cepas seleccionadas y *Bacillus megaterium* ATCC 14581 fueron inoculadas e incubadas a 37°C en agar nutritivo modificado de composición: 15 g/L agar, 15 g/L peptona, 3 g/L extracto de levadura, 6 g/L NaCl y 9 g/L glicerol. Después de 24 horas, una colonia de cada cepa fue transferida a un matraz con 50 mL de medio nutritivo modificado (igual composición sin agar). Los matraces fueron incubados a 37°C en un agitador orbital (Unimax 1010) a 200 rpm durante 24 horas. Este procedimiento se realizó tres veces para asegurar una adecuada adaptación al GRIB (Cavalheiro *et al.*, 2009). Finalmente, las cepas de *Bacillus* adaptadas fueron criopreservadas en el sistema cryobank (Copan Diagnostics Inc.) y almacenadas a -70°C para su posterior uso.

1.2.6. Producción de PHB por las cepas de *Bacillus* seleccionadas. Las cepas de *Bacillus* adaptadas fueron inoculadas en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de sales con igual composición, sin agar, a la descrita en la sección 1.2.3 de este documento. Los matraces se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Unimax 1010) a 200 rpm durante 28 horas. Se tomaron muestras a las horas 0, 4, 8, 14, 18, 24 y 28 para determinar pH, la producción de biomasa y PHB, y el consumo de glicerol. La cepa con la mayor producción de PHB se seleccionó para una posterior optimización de las condiciones de cultivo.

1.2.7. Análisis Estadístico. Los datos experimentales se evaluaron de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) empleando el software Statgraphics Centurion® (Versión 16.1.18, Statpoint Inc., Herndon, Virginia, USA), con un nivel de confianza de 95% ($P < 0.05$).

1.2.8. Métodos analíticos. Para determinar la biomasa se utilizó el método del peso seco, 15 mL de medio de cultivo se centrifugaron a 3420 $\times g$ en tubos cónicos previamente pesados durante 5 minutos, el *pellet* formado se secó a 80°C hasta peso constante. Un (1) mL del sobrenadante se filtró empleando membranas de fluoruro de polivinilo (PVDF) de 0.45 μm y se almacenó para la cuantificación de glicerol. El contenido de nitrógeno se determinó por el método de *Kjeldahl* AOAC 928.08 utilizando 10 mL de sobrenadante.

Para la determinación de PHB, 2 mL de medio de cultivo se centrifugaron a 3420 $\times g$ durante 5 minutos, el *pellet* se liofilizó durante 48 horas y posteriormente, se realizó una hidrólisis ácida con 1 mL de H₂SO₄ concentrado (98%) durante 20 minutos a 96°C con el fin de convertir el PHB en ácido crotónico. Las muestras se diluyeron 50 veces con una solución 0.005 M de H₂SO₄ y posteriormente, se filtraron empleando membranas de PVDF de 0.45 μm . Un estándar certificado de PHB (Sigma-Aldrich) fue procesado en paralelo (Karr *et al.*, 1983).

El contenido de PHB, glicerol y metanol fue determinado utilizando un cromatógrafo líquido (HPLC) Agilent Technologies Series 1100, equipado con una columna SUPELCOGEL™ C-610H. Para el análisis de PHB se empleó un detector de arreglo de diodos a 210 nm, mientras que para el análisis de glicerol y metanol se empleó un detector de índice de refracción (Agilent Technologies 1200). Las medidas en el HPLC fueron realizadas bajo un régimen isocrático utilizando como fase móvil una solución 0.005 M de H₂SO₄ a 0.7 mL/min, y volumen de inyección de 25 µL. La columna y el detector se mantuvieron a 60°C y 65°C, respectivamente. Se realizaron curvas de calibración externas de 6 puntos con estándares certificados para PHB, glicerol y metanol.

La identidad del PHB fue establecida por espectroscopia RMN en un espectrómetro de RMN Bruker Avance III 400 MHz a 27°C, con una secuencia de pulso zg30 y 512 scans. Se disolvió 1 mg de biomasa en 700 µL de cloroformo deuterado, la mezcla se sometió a ultrasonido durante una hora a 60°C hasta completa disolución del sólido. La identidad de la muestra fue confirmada utilizando el estándar de PHB (Sigma-Aldrich).

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1. Caracterización del GRIB. En la Tabla 7 se presenta la caracterización del GRIB reportada con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 7 Resultados de la caracterización del GRIB

Parámetro	Valor
pH	6.41 ± 0.12
Densidad (g/mL)	1.04 ± 0.01
Glicerol (% p/p)	47.42 ± 0.23
Humedad (% p/p)	45.42 ± 0.02
Cenizas (% p/p)	2.85 ± 0.25
Metanol (% p/p)	3.57 ± 0.05
Jabones (% p/p)	1.34 ± 0.17

Los principales componentes del GRIB caracterizado son el glicerol y el 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.

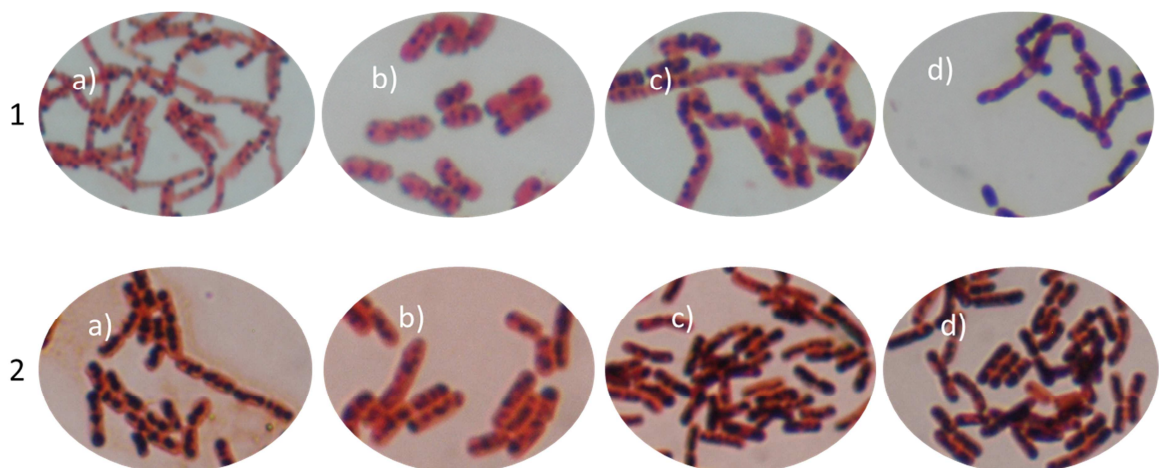
1.3.2. Aislamiento, identificación y caracterización de *Bacillus* productores de PHB. Fue posible aislar 15 cepas de *Bacillus*: cinco del GRIB (etiquetadas B1-B5); cinco del suelo (etiquetadas B6-B10); tres de lodos de PTAR (etiquetadas B11-B13); una del agua estancada (etiquetada B14) y una de la sal de mar (etiquetada B15). Cuando las células son teñidas por la tinción de Sudán negro, la monocapa de fosfolípidos que recubre el gránulo de PHB, interactúa con la molécula lipófila del colorante y los gránulos de polímero se distinguen fácilmente bajo el microscopio óptico como manchas de azul oscuro contra el citoplasma rosa (Figura 4). Solo tres de las 15 cepas aisladas, denominadas como B1, B2 y B8, junto con la cepa de referencia, producen una cantidad considerable de gránulos de polímero. A pesar de que *B. megaterium* ATCC 14581 es conocida por su capacidad de acumular PHB en diversos azúcares (Full *et al.*, 2006); este es el primer reporte (basándose en la literatura revisada hasta el momento) de su capacidad de acumular PHB utilizando GRIB.

Las cepas B1, B2 y B8 fueron identificadas como *B. megaterium* por la prueba API con un nivel de confianza superior al 95%, adicionalmente los resultados de la secuenciación del fragmento 16S rRNA (B1 1465 pb, B2 1392 pb, B8 1340 pb) confirman que las cepas pertenecen al género *Bacillus*. B2 y B8 presentan un 100% de homología con la secuencia 16 S rRNA de *Bacillus megaterium* (Anexo B).

1.3.3. Adaptación al GRIB de *Bacillus* productores de PHB. En algunos microorganismos, como *P. putida* utilizar glicerol como única fuente de carbono ocasiona alargamiento de la fase de adaptación (*Lag*) (Escapa *et al.*, 2013). La adaptación al glicerol es una herramienta utilizada para aumentar la asimilación de la fuente de carbono y de esta manera disminuir la fase *Lag*. Este proceso se ha implementado con éxito en cepas nativas de *C. necator* y *B. megaterium* (Cavalheiro *et al.*, 2009; Naranjo *et al.*, 2013).

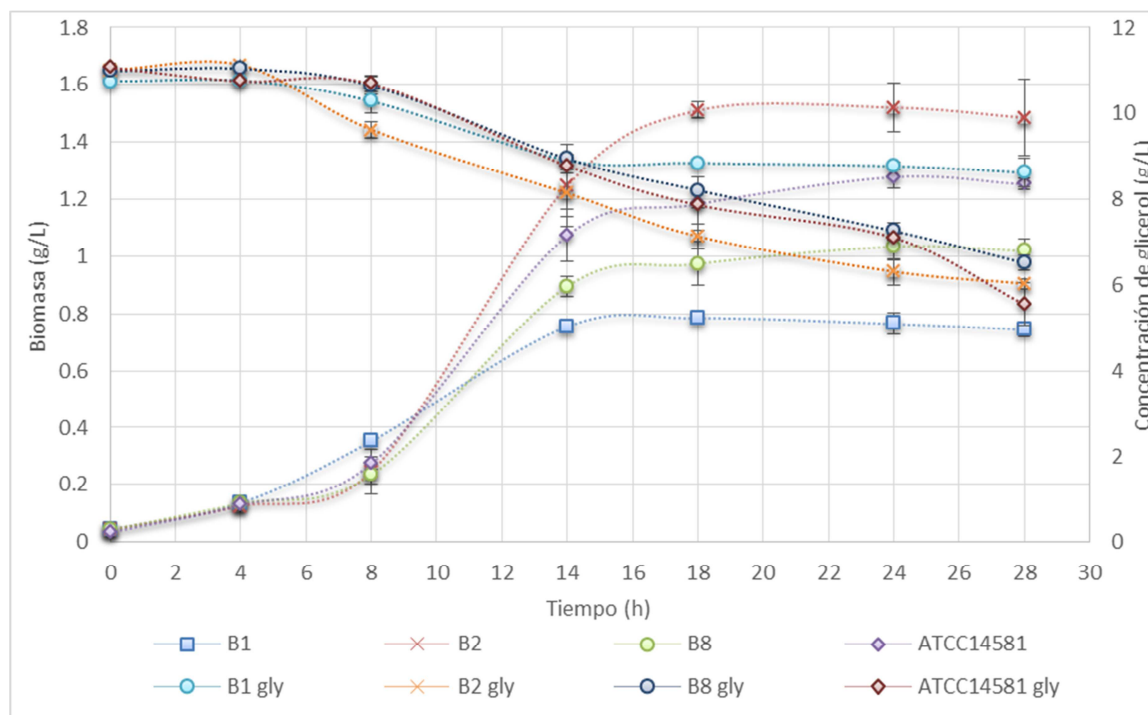
Como se observa en la Figura 4, gracias al proceso de adaptación, se incrementó significativamente el tamaño y el número de gránulos en las células de las cepas *B. megaterium* B1, B2, B8 y ATCC14581, indicando un aumento en la acumulación de PHB.

Figura 4. Células teñidas por la coloración de sudan negro. a) *B. megaterium* ATCC114581 b) *B. megaterium* B1 c) *B. megaterium* B2 d) *B. megaterium* B8. 1. Antes de la adaptación. 2. Después de la adaptación (microfotografías de campo claro, 100 X)



1.3.4. Producción del PHB. En la Figura 5 se observa la cinética de la producción de biomasa y consumo de glicerol por las cepas *B. megaterium* B1, B2, B8 y ATCC14581 durante 28 horas de fermentación. Inicialmente la curva presenta una fase *Lag* de 8 horas para todas las cepas. La duración de la fase *Lag* es comparable con los valores encontrados por otros investigadores para otras especies de *Bacillus* utilizando sustratos fácilmente asimilables: 4 h para *B. flexus* 112A (glucosa) (Thirumala *et al.*, 2010), 6 h para *B. flexus* (sacarosa) (Somashekara *et al.*, 2009) y 8 h para *B. mycoides* 87I (glucosa) (Thirumala *et al.*, 2010). El hecho de que las cepas aisladas tengan una fase *Lag* corta, se debe probablemente a la adaptación realizada, la cual mejoró la eficiencia de asimilación de esta fuente de carbono.

Figura 5. Producción de biomasa y concentración de glicerol por las cepas *B. megaterium* B1, B2, B8 y ATCC14581 durante 28 horas de fermentación en matraces de 250 mL



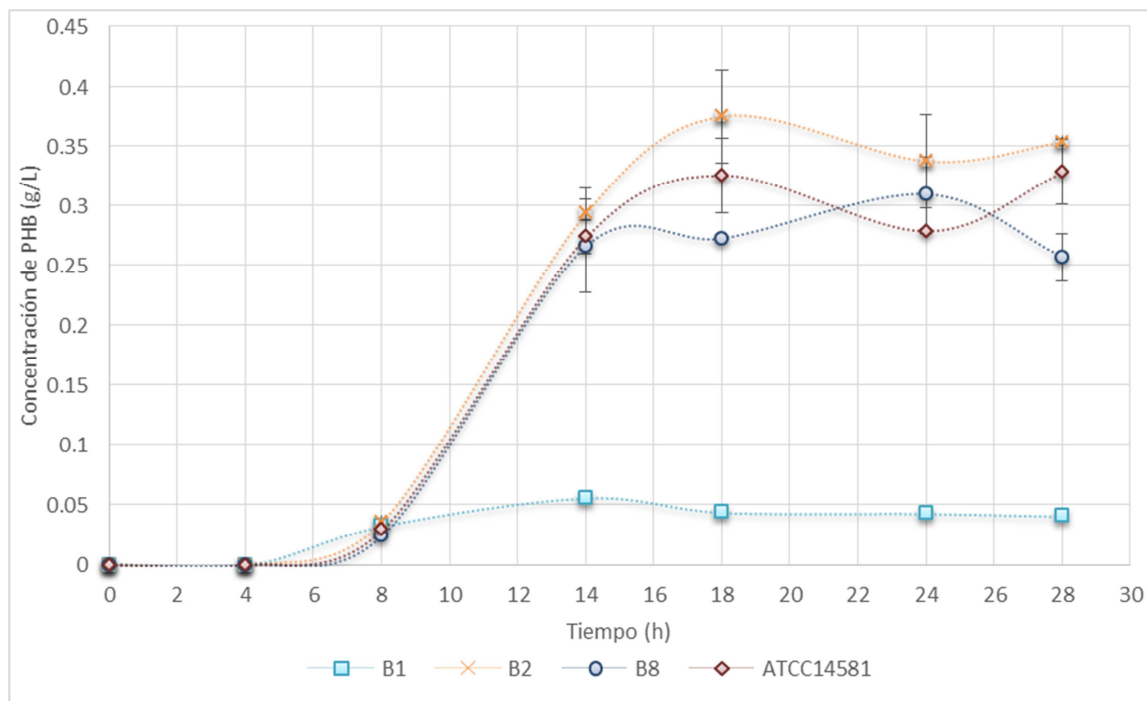
Después de la fase *Lag* inicia una fase exponencial de seis horas. De la hora 14 a la 18 se presenta la fase desacelerada seguida de la fase estacionaria. De acuerdo con el test de ANOVA ($P=0.0014$), existe una diferencia significativa entre la producción de biomasa de las cepas estudiadas, siendo *B. megaterium* B2 la que alcanza un mayor valor de biomasa (1.48 g/L), seguida de las cepas *B. megaterium* ATCC 14581 (1.25 g/L), B8 (1.02 g/L) y B1 (0.75 g/L).

En la Figura 5 se evidencia que todas las cepas de *Bacillus* estudiadas producen biomasa a expensas del consumo de glicerol. El glicerol inició en 11 g/L y tras 28 horas de fermentación las cepas *B. megaterium* B2, B8 y ATCC 14581 consumieron 5 g/L, 4.5 g/L y 5.5 g/L, respectivamente; equivalente a una disminución del 40 a 50% en la concentración de glicerol. *B. megaterium* B1 consumió la menor cantidad de glicerol (2.1 g/L) y por lo tanto produjo la menor cantidad de biomasa (0.75 g/L). De acuerdo con el test de ANOVA ($P=0.0918$) se puede afirmar, con un 95% de confianza, que no hay diferencia significativa entre el consumo de glicerol de *B. megaterium* B2, B8 y ATCC 14581; mientras que si hay diferencia entre estas cepas y *B. megaterium* B1 ($P= 0.0013$).

Las cepas *B. megaterium* B8 y ATCC 14581 presentaron el mismo rendimiento de biomasa con respecto a sustrato, $Y_{X/S}$, 0.23, mientras que *B. megaterium* B2 presentó un $Y_{X/S}$ mayor, 0.30; indicando la capacidad superior de esta cepa para aprovechar el GRIB. Esta capacidad es debida a que la cepa B2 fue aislada del GRIB utilizado.

En la Figura 6 se presentan los resultados de la producción de PHB por las cepas *B. megaterium* B1, B2, B8 y ATCC14581 durante 28 horas de fermentación.

Figura 6. Producción de PHB por las cepas *B. megaterium* B1, B2, B8 y ATCC14581 durante 28 horas de fermentación en matraces de 250 mL



Con base en los resultados expuestos en la Figura 6 es posible afirmar que el género *Bacillus* pertenece al grupo de microorganismos que produce PHB asociado al crecimiento. En las cepas *B. megaterium* B2 y ATCC 14581, la mayor concentración de PHB se alcanza en la hora 18, con 0.38 g/L y 0.33 g/L respectivamente. *B. megaterium* B8, produce la mayor concentración de PHB, 0.31 g/L, en la hora 24. La concentración de PHB alcanzada por estas cepas, es similar a la reportada por Sangkharak & Prasertsan (2012), 0.35 g/L, con *B. subtilis* PHA012 utilizando glicerol puro. La producción de PHB por *B. megaterium* B1 fue significativamente inferior a las otras cepas estudiadas y presenta su máxima concentración, 0.06 g/L, a las 14 horas.

Aunque la hora de máxima concentración de PHB difiere entre *B. megaterium* B2, B8 y ATCC14581, las tres cepas alcanzaron su máxima productividad en la hora

14, 0.021 g/(L*h), 0.019 g/(L*h) y 0.020 g/(L*h), respectivamente. De acuerdo con el test ANOVA ($P=0.4652$) no hay diferencia significativa entre la productividad alcanzada por estas tres cepas.

Los valores de productividad de *B. megaterium* B2, B8 y ATCC14581, son similares a los alcanzados por otras cepas de *Bacillus* utilizando diversas fuentes de carbono. En el estudio realizado por Deepthi (2011), *B. firmus* NII0830 alcanzo una productividad de 0.033 g/(L*h) utilizando GRIB. En Rodriguez-Contreras (2013), Aarthi & Ramana (2011) y Pal (2009) las cepas de *B. megaterium* Uyuni S 29, *B. mycoides* DFC1 y *B. thuringiensis* IAM12077 alcanzaron productividades de 0.027 g/(L*h), 0.038 g/(L*h) y 0.058 g/(L*h) utilizando glucosa.

A la hora 18, las cepas de *B. megaterium* B2, B8 y ATCC14581, alcanzaron una acumulación de PHB en la célula, $Y_{P/X}$, correspondiente al 25%, 28% y 27%, respectivamente. De acuerdo con el test de ANOVA ($P=0.6191$), no existe una diferencia significativa entre estos valores. Estos resultados son concordantes por los reportados por otros estudios en los cuales se utilizaron cepas nativas de *B. megaterium* y fuentes de carbono convencionales. En Kulpreecha (2009) *B. megaterium* BA-019 acumuló 28.57% utilizando sacarosa y en Rodriguez-Contreras (2013), *B. megaterium* uyuni S29 acumuló 31% utilizando glucosa.

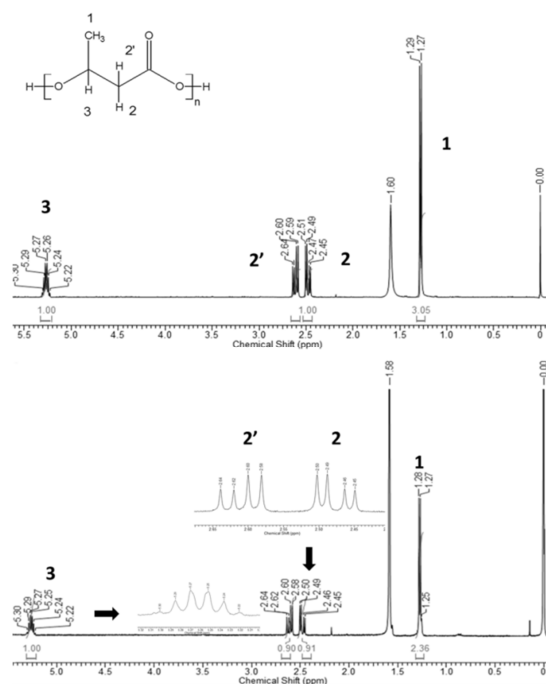
El rendimiento de producto con respecto a sustrato, $Y_{P/S}$, a las 28 horas de fermentación presenta el mismo valor en las cepas *B. megaterium* B8 y ATCC 14581 (0.06), y es ligeramente superior en la cepa *B. megaterium* B2 (0.07). Estos valores son similares al rendimiento reportado por Israni & Shivakumar (2015) ($Y_{P/S}=0.057$) en una cepa nativa de *Bacillus* utilizando glucosa como fuente de carbono.

De acuerdo con los resultados expuestos, las cepas nativas *B. megaterium* B2 y B8, producen mayor cantidad de PHB que *B. megaterium* B1. Además, estas

cepas presentan resultados similares a la cepa de referencia *B. megaterium* ATCC14581. A pesar de que no existe una diferencia significativa entre las cepas *B. megaterium* B2 y B8, se seleccionó *B. megaterium* B2 para la posterior etapa de búsqueda de condiciones fisicoquímicas y nutricionales que favorezcan la producción de PHB utilizando GRIB.

1.3.5. Caracterización del PHB. La Figura 7 muestra los espectros RMN del patrón de PHB (arriba) y del PHB producido por *B. megaterium* B2 (abajo), en los cuales se presenta la intensidad normalizada en el eje y, y en el eje x el corrimiento químico.

Figura 7. Espectros RMN del patrón de PHB (arriba) y del PHB producido por *B. megaterium* B2 (abajo)



Se observa una total concordancia entre las señales de resonancia características del PHB: 1 Doblete correspondiente al grupo metilo (-CH₃) a 1.27 ppm; 2 y 2'

Multipletes a 2.4 y 2.6 ppm correspondientes a los dos protones no equivalentes del grupo metileno (-CH₂-); y 3 Multiplete a 5.26 ppm correspondiente al grupo metino (-CH-) (Doi *et al.*, 1986). La señal presente en el corrimiento 1.60 ppm es debida a la presencia de agua.

1.4. CONCLUSIONES

Tres cepas, de quince aisladas, *B. megaterium* B1, B2 y B8, demostraron su capacidad para producir PHB utilizando GRIB como única fuente de carbono. Se seleccionó *B. megaterium* B2, para estudiar las condiciones que favorecen la producción de PHB utilizando GRIB. Se demostró que el GRIB es una fuente de carbono adecuada para la producción de PHB por microorganismos del género *Bacillus*.

1.5. REFERENCIAS

Aarthi, N., & Ramana, K. Identification and characterization of polyhydroxybutyrate producing *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. En *Int J Environ Sci*. 2011. vol. 1, p. 744–756.

Annuar, M. S. M., Tan, I. K. P., Ibrahim, S., & Ramachandran, K. B. A Kinetic Model for Growth and biosynthesis of Medium-Chain-Length Poly-(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida*. En *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2008. vol. 25(no. 2), p. 217-228.

Asad-ur-Rehman, Wijesekara, S., Nomu, N., Sato, S., & Matsumura, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and

1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. En *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2008. vol. 83, p. 1072-1080.

Aslim, B., Yüksekdağ, Z. N., & Beyatlı, Y. Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. En *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*. 2002. p. 24-30.

Bhagowati, P., Pradhan, S., Dash, H. R., & Das, S. Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. En *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2015. p. 1-10.
doi: 10.1080/09168451.2015.1034651

Biebl, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* — batch and continuous culture studies. En *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2001. vol. 27, p. 18 – 26.

Bonartsev, A. P., Myshkina, V. L., Nikolaeva, D. A., Furina, E. K., Makhina, T. A., Livshits, V. A., Boskhomdzhiyev, A. P., Ivanov, E. A., Iordanskii, A. L., & Bonartseva, G. A. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007. Vol. 1, pp. 295-307.

Bora, L. Polyhydroxybutyrate Accumulation in *Bacillus megaterium* and Optimization of Process Parameters Using Response Surface Methodology. En *Journal of Polymers and the Environment*. 2013. vol. 21(no. 2), p. 415-420.
doi: 10.1007/s10924-012-0529-z

Budde, C. F. *Production of Polyhydroxyalkanoate Copolymers from Plant Oil*. Doctor of Science in Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology. 2010

Cavalheiro, J. M. B. T., de Almeida, M. C. M. D., Grandfils, C., & da Fonseca, M. M. R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. En *Process Biochem.* 2009. vol. 44, p. 509-515.

Cerrone, F., Sánchez-Peinado, M. d. M., Juárez-Jimenez, B., González-López, J., & Pozo, C. Biological treatment of two-phase olive mill wastewater (TPOMW, alpeorujo): polyhydroxyalkanoates (PHAs) production by *Azotobacter* strains. En *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. vol. 20(no. 3), p. 594-601.

Chee, J.-Y., Yoga, S.-S., Lau, N.-S., Ling, S.-C., Abed, R. M. M., & Sudesh, K. Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics. En *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2010. p. 1395-1404.

Choi, J., & Lee, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. En *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. vol. 51, p. 13-21.

da Silva, G. P., Mack, M., & Contiero, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. En *Biotechnol. Adv.* 2009. vol. 27, p. 30-39.

Daneshi, A., Younesi, H., Ghasempouri, S. M., & Sharifzadeh, M. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Cupriavidus necator* from corn syrup: statistical modeling and optimization of biomass yield and volumetric productivity. En *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2010.

Deepthi, S. K., Binod, P., Sindhu, R., & Pandey, A. Media engineering for production of poly- β -hydroxybutyrate by *Bacillus firmus* NII 0830. En *J. Sci. Ind. Res.* 2011. vol. 70, p. 968–975.

Dhangdhariya, J. H., Dubey, S., Trivedi, H. B., Pancha, I., Bhatt, J. K., Dave, B. P., & Mishra, S. Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's Dry Sea Mix as a novel growth medium. En *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015. vol. 76(no. 0), p. 254-261.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.009>

Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., & Soga, K. ^1H and ^{13}C NMR Analysis of Poly(β -hydroxybutyrate) Isolated from *Bacillus megaterium*. En *Macromolecules*. 1986. vol. 19, p. 1274-1276.

Escapa, I. F., del Cerro, C., García, J. L., & Prieto, M. A. The role of GlpR repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol. En *Environ. Microbiol.* 2013. vol. 15(no. 1), p. 93-110.

Faccin, D. J. L., Martins, I., Cardozo, N. S. M., Rech, R., Ayub, M. A. Z., Alves, T. L. M., Gambetta, R., & Secchi, A. R. Optimization of C :N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. En *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009. vol. 84, p. 1756-1761.

Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia.

<http://www.fedebiocombustibles.com> (Revisado 06/04/2015)

Franz, A., Song, H.-S., Ramkrishna, D., & Kienle, A. Experimental and theoretical analysis of poly(β -hydroxybutyrate) formation and consumption in *Ralstonia eutropha*. En *Biochemical Engineering Journal*. 2011. vol. 55(no. 1), p. 49-58.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.03.006>

Full, T. D., Jung, D. O., & Madigan, M. T. Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. En *Lett. Appl. Microbiol.* 2006. vol. 43, p. 377-384.

Gouda, M. K., Swellam, A. E., & Omar, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. En *Microbiol. Res.* 2001. p. 201-207.

Hájek , M., & Skopal, F. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. En *Bioresource Technology.* 2010. vol. 101, p. 3242–3245.

Hansen, C. F., Hernandez, A., Mullan, B. P., Moore, K., Trezona-Murray, M., King, R. H., & Pluske, J. R. A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. En *Animal Production Science.* 2009. vol. 49(no. 2), p. 154-161.

doi: <http://dx.doi.org/10.1071/EA08210>

Ibrahim, M., & Steinbüchel, A. Zobelella denitrificans strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. En *J. Appl. Microbiol.* 2009. p. 214-225.

Israni, N., & Shivakumar, S. Evaluation of Upstream Process parameters influencing the growth associated PHA accumulation in *Bacillus sp.* Ti3. En *Journal of Scientific & Industrial Research.* 2015. vol. 74, p. 290-295.

Johnson , D. T., & Taconi, K. A. The Glycerin Glut: Options for the Value-Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiesel Production. En *Environmental Progress.* 2007. vol. 26, p. 338-348.

Karr, D. B., Waters, J. K., & Emerich, D. W. Analysis of Poly- β -Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection. En *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. vol. 46(no. 6), p. 1339-1344.

Kaynar, P., & Beyatli, Y. Determination of poly- β -hydroxybutyrate production by *Bacillus spp.* isolated from the intestines of various fishes. En *Fish. Sci.* 2009. vol. 75, p. 439-443.

Kessler, B., Weusthuis, R., Witholt, B., & Eggink, G. Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes. En *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* 2001. vol. 71, p. 159-182.

Khanna, S., & Srivastava, A. K. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. En *Process Biochem.* 2005. vol. 40.

Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., & Braunegg, G. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. En *Microbiology Monographs.* 2010. vol. 14, p. 85-119.

Koller, M., Gasser, I., Schmid, F., & Berg, G. Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. En *Engineering in Life Sciences.* 2011. vol. 11(no. 3), p. 222-237.

doi: 10.1002/elsc.201000190

Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., & Thongchul, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. En *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2009. vol. 107(no. 3), p. 240-245.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.006>

Kumar, P., Patel, S. K. S., Lee, J.-K., & Kalia, V. C. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. En *Biotechnology Advances*. 2013. vol. 31(no. 8), p. 1543-1561.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.007>

Kumar, P., Ray, S., Patel, S. K. S., Lee, J.-K., & Kalia, V. C. Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions. En *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015. vol. 78(no. 0), p. 9-16.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.046>

Lee, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. En *TIBTECH*. 1996. p. 431-438.

Lo, C.-W., Wu, H.-S., & Wei, Y.-H. High throughput study of separation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* XL1 blue. En *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2011. vol. 42(no. 2), p. 240-246.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2010.08.001>

Madison, L. L., & Huisman, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. En *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. vol. 63, p. 21-53.

Manosak , R., Limpattayanate, S., & Hunsom, M. Sequential-refining of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant via a combined process of chemical and adsorption. En *Fuel Process. Technol.* 2011. vol. 92, p. 92–99.

Moon, C., Ahn, J.-H., Kim, S. W., Sang, B.-I., & Um, Y. Effect of Biodiesel-derived Raw Glycerol on 1,3-Propanediol Production by Different Microorganisms. En *Appl Biochem Biotechnol.* 2010. vol. 161, p. 502-510.

Mothes, G., Schnorpfeil, C., & Ackermann, J.-U. Production of PHB from crude glycerol. En *Eng. Life Sci.* 2007. vol. 7, p. 475-479.

Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higueta, J. C., & Cardona, C. A. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. En *Bioresour. Technol.* 2013. vol. 133, p. 38-44.

Narayanan, A., & Ramana, K. V. Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters. En *3 Biotech.* 2012. vol. 2, p. 287-296.

Nikel, P., Pettinari, J., Galvagno, M., & Mendez, B. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* arcA mutant in fed-batch microaerobic cultures. En *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. vol. 77, p. 1337-1343.

Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., Voß, I., & Steinbüchel, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. En *Biotechnol. Lett.* 2001. vol. 23, p. 1119-1123.

Pal, A., Prabhu, A., Kumar, A. A., Rajagopal, B., Dadhe, K., Ponnammma, V., & Shivakumar, S. Optimization of Process Parameters for maximum Poly(- β -)hydroxybutyrate (PHB) Production by *Bacillus thuringiensis*. En *Polish Journal of Microbiology.* 2009. vol. 58, p. 149-154.

Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., & Marc, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. En *Journal of Applied Microbiology* 2002. vol. 92, p. 737-744.

Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc, I., & Aggelis, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. En *Biomass and Bioenergy* 2008. vol. 32, p. 60-71.

Penloglou, G., Chatzidoukas, C., & Kiparissides, C. Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: An integrated modelling approach and experimental validation. En *Biotechnology Advances*. 2012. vol. 30, p. 329-337.

Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, & Kalia, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. En *Bioresour. Technol.* 2003. vol. 87, p. 137-146.

Rodriguez-Contreras, A., Koller, M., Dias, M. M. d. S., Calafell, M., Braunegg, G., & Marqués-Calvo, M. S. Novel Poly [(R)-3-Hydroxybutyrate]-Producing Bacterium Isolated from a Bolivian Hypersaline Lake. En *Food Technol. Biotechnol.* 2013. vol. 51(no. 1), p. 123-130.

Rohini, D., Phadnis, S., & Rawal, S. K. Synthesis and characterization of poly- β -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. En *Indian J. Biotechnol.* 2006. vol. 5, p. 276-283.

Sangkharak, K., & Prasertsan, P. Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. En *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2012. vol. 58(no. 3), p. 173-182.
doi: 10.2323/jgam.58.173

Singh, P., & Parmar, N. Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)-producing bacteria. En *Afr. J. Biotechnol.* 2011. vol. 10, p. 4909-4919.

Somashekara, D. M., Rastogi, N. K., & Ramachandriah, S. T. A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. En *New Biotechnol.* 2009. vol. 26, p. 92-98.

Thirumala, M., Reddy, S. V., & Mahmood, S. K. Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus spp.* isolated from soil and activated sludge. En *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010. vol. 37, p. 271–278.

Valappil, S., Boccaccini, A., Bucke, C., & Roy, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. En *Antonie van Leeuwenhoek.* 2007. vol. 91, p. 1-17.

Van Gerpen, J., Shanks, B., Pruszko, R., Clements, D., & Knothe, G. Biodiesel Analytical Methods: National Renewable Energy Laboratory. 2004.

Verma, N., Sindhu, S. S., Suneja, S., & Goyal, S. Influence of Nutritional and Environmental Conditions on Production of Poly- β -hydroxybutyrate by *Bacillus sp.* En *Res. J. Microbiol.* 2011. vol. 6, p. 873-883.

Vishnuvardhan Reddy , S., Thirumala, M., & Mahmood, S. K. Production of PHB and P(3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. En *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. vol. 25, p. 391-397.

Wampfler, B., Ramsauer, T., Rezzonico, S., Hischier, R., Kohling, R., Thony-Meyer, L., & Zinn, M. Isolation and Purification of Medium Chain Length Poly(3-

hydroxyalkanoates) (mcl-PHA) for Medical Applications Using Nonchlorinated Solvents. En *Biomacromolecules*. 2010. vol. 11, p. 2716-2723.

Wang, Q., Yang, P., Liu, C., Xue, Y., Xian, M., & Zhao, G. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) from glycerol by recombinant *Escherichia coli*. En *Bioresour. Technol.* 2013. vol. 131, p. 548-551.

Wei, Y.-H., Chen, W.-C., Huang, C.-K., Wu, H.-S., Sun, Y.-M., Lo, C.-W., & Janarthanan, O.-M. Screening and Evaluation of Polyhydroxybutyrate-Producing Strains from Indigenous Isolate *Cupriavidus taiwanensis* Strains. En *Int. J. Mol. Sci.* 2011. vol. 12, p. 252-265.

Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K. P., & Chen, G.-Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. En *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001. vol. 80(no. 2), p. 111-118.
doi: 10.1023/a:1012222625201

Yang, Y.-H., Brigham, C. J., Budde, C. F., Boccazzi, P., Willis, L. B., Hassan, M. A., Yusof, Z. A. M., Rha, C., & Sinskey, A. J. Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. En *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010. vol. 87, p. 2037-2045.

Yilmaz, M., Soran, H., & Beyatli, Y. Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. En *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2005. vol. 21, p. 565-566.

Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. En *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001. vol. 53(no. 1), p. 5-21. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00218-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00218-6)

CAPÍTULO 2. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES FISICOQUÍMICAS Y NUTRICIONALES QUE FAVORECEN LA PRODUCCIÓN DE PHB EN *Bacillus megaterium* B2

RESUMEN

El diseño de experimentos es una valiosa herramienta para encontrar las variables más influyentes y sus valores óptimos en los procesos de fermentación. En este capítulo se presenta el segundo objetivo de la presente tesis doctoral: “Seleccionar las condiciones fisicoquímicas y nutricionales que favorezcan la acumulación de PHB por *B. megaterium* B2”.

De acuerdo con el diseño Plackett-Burman las variables con mayor influencia en la producción de PHB son la temperatura, la concentración de glicerol y la concentración de Na_2HPO_4 , y de acuerdo a los diseños centrales compuestos realizados, sus valores óptimos son 34°C, 7.6 g/L y 3 g/L, respectivamente. Después de 14 horas de fermentación en matraz Erlenmeyer utilizando las condiciones óptimas, *B. megaterium* B2 produce 0.43 g/L de PHB con una acumulación en la célula del 34%. Este valor corresponde a un incremento del 48% con respecto a las condiciones iniciales. Al evaluar las condiciones óptimas en un biorreactor de 7.5 L se observó un incremento significativo en la producción de PHB (1.20 g/L), demostrando la necesidad de controlar el pH y suministrar un flujo constante de oxígeno disuelto.

2.1. INTRODUCCIÓN

La producción de metabolitos microbianos es afectada por múltiples variables como temperatura, pH, formulación del medio, disponibilidad de oxígeno y tiempo de fermentación. Por lo tanto, es indispensable buscar estrategias que permitan determinar cuáles son las variables de mayor influencia en el proceso y optimizar sus valores. El diseño de experimentos es una herramienta que permite obtener la mayor cantidad de información con el mínimo número de experimentos (Gaden, 1959; Greasham, 1993; K.-M. Lee & Gilmore, 2006).

El diseño de Plackett-Burman es un diseño fraccionado de resolución III que permite con $n+1$ experimentos analizar el efecto de n variables sobre la variable de respuesta. Este tipo de diseño experimental se utiliza para realizar un cribado cuando se tiene un gran número de variables (mayor a 7) (Greasham, 1993; Gutierrez & de la Vara 2008; S. Y. Lee & Choi, 1999).

Por otra parte, después de seleccionar las variables con mayor influencia en el proceso (máximo 5) mediante el diseño de Plackett-Burman, es conveniente aplicar la metodología de superficie de respuesta (MSR) para encontrar un modelo de regresión que permita determinar los valores óptimos para la producción del metabolito estudiado. Para que un modelo de regresión se pueda considerar predictivo, debe explicar más del 70% de la variabilidad de los datos (Greasham, 1993; Gutierrez & de la Vara 2008; S. Y. Lee & Choi, 1999).

El diseño de experimentos más utilizado en la MSR es el diseño central compuesto (DCC). El DCC tiene tres tipos de puntos experimentales: puntos centrales, puntos factoriales y puntos axiales. Con la información obtenida en estos experimentos es posible determinar los efectos principales de interacción y de curvatura de las variables estudiadas sobre la variable de respuesta.

Usualmente es necesario realizar varios DCC para encontrar el valor óptimo de todas las variables (Gutierrez & de la Vara 2008).

Como se observa en la Tabla 8, emplear el diseño de Plackett-Burman y la MSR mejora significativamente la producción de PHB. De acuerdo con los autores citados (Tabla 8) las variables más influyentes en la producción de PHB son las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y minerales.

Tabla 8 Optimización de la producción de PHB empleando diseño de Plackett-Burman y MSR

Autor	Microorganismo	Variables estudiadas con mayor influencia en la producción de PHB					Antes del DDE		Después del DDE		% q
		Fuente de C	Fuente de N	Fuente de P	Minerales	Inóculo	PHB (g/L)	q (g/(L*h))	PHB (g/L)	q (g/(L*h))	
Sathiyarayanan <i>et al</i> 2013	<i>Bacillus subtilis</i>				NaCl		3.25	0.0812	9.16	0.2290	182.0
Gahlawat <i>et al</i> 2012	<i>Azohydromonas australica</i>			KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O Elementos traza		1.26	0.0420	2.63	0.0877	108.7
Mokhtari-Hosseini <i>et al</i> 2009	<i>Methylobacterium extorquens</i>	Metanol	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄			0.81	0.0225	2.95	0.0819	264.6
Nikel <i>et al</i> 2008	<i>Escherichia coli</i>	Glicerol	Aminoácidos de la caseína			Tamaño	1.25	0.0260	3.35	0.0698	168.0
Khanna <i>et al</i> 2005	<i>Cupriavidus necator</i>	Fructuosa		KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O		3.84	0.0640	6.75	0.1125	75.8

DDE: Diseño de experimentos
C: Carbono

%q: porcentaje de incremento en la productividad
N: Nitrógeno
P: Fósforo

Después de encontrar las condiciones que favorecen la producción de PHB es recomendable realizar experimentos en un biorreactor que permitan controlar y manipular variables del proceso como pH y oxígeno disuelto. Adicionalmente, el biorreactor debe permitir el cultivo en operación *fed-batch*; que es bien sabido incrementa la densidad celular necesaria para aumentar la productividad y el rendimiento en metabolitos intracelulares (Ibrahim & Steinbüchel, 2009). Realizar la fermentación en operación *fed-batch* también es recomendable cuando el sustrato puede causar inhibición en la producción de metabolitos (Scott Fogler, 2008) como es el caso del GRIB.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Microorganismo *B. megaterium* B2 fue usado en todos los experimentos. Un vial del microorganismo criopreservado fue reactivado mensualmente y posteriormente repicado en agar nutritivo modificado de composición: 15 g/L agar, 15 g/L peptona, 3 g/L extracto de levadura, 6 g/L NaCl y 9 g/L glicerol.

2.2.2. Diseño de experimentos Se evaluó la influencia de siete variables (Tabla 9) en la producción de PHB por *B. megaterium* B2. La concentración en el medio de fermentación de las sales no estudiadas se fijó en: 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L ácido cítrico, 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 2 g/L MOPS. Los experimentos se realizaron en matraces de 250 mL con 50 mL de medio utilizando un agitador orbital (Unimax 1010). El tiempo de fermentación fue 14 horas, ya que de acuerdo a los resultados presentados en el Capítulo 1, en este tiempo se alcanza la mayor productividad del proceso. La variable de respuesta en todos los diseños de experimentos fue la concentración de PHB.

Tabla 9 Variables y niveles evaluados en la producción de PHB por *B. megaterium* B2

Tipo de Variable	Variable – Unidades	Variable codificada	Niveles	Niveles Codificados
Nutricional	Glicerol - g/L	A	9.50	-1
			18.50	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄ - g/L	B	0.75	-1
			1.50	1
	KH ₂ PO ₄ - g/L	C	1.50	-1
			3.00	1
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O - g/L	D	3.50	-1
			9.00	1
Fisicoquímica	Solución de elementos traza – mL/L	E	1.00	-1
			3.00	1
	Temperatura - °C	F	28.00	-1
			37.00	1
	Velocidad de agitación - rpm	G	120.00	-1
			200.00	1

Primero se realizó un diseño de Plackett-Burman de 13 experimentos (Tabla 10) con el fin de seleccionar las variables con mayor influencia en el proceso. El punto central (experimento 13) fue incluido para evaluar la falta de ajuste del modelo de regresión e identificar la presencia de efectos no lineales en los rangos estudiados. Los experimentos 1 al 12 se realizaron por duplicado y el punto central se realizó cuatro veces.

Tabla 10 Diseño de Plackett-Burman para la producción de PHB por *B. megaterium* B2

Exp.	Variables codificadas						
	A	B	C	D	E	F	G
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
9	-1	1	-1	-1	-1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1
11	-1	-1	-1	1	1	1	-1
12	-1	-1	1	1	1	-1	1
13	0	0	0	0	0	0	0

Después de realizar y analizar los 13 experimentos del diseño de Plackett-Burman, se seleccionaron las tres variables con mayor influencia en la producción de PHB por *B. megaterium* B2. Para obtener los valores óptimos de estas variables y obtener un análisis detallado de su influencia en el proceso, se realizó un diseño central compuesto (DCC). Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los puntos centrales se realizaron cuatro veces. Finalmente, y con el fin de validar los resultados obtenidos y para conocer la nueva dinámica del microorganismo, se realizaron fermentaciones en las condiciones óptimas, tomando muestras a las horas 0, 4, 8, 14, 18, 24 y 28, para medir las concentraciones de biomasa, PHB, glicerol, nitrógeno y pH.

2.2.3. Análisis Estadístico Los datos experimentales se evaluaron de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) y la metodología de superficie de respuesta (RSM). Los análisis estadísticos se desarrollaron empleando el software Statgraphics Centurion® (Versión 16.1.18, Statpoint Inc., Herndon, Virginia, USA), con un nivel de confianza de 95% ($P < 0.05$).

2.2.4. Producción de PHB en un biorreactor de 7.5L. Las condiciones óptimas para la producción de PHB por *B. megaterium* B2 determinadas en matraces, se evaluaron en un biorreactor de 7.5 L. (BioFlo 115; New Brunswick Scientific, USA) con 4 L del medio optimizado. El aire se suministró a un flujo de 4 L/min, la velocidad del agitador se estableció en 400 rpm y el pH se ajustó y mantuvo en 7 con una solución 2N de KOH. El preinóculo se preparó en un matraz de 500 mL con 200 mL del medio óptimo. Se tomaron muestras cada hora para medir la concentración de biomasa, PHB, glicerol y nitrógeno.

La concentración de biomasa, PHB, glicerol y nitrógeno, se determinó de acuerdo con lo descrito en la sección 1.2.8.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Diseño de experimentos Se evaluó la influencia de la temperatura, la velocidad de agitación y las concentraciones de glicerol, nitrógeno, fósforo y minerales en la producción de PHB por *B. megaterium* B2. En la Tabla 11, se presentan los resultados del diseño de Plackett Burman, y en la Tabla 12 el ANOVA de este diseño.

Tabla 11. Resultados del diseño de Plackett Burman

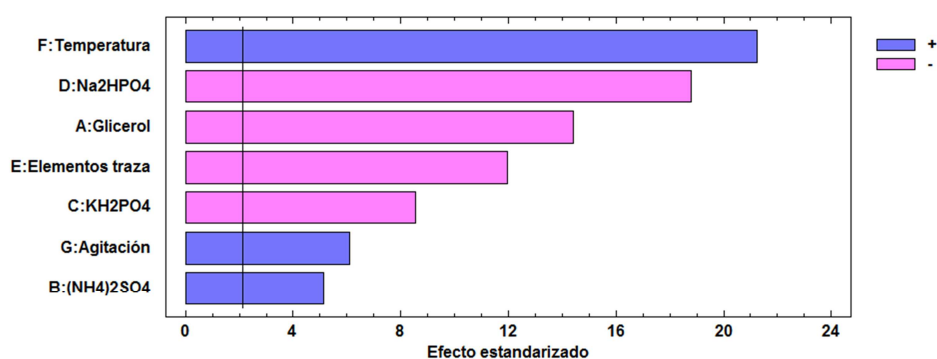
Exp. No.	Variables codificadas							Variable de respuesta			
	A	B	C	D	E	F	G	PHB (g/L)			
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.05		0.05	
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.01		0.01	
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.07		0.05	
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	0.05		0.05	
5	1	1	-1	1	1	-1	1	0.00		0.00	
6	1	1	1	-1	1	1	-1	0.08		0.08	
7	-1	1	1	1	-1	1	1	0.13		0.11	
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.11		0.11	
9	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0.24		0.22	
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	0.10		0.12	
11	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.07		0.08	
12	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.00		0.00	
13	0	0	0	0	0	0	0	0.11	0.10	0.09	0.10

Tabla 12. ANOVA de los resultados del diseño de Plackett-Burman

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A:Glicerol	0.0145042	1	0.0145042	207.2	0.0000
B:(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0018375	1	0.0018375	26.25	0.0001
C:KH ₂ PO ₄	0.00510417	1	0.00510417	72.92	0.0000
D:Na ₂ HPO ₄	0.0247042	1	0.0247042	352.92	0.0000
E: Solución de elementos traza	0.0100042	1	0.0100042	142.92	0.0000
F:Temperatura	0.0315375	1	0.0315375	450.54	0.0000
G:Velocidad de agitación	0.00260417	1	0.00260417	37.2	0.0000
Falta de ajuste	0.00286488	5	0.000572976	8.19	0.0007
Error puro	0.00105	15	0.00007		
Total (corr.)	0.0942107	27			

El ANOVA de los resultados obtenidos en el diseño de experimentos Plackett-Burman (Tabla 12), indica que las siete variables estudiadas tienen un efecto significativo en la producción de PHB por *B. megaterium* B2 ($P < 0.05$). De acuerdo con el diagrama de Pareto (Figura 8), la temperatura, la velocidad de agitación y la concentración de nitrógeno tienen un efecto positivo en la producción de PHB; mientras que la concentración de glicerol, las fuentes de fósforo y los elementos traza tienen un efecto negativo.

Figura 8. Diagrama de Pareto de los resultados del diseño de Plackett-Burman



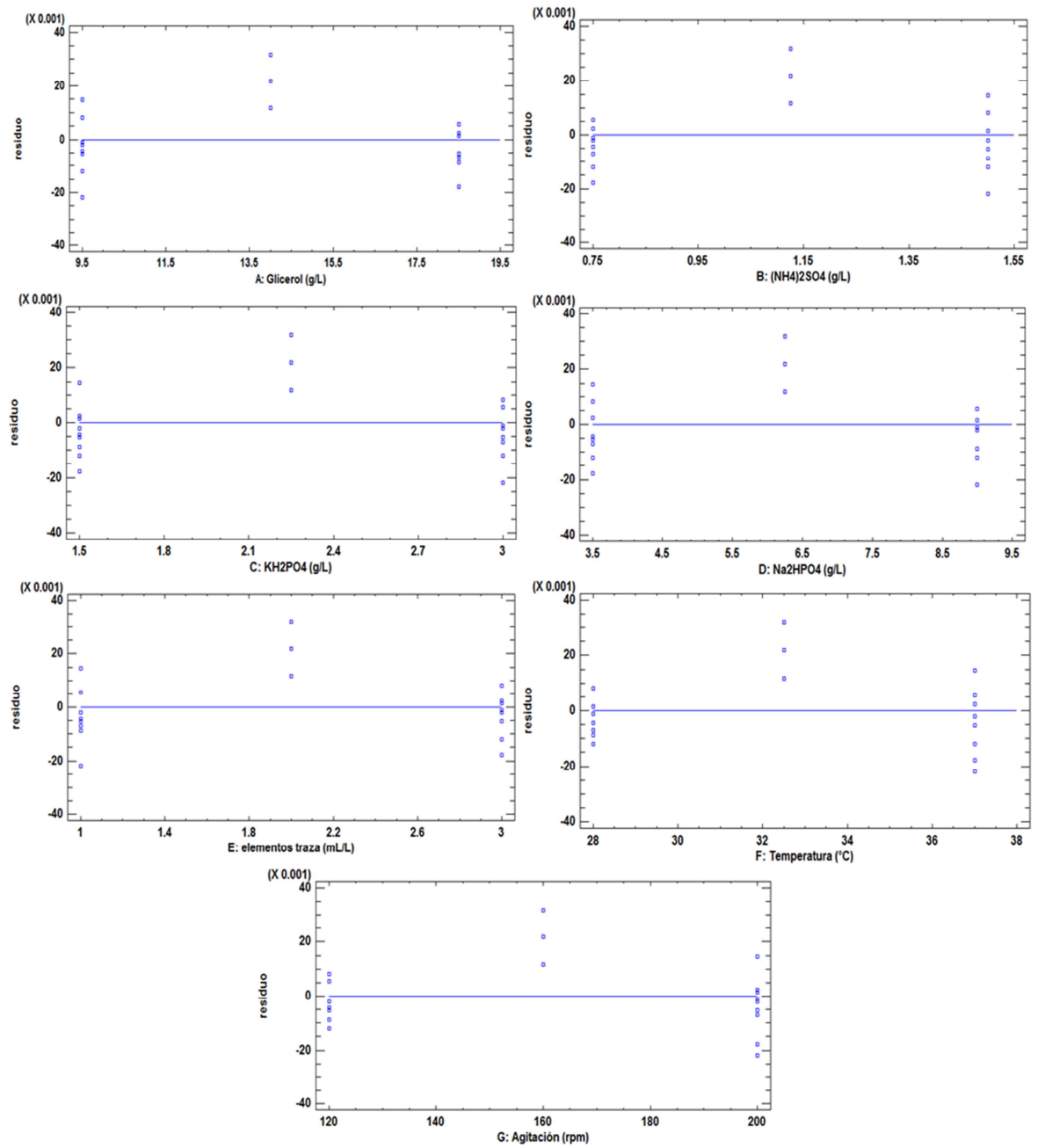
La producción de PHB en el Género *Bacillus* está asociada al crecimiento del microorganismo (Israni & Shivakumar, 2015; McCool *et al.*, 1996; Somashekara *et al.*, 2009), por lo tanto el efecto positivo de la temperatura y la velocidad de agitación se debe a que el incremento de estos factores favorece el crecimiento microbiano.

En contraste con otras especies como *Cupriavidus necator* (Daneshi *et al.*, 2010) *B. megaterium* B2 no necesita una limitación de la fuente de nitrógeno para estimular la producción de PHB. Resultados similares fueron encontrados por Kumar (2015) para la cepa *Bacillus thuringiensis* EGU45.

El efecto negativo de las dos fuentes de fósforo estudiadas indica que la limitación de este nutriente es crucial para la producción de PHB por *B. megaterium* B2. Un comportamiento similar fue reportado por Vijayendra (2007) en una cepa nativa de *Bacillus*.

La falta de ajuste reportada ($P=0.0007$, Tabla 12), es un fuerte indicio de curvatura en las variables estudiadas. Este indicio se comprueba, observando las gráficas de residuos contra los niveles de los factores (Figura 9), donde se aprecia que los residuos correspondientes a las observaciones en el centro del experimento están más arriba que los residuos en los extremos. Por lo tanto, es necesario realizar un diseño más robusto para evaluar las condiciones óptimas de cultivo.

Figura 9. Residuos contra niveles de factores del diseño Plackett-Burman



Para el DCC, se seleccionaron las tres variables que de acuerdo con el diagrama de Pareto tienen una mayor influencia en la producción de PHB por *B. megaterium* B2: temperatura y las concentraciones de glicerol y Na_2HPO_4 . Los valores de velocidad de agitación y las concentraciones de nitrógeno, KH_2PO_4 y elementos traza; se fijaron en el nivel que de acuerdo al diagrama de Pareto favorece la producción de PHB.

En la Tabla 13 se presenta el DCC realizado y en la Tabla 14 se encuentra el ANOVA de los resultados. Los rangos de las variables, fueron levemente modificados de acuerdo con los resultados del diseño de Plackett Burman.

Tabla 13. Resultados del DCC

Exp. No.	Variables			Variables codificadas			Variable de respuesta			
	Temperatura (°C)	Na_2HPO_4 (g/L)	Glicerol (g/L)	A	B	C	PHB (g/L)			
1	33	5	12.5	0	0	0	0.23	0.18	0.19	0.21
2	30	3	9.5	-1	-1	-1	0.12		0.13	
3	37	3	9.5	1	-1	-1	0.14		0.15	
4	30	7	9.5	-1	1	-1	0.11		0.13	
5	37	7	9.5	1	1	-1	0.11		0.11	
6	30	3	15.5	-1	-1	1	0.16		0.13	
7	37	3	15.5	1	-1	1	0.18		0.18	
8	30	7	15.5	-1	1	1	0.00		0.00	
9	37	7	15.5	1	1	1	0.06		0.05	
10	30	5	12.5	-1	0	0	0.00		0.00	
11	37	5	12.5	1	0	0	0.10		0.09	
12	33	3	12.5	0	-1	0	0.17		0.14	
13	33	7	12.5	0	1	0	0.03		0.03	
14	33	5	9.5	0	0	-1	0.20		0.20	
15	33	5	15.5	0	0	1	0.21		0.16	

Tabla 14 ANOVA del DCC

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: Temperatura	0.007605	1	0.007605	5.78	0.0250
B: Na ₂ HPO ₄	0.037845	1	0.037845	28.78	0.0000
C: Glicerol	0.003645	1	0.003645	2.77	0.1101
AA	0.0333105	1	0.0333105	25.33	0.0000
AB	0.000025	1	0.000025	0.02	0.8916
AC	0.0016	1	0.0016	1.22	0.2819
BB	0.00626959	1	0.00626959	4.77	0.0400
BC	0.013225	1	0.013225	10.06	0.0044
CC	0.0226332	1	0.0226332	17.21	0.0004
Error total	0.0289309	22	0.00131504		
Total (corr.)	0.148288	31			

Como se observa en la Tabla 14, analizando los datos obtenidos en el DCC es posible determinar los efectos principales de cada variable, los efectos de interacción entre las variables y los efectos de curvatura. De acuerdo con el ANOVA, los efectos de interacción de la temperatura y la concentración de Na₂HPO₄ (AB) y de la temperatura y la concentración de glicerol (AC), no son significativos ($P > 0.05$) por lo tanto no se tienen en cuenta para realizar el modelo de regresión DCC-1 (Ecuación 1)

$$PHB = -6.529 + 0.440 * A + 0.124 * B - 0.163 * C - 0.006 * A^2 - 0.009 * B^2 - 0.005 * B * C + 0.007 * C^2$$

Ecuación

1

Dónde:

A= Temperatura (°C)

B= Concentración de Na₂HPO₄ (g/L)

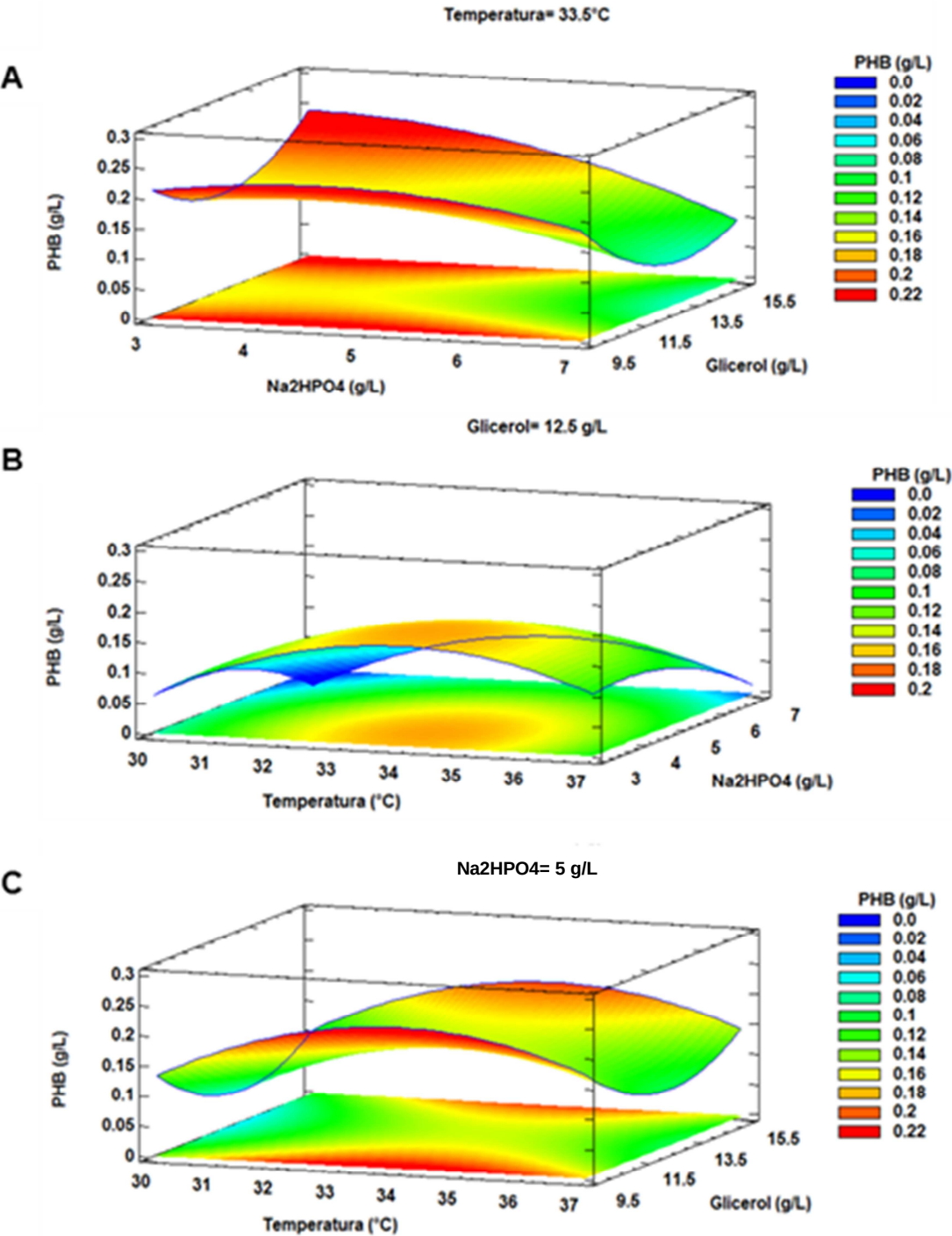
C= Concentración de glicerol (g/L)

La Ecuación 1 representa el 79.4% de la variabilidad de los datos y de acuerdo con el ANOVA es estadísticamente significativo ($P=0.0000$).

Las superficies de respuesta obtenidas de la Ecuación 1 son mostradas en la Figura 10. De acuerdo a la Figura 10B y Figura 10C, la temperatura óptima de cultivo para la producción de PHB por *B. megaterium* B2 está en el rango de 33 a 35 °C, por lo tanto, se selecciona 34 °C. Estos resultados coinciden con los reportados por (Naranjo *et al.*, 2013) en una cepa nativa de *B. megaterium*.

Adicionalmente, la Figura 10-A y Figura 10-C indican que los valores óptimos de las concentraciones de glicerol y Na_2HPO_4 se encuentran fuera del rango experimental. Por lo que es necesario realizar un segundo DCC para estas dos variables modificando el rango de los experimentos. El valor óptimo de la concentración de glicerol debe ser menor a 9.5 g/L o mayor a 15.5 g/L. Para determinar en cuál de las direcciones se debe explorar, se realizaron unas pruebas adicionales en matraces, encontrando que con concentraciones de glicerol mayores de 20 g/L la fase *Lag* aumenta a 12 horas, por lo tanto, se decidió explorar las concentraciones menores a 9.5 g/L. En cuanto a la concentración de Na_2HPO_4 , la Figura 9-A y Figura 9-B indican que las concentraciones menores a 5 g/L son las que favorecen la producción de PHB.

Figura 10. Superficies de respuesta del DCC



En la Tabla 15 se encuentra el segundo DCC realizado y en la Tabla 16 se encuentra el ANOVA de los resultados.

Tabla 15. Resultados del segundo DCC

Exp No.	Variables		Variables codificadas		Variable de respuesta			
	Na ₂ HPO ₄ (g/L)	Glicerol (g/L)	B	C	PHB (g/L)			
1	3	7.6	0	0	0.42	0.40	0.40	0.42
2	1	3.6	-1	-1	0.15	0.13		
3	5	3.6	1	-1	0.23	0.34		
4	1	11.5	-1	1	0.18	0.18		
5	5	11.5	1	1	0.23	0.35		
6	1	7.6	-1	0	0.15	0.16		
7	5	7.6	1	0	0.19	0.19		
8	3	3.6	0	-1	0.33	0.36		
9	3	11.5	0	1	0.26	0.31		

Tabla 16. ANOVA del segundo DCC

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
B:Na ₂ HPO ₄	0.0280333	1	0.0280333	7.8	0.0144
C:Glicerol	0.000075	1	0.000075	0.02	0.8872
BB	0.110572	1	0.110572	30.78	0.0001
BC	0.0006125	1	0.0006125	0.17	0.6859
CC	0.000609524	1	0.000609524	0.17	0.6866
Error total	0.0502863	14	0.00359188		

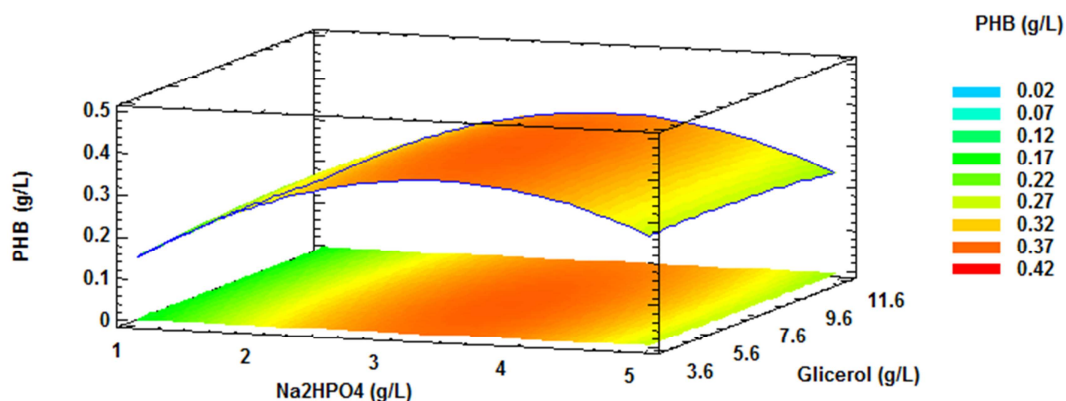
Con los resultados se obtiene el modelo de regresión DCC-2:

$$PHB = -0.112687 + 0.263422 * B + 0.0137504 * C - 0.0384821 * B^2 - 0.00110759 * B * C - 0.000732483 * C^2$$

Ecuación 2.

El modelo DCC-2 describe el 74.4% de los datos y su significancia estadística se confirma con el test ANOVA ($P=0.0009$).

Figura 11 Superficie de respuesta del segundo DCC

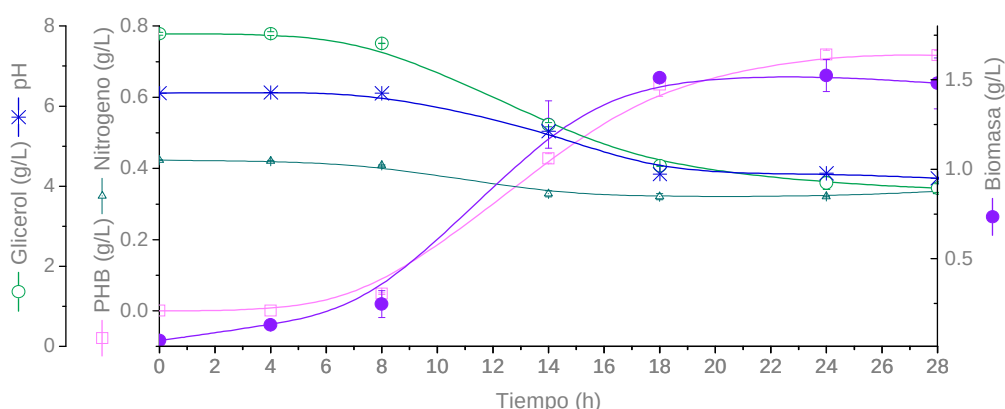


La superficie de respuesta obtenida del modelo DCC-2 se presenta en la Figura 11. La producción óptima de PHB se encuentra en el punto central del segundo DCC, en el que las concentraciones de glicerol y Na₂HPO₄ son 7.6 g/L y 3 g/L, respectivamente. En este punto el valor de la producción de PHB predicho por el modelo es 0.37 ± 0.06 g/L a las 14 horas de fermentación. Para confirmar este resultado, se realizaron tres experimentos a 34 °C y 200 rpm, utilizando el medio optimizado: 7.6 g/L glicerol, 1.5 g/L KH₂PO₄, 3 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.01 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.1 g/L ácido cítrico, 1.5 g/L (NH₄)₂SO₄ y 2 g/L MOPS. El medio fue suplementado con 1 mL de solución de elementos traza con la composición descrita en 1.2.3. El PHB producido a las 14 horas de fermentación en estos experimentos fue 0.43 ± 0.01 , el cual concuerda con el rango predicho por el modelo DCC-2.

Al comparar los resultados presentados en la sección 1.3.4 con los obtenidos utilizando las condiciones óptimas, se observa un incremento de 48% en la producción de PHB, 45% en la acumulación ($Y_{P/X}$), 84% en el rendimiento de producto con respecto a sustrato ($Y_{P/S}$), 46% en la productividad volumétrica (q) y 48% en la productividad específica.

Se realizó el seguimiento de la fermentación de *B. megaterium* B2 durante 28 horas utilizando las condiciones óptimas encontradas. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 12. La mayor productividad fue a las 18 horas, 0.0353 g/(L*h). Sin embargo el mayor valor de producción de PHB se observó a las 24 horas, 0.72 g/L, indicando que la producción de PHB se detiene a pesar de que las fuentes de carbono y nitrógeno están aún disponibles en el medio. Este resultado puede ser atribuido a la inhibición del crecimiento celular debido al pH bajo (4.3). Un comportamiento similar fue observado por Faccin (2009) con la misma especie de *Bacillus*.

Figura 12. Dinámica del pH, producción de Biomasa, PHB y concentración de glicerol por *B. megaterium* B2 en las condiciones optimizadas



2.3.2. Producción de PHB en un biorreactor de 7.5L En las Figuras 13 y 14 se encuentran los resultados de la fermentación con las condiciones optimizadas de *B. megaterium* B2 en un biorreactor de 7.5L en las condiciones detalladas en la sección 2.2.4.

Se observa que después de una fase *Lag* de aproximadamente 4 horas, inicia la producción de PHB y biomasa, demostrando la correlación entre estas dos variables. Después de 11 horas de fermentación, el glicerol es completamente consumido y la concentración de PHB empieza a disminuir ya que las células comienzan a degradar el polímero para su supervivencia.

En la Figura 14, se observa que el porcentaje de oxígeno disuelto disminuye drásticamente a partir de la hora 4 (inicio de la fase exponencial) y se mantiene en valores cercanos a 5% entre las horas 6 y 10, posteriormente aumenta hasta un valor de 84,81%. El aumento del OD coincide con el consumo total del glicerol lo cual indica una disminución en la actividad metabólica de la población bacteriana.

Figura 13 Dinámica de producción de Biomasa, PHB, concentración de glicerol y nitrógeno por *B. megaterium* B2 en un biorreactor con las condiciones optimizadas

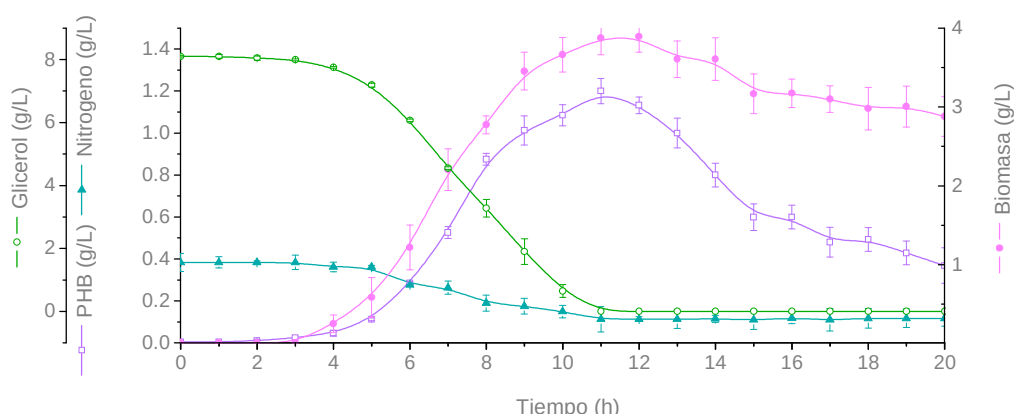
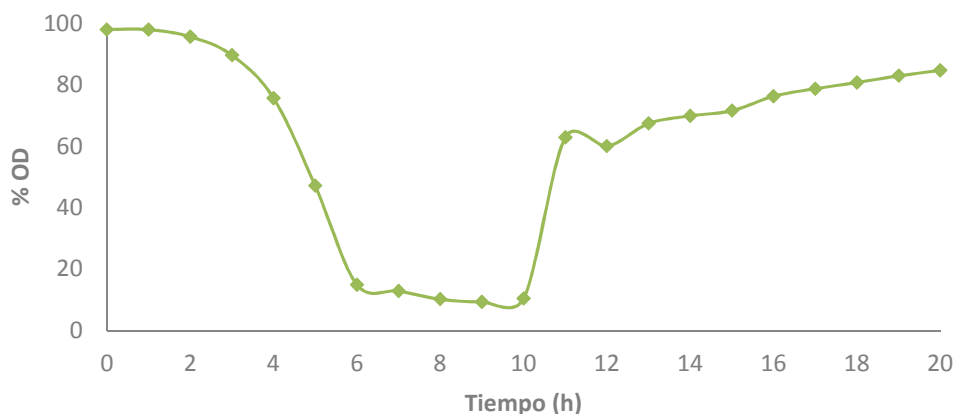


Figura 14. Perfil de oxígeno disuelto por *B. megaterium* B2 en un biorreactor con las condiciones optimizadas



El cambio de matraz de 250mL a biorreactor de 7.5L, tiene un efecto positivo en la producción de biomasa y por lo tanto, en la producción de PHB. Comparando la máxima concentración de PHB alcanzada en el biorreactor a 11 horas de fermentación (1.20g/L), con la obtenida en matraz en las condiciones óptimas a 14 horas de fermentación (0.43g/L); fue posible incrementar la producción del PHB en 179%. Un comportamiento similar fue reportado por Gahlawat & Srivastava (2012) en un microorganismo productor de PHB asociado al crecimiento, *Azohydromonas australica*. Esta mejora está probablemente relacionada con los altos niveles de oxígeno disponibles en el biorreactor y con el control de pH.

Adicionalmente, la máxima productividad alcanzada en el biorreactor fue 0.11 g/(L*h) a las 11 horas de fermentación; este valor es comparable con el encontrado en la literatura para cepas nativas de *Bacillus megaterium* en biorreactores utilizando fuentes de carbono no convencionales: glicerol, 0.081 g/(L*h) (López *et al.*, 2012), melaza de caña de azúcar, 0.046 g/(L*h) (Gouda *et al.*, 2001) y jarabe de dátil, 0.061 g/(L*h) (Omar *et al.*, 2001).

Aparentemente, el cambio de matraz Erlenmeyer a biorreactor no tiene ningún efecto en la acumulación de PHB en las células de *B. megaterium* B2 (31% en los dos recipientes). Sin embargo, la acumulación en el biorreactor pudo estar restringida por la limitación de glicerol, por lo que es necesario realizar experimentos en *fed-batch* para intentar aumentar la acumulación y productividad del proceso.

2.4. CONCLUSIONES

Las variables con mayor influencia en la producción de PHB por *B. megaterium* B2 y sus valores óptimos de acuerdo a los diseños de experimentos realizados son: Temperatura (34°C), glicerol (7.6g/L) y Na₂HPO₄ (3g/L). Por medio del diseño de experimentos, fue posible incrementar un 48% la producción de PHB (0.43g/L) con respecto a las condiciones iniciales (0.29g/L).

Al evaluar las condiciones óptimas en un biorreactor se observó un incremento significativo en la producción de PHB (1.20g/L), demostrando la necesidad de controlar el pH y el oxígeno disuelto.

2.5. REFERENCIAS

Daneshi, A., Younesi, H., Ghasempouri, S. M., & Sharifzadeh, M. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Cupriavidus necator* from corn syrup: statistical modeling and optimization of biomass yield and volumetric productivity. En *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2010.

Faccin, D. J. L., Martins, I., Cardozo, N. S. M., Rech, R., Ayub, M. A. Z., Alves, T. L. M., Gambetta, R., & Secchi, A. R. Optimization of C :N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. En *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009. vol. 84, p. 1756-1761.

Gaden, E. L. Fermentation Process Kinetics. En *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1959. vol. 1(no. 4), p. 413–429.

Gahlawat, G., & Srivastava, A. K. Estimation of Fundamental Kinetic Parameters of Polyhydroxybutyrate Fermentation Process of *Azohydromonas australica* Using Statistical Approach of Media Optimization. En *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. vol. 168.

Gouda, M. K., Swellam, A. E., & Omar, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. En *Microbiol. Res.* 2001. p. 201-207.

Greasham, R. L. Media for Microbial Fermentations *Biotechnology*. p. 128-137. 1993.

Gutierrez, H., & de la Vara , R. *Análisis y Diseño de Experimentos*. México: Mc Graw Hill. 2008.

Ibrahim, M. H. A., & Steinbüchel, A. Poly(3-Hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. En *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. vol. 75, p. 6222-6231.

Israni, N., & Shivakumar, S. Evaluation of Upstream Process parameters influencing the growth associated PHA accumulation in *Bacillus sp.* Ti3. En *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2015. vol. 74, p. 290-295.

Khanna, S., & Srivastava, A. K. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. En *Process Biochem*. 2005. vol. 40.

Kumar, P., Ray, S., Patel, S. K. S., Lee, J.-K., & Kalia, V. C. Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions. En *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015. vol. 78(no. 0), p. 9-16.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.046>

Lee, K.-M., & Gilmore, D. Statistical experimental design for bioprocess modeling and optimization analysis. En *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006. vol. 135(no. 2), p. 101-115.

doi: 10.1385/abab:135:2:101

Lee, S. Y., & Choi, J.-i. Experimental Design for Improvement Fermentations *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (pp. 616-627). Washington D. C.: ASM PRESS. 1999.

López, J. A., Naranjo, J. M., Higueta, J. C., Cubitto, M. A., Cardona, C. A., & Villar, M. A. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: outlook on future developments with endospore forming bacteria. En *Biotechnol. Bioprocess Eng*. 2012. vol. 17, p. 250 - 258.

McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N., & Cannon, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. En *FEMS Microbiol. Lett*. 1996. vol. 138.

Mokhtari-Hosseini, Z. B., Vasheghani-Farahani, E., Heidarzadeh-Vazifekhoran, A., Shojaosadati, S. A., Karimzadeh, R., & Darani, K. K. Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium. En *Bioresour. Technol.* 2009. vol. 100, p. 2436-2443.

Mokhtari-Hosseini, Z. B., Vasheghani-Farahani, E., Shojaosadati, S. A., & Karimzadeh, R. Media Selection for Poly(hydroxybutyrate) Production from Methanol by *Methylobacterium Extorquens* DSMZ 1340. En *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 2009. vol. 28(no. 3), p. 45-52.

Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higueta, J. C., & Cardona, C. A. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. En *Bioresour. Technol.* 2013. vol. 133, p. 38-44.

Nikel, P., Pettinari, J., Galvagno, M., & Mendez, B. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* arcA mutant in fed-batch microaerobic cultures. En *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. vol. 77, p. 1337-1343.

Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., Voß, I., & Steinbüchel, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. En *Biotechnol. Lett.* 2001. vol. 23, p. 1119-1123.

Sathiyarayanan, G., Saibaba, G., Seghal Kiran, G., & Selvin, J. A statistical approach for optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus subtilis* MSBN17. En *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013. vol. 59(no. 0), p. 170-177.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.040>

Scott Fogler, H. *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*: Pearson Educación. 2008.

Somashekara, D. M., Rastogi, N. K., & Ramachandriah, S. T. A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. En *New Biotechnol.* 2009. vol. 26, p. 92-98.

Vijayendra, S. V. N., Rastogi, N. K., Shamala, T. R., Kumar, P. K. A., Kshama, L., & Joshi, G. J. Optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus* sp. CFR 256 with corn steep liquor as a nitrogen source. En *Indian J. Microbiol.* 2007. vol. 47.

CAPÍTULO 3. MODELO MATEMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE PHB POR *Bacillus megaterium* B2 UTILIZANDO GRIB COMO FUENTE DE CARBONO

RESUMEN

En este capítulo se presenta el tercer objetivo de la tesis doctoral: “Plantear un modelo que describa la producción de PHB a nivel de laboratorio”.

El modelo desarrollado, permite describir y predecir el crecimiento del microorganismo, la producción de PHB, el consumo de oxígeno y las fuentes de carbono y nitrógeno, en cultivos *batch* y *fed-batch*. La velocidad específica de crecimiento del microorganismo se simuló teniendo como sustratos limitantes el oxígeno, y la fuente de carbono de acuerdo con las ecuaciones Monod y sigmoideal, respectivamente. El proceso de producción de PHB se describió con la ecuación de Luedeking-Piret. La simulación con el modelo y la estimación de parámetros se llevaron a cabo utilizando el software EMSO. Los parámetros se estimaron utilizando los datos obtenidos en fermentaciones *batch* y *fed-batch* realizadas en un biorreactor de 7.5 L.

La mejor estrategia de alimentación en cultivos *fed-batch*, permitió una producción de PHB de 2.06 g/L. Este valor corresponde a un incremento del 72% con respecto a la producción en *batch*.

3.1. INTRODUCCIÓN

El PHB fue el primer PHA descubierto y continua siendo el más estudiado (Penloglou *et al.*, 2010). Su biosíntesis se realiza en cuatro etapas: a) Catabolismo de la fuente de carbono a acetil-CoA (Ac-CoA); b) Condensación de dos moléculas de Ac-CoA a acetoacetil-CoA; c) Reducción de acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA; d) Polimerización del monómero 3-hidroxibutiril-CoA a PHB (Koller *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2003).

El mecanismo intracelular regulador del PHB es muy complejo, especialmente cuando se utilizan como sustratos residuos industriales (Koller *et al.*, 2006). La descripción de la bioquímica del proceso se lleva a cabo mediante el desarrollo de un modelo matemático. Adicionalmente, el modelo permite predecir las condiciones de operación y establecer las bases para el posterior diseño y control del proceso (Khanna & Srivastava, 2005; Luong & Mulchandani, 1988).

En los últimos años se han desarrollado diversos modelos matemáticos para la producción de PHB. Para describir este proceso, es necesario plantear balances de masa a los sistemas: crecimiento del microorganismo, producción de PHB y consumo del sustrato(s) limitante(s). Estos balances pueden ser escritos como:

$$\text{Crecimiento del microorganismo: } \frac{dX}{dt} = r_x - r_d \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\text{Producción de PHB: } \frac{dP}{dt} = r_p \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\text{Consumo de sustratos limitantes: } \frac{dS}{dt} = -r_s \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde:

- X: Concentración de biomasa celular (g/L);
P: Concentración de PHB (g/L);
S: Concentración de sustrato (fuente de carbono ó nitrógeno) (g/L);
 r_x : Velocidad volumétrica de crecimiento celular (g/(L*h));
 r_d : Velocidad volumétrica de muerte celular (g/(L*h));
 r_p : Velocidad volumétrica de formación de producto (g/(L*h));
 r_s : Velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/(L*h)).

Balance de biomasa celular

Las velocidades volumétricas de crecimiento y muerte celular, se pueden escribir en función de sus velocidades específicas (Mavituna & Sinclair, 2008):

$$r_x = \mu X \quad \text{Ecuación 6}$$

$$r_d = k_d X \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

- μ : Velocidad específica de crecimiento (1/h);
 k_d : Velocidad específica de muerte celular (1/h).

Sustituyendo la Ecuación 6 y la Ecuación 7, en la Ecuación 3, la variación de la biomasa con respecto al tiempo corresponde a:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d)X \quad \text{Ecuación 8}$$

El PHB es un metabolito intracelular, por lo tanto, la biomasa esta compuesta por un componente catalítico responsable de la actividad metabólica de la célula (R) y el polímero (P) (Somashekara *et al.*, 2009).

$$X = R + P$$

Ecuación 9

Donde R es la biomasa residual (g/L)

Teniendo en cuenta que P es inerte, la concentración de biomasa celular (X) durante el periodo de producción de PHB, corresponde a la biomasa residual (R). Por consiguiente, la variación de la biomasa en el tiempo se expresa como:

$$\frac{dR}{dt} = (\mu - k_d)R$$

Ecuación 10

La producción de PHB inicia en la fase exponencial en algunos microorganismos como: *Azohydromonas australica* (Gahlawat & Srivastava, 2013), *Azohydromonas lata* (Penloglou *et al.*, 2012) y *Bacillus megaterium* (Faccin *et al.*, 2012); mientras que en otros la producción empieza en la fase estacionaria, como en *Cupriavidus necator* (Khanna & Srivastava, 2005). En estas fases del crecimiento bacteriano, la duplicación celular predomina sobre la muerte celular, siendo esta última despreciable. Por lo tanto la variación de la biomasa residual con respecto al tiempo se puede expresar como:

$$\frac{dR}{dt} = \mu * R$$

Ecuación 11

Balance de masa para el PHB

La velocidad de formación de producto es linealmente proporcional a la velocidad de crecimiento y a la concentración instantánea de biomasa. Por consiguiente, la velocidad volumétrica de producción de PHB se describe mediante la ecuación de Luedeking-Piret (Luong & Mulchandani, 1988).

$$r_p = k_1 r_x + k_2 X \quad \text{Ecuación 12}$$

Dónde:

- k_1 : Constante empírica asociada al crecimiento celular (g PHB/ g Biomasa)
 k_2 : Constante empírica no asociada al crecimiento celular
(g PHB/ (g Biomasa*h))

Teniendo en cuenta el concepto de biomasa residual y reemplazando la Ecuación 6 y la Ecuación 12 en la Ecuación 4, la variación de la producción de PHB con el tiempo se expresa como:

$$\frac{dP}{dt} = k_1 * \mu * R + k_2 * R \quad \text{Ecuación 13}$$

Balance de masa para la fuente de carbono

Los compuestos orgánicos (glucosa, fructosa, glicerol, etc) son utilizados por los microorganismos como fuente de carbono y energía para el crecimiento celular y la producción de metabolitos primarios y secundarios (Greasham, 1993). Por lo tanto, el consumo de la fuente de carbono es proporcional al crecimiento de la biomasa residual (R), a la formación de PHB y al mantenimiento celular, el cual es proporcional a la concentración de R. Por consiguiente, involucrando los anteriores

conceptos al balance de masa de la fuente de carbono, la Ecuación 5 se puede escribir como:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{R/S}} \left(\frac{dR}{dt} \right) - \frac{1}{Y_{P/S}} \left(\frac{dP}{dt} \right) - m_S R \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde

S: Concentración de sustrato, como fuente de carbono (g/L)

m_S : Constante asociada al consumo de sustrato para el mantenimiento celular (1/h)

$Y_{R/S}$: Rendimiento de biomasa residual con respecto al sustrato consumido.
(g R/ g S)

$Y_{P/S}$: Rendimiento de PHB con respecto al sustrato consumido.
(g P/g S)

Reemplazando la Ecuación 11 y la Ecuación 13 en la Ecuación 14, se obtiene:

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{R/S}} + \frac{k_1}{Y_{P/S}} \right) * \mu * R + \left(\frac{k_2}{Y_{P/S}} + m_S \right) * R \quad \text{Ecuación 15}$$

Definiendo nuevos parámetros:

$$\alpha = \left(\frac{1}{Y_{R/S}} + \frac{k_1}{Y_{P/S}} \right) \quad \text{Ecuación 16}$$

$$\gamma = \left(\frac{k_2}{Y_{P/S}} + m_S \right) \quad \text{Ecuación 17}$$

La expresión de consumo del carbono con respecto al tiempo se simplifica así:

$$\frac{dS}{dt} = -(\alpha * \mu + \gamma) * R \quad \text{Ecuación 18}$$

Balance de masa para la fuente de nitrógeno

Las bacterias utilizan los compuestos con amoníaco o nitrato como fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas, los cuales son indispensables para el crecimiento celular (Greasham, 1993). Por lo tanto, la fuente de nitrógeno se consume debido al crecimiento y mantenimiento de la biomasa residual (Khanna & Srivastava, 2005). La Ecuación 5 se puede escribir como:

$$-\frac{dN}{dt} = k_3 \frac{dR}{dt} + k_4 R \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde

k_3 Constante asociada al consumo de la fuente de nitrógeno para la producción de biomasa residual (g N/g R)

k_4 : Constante asociada al consumo necesario para las actividades de mantenimiento celular (g R/(g N*h))

Al reemplazar la Ecuación 11 en la Ecuación 19 se obtiene:

$$\frac{dN}{dt} = -(\mu * k_3 * R) + k_4 R \quad \text{Ecuación 20}$$

Los balances de biomasa residual (Ecuación 11), PHB (Ecuación 13), fuente de carbono (Ecuación 16) y fuente de nitrógeno (Ecuación 20) están en función de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo (μ). La velocidad específica de crecimiento del microorganismo controla: la rapidez con la cual el microorganismo consume el sustrato limitante, el crecimiento bajo diferentes concentraciones del sustrato limitante y la formación de producto (Clarke, 2013).

En la Tabla 17, se presentan las generalidades y la expresión de la velocidad de crecimiento del microorganismo (μ) de los modelos más relevantes revisados a la fecha. En términos generales, los modelos se desarrollaron con los datos obtenidos en cultivos *batch* y se validaron con los resultados obtenidos en cultivos *fed-batch*, utilizando biorreactores que controlan el pH y el oxígeno disuelto (OD).

Tabla 17. Generalidades de los modelos matemáticos desarrollados para la producción de PHB

Autor	Fuente de carbono	Microorganismo	Tipo de cultivo	Sustrato limitante	Velocidad específica de crecimiento
Gahlawat <i>et al</i> 2013	Sacarosa	<i>Azohydromonas australica</i>	batch fed-batch	S y N	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_S + S} \right) * \left(\frac{N^n}{N^n + K_N^n} \right) * \left(\frac{S_m}{S_m + S} \right) * \left(1 - \left(\frac{N}{N_m} \right)^m \right)$
Faccin <i>et al</i> 2012	Sacarosa	<i>Bacillus megaterium</i>	batch	N	$\mu = \mu_m \frac{N}{K_N + N}$
Penloglou <i>et al</i> 2012	Sacarosa	<i>Azohydromonas lata</i>	batch fed-batch	S y N	$\mu = \mu_m \frac{N/S}{K_{N/S} + N/S}$
Pirouz <i>et al</i> 2011	Glucosa, fructosa y suero de leche	<i>Azotobacter beijerinckii</i>	batch	R	$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{R}{R_m} \right)$
Wang <i>et al</i> 2010	Ácidos acético, propiónico y butírico	<i>Cupriavidus necator</i>	batch	S	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S}$
Mahmoudi <i>et al</i> 2010	Glucosa y Fructosa	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	batch	S R	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S}$ $\mu = \mu_m \left(1 - \frac{R}{R_m} \right)$
Somashekara <i>et al</i> 2009	Sacarosa	<i>Bacillus flexus</i>	batch	R	$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{R}{R_m} \right)$

Patwardhan <i>et al</i> 2008	Fructosa	<i>Cupriavidus necator</i>	batch fed-batch	S y N	$\mu = \left(\mu_{m1} \left(\frac{N}{K_N + N} \right) + \mu_{m2} \left(\frac{\left(\frac{N}{K_{N2}} \right)^n}{1 + \left(\frac{N}{K_{N2}} \right)^n} \right) \right) * \left(1 - \left(\frac{N/S}{N_m} \right)^m \right)$
Wang <i>et al</i> 2007	Ácido butírico y fructosa	<i>Cupriavidus necator</i>	batch	S	$\mu = \mu_m \frac{S_o/X_o}{K_{S/X} + S_o/X_o}$
Khanna <i>et al</i> 2006	Fructosa	<i>Cupriavidus necator</i>	batch fed-batch	S y N	$\mu = \mu_m \left(\frac{S^n}{K_S^n + S^n} \right) * \left(\frac{N^m}{N^m + K_N^m} \right) * \left(1 - \left(\frac{S}{S_m} \right)^p \right) * \left(1 - \left(\frac{N}{N_m} \right)^q \right)$
Khanna <i>et al</i> 2005	Fructosa	<i>Cupriavidus necator</i>	batch	S y N	
Raje <i>et al</i> 1998	Fructosa	<i>Cupriavidus necator</i>	batch fed-batch	S y N	$\mu = \left(\mu_{m1} \left(\frac{N}{K_N + N} \right) + \mu_{m2} \left(\frac{\left(\frac{N}{K_{N2}} \right)^n}{1 + \left(\frac{N}{K_{N2}} \right)^n} \right) \right) * \left(1 - \left(\frac{N/S}{N_m} \right)^m \right)$
Mulchandani <i>et al</i> 1989	Fructosa	<i>Cupriavidus necator</i>	batch	S y N	$\mu = \mu_m * \left(\frac{N/S}{K_{N/S} + N/S} \right) * \left(1 - \left(\frac{N/S}{N_m} \right)^m \right)$

Donde

S: Concentración de sustrato, como fuente de carbono (g/L)

N: Concentración de la fuente de nitrógeno (g/L)

R: Concentración de la biomasa residual (g/L)

La mayoría de los modelos propuestos han sido establecidos para la producción de PHB por *Cupriavidus necator*; este microorganismo a diferencia de *B. megaterium*, no acumula PHB durante su crecimiento y necesita una limitación de nitrógeno (Khanna & Srivastava, 2005). Los únicos dos modelos encontrados para microorganismos del género *Bacillus*, se desarrollaron en fermentaciones *batch* y no se validaron en *fed-batch* (Faccin *et al.*, 2012; Somashekara *et al.*, 2009). Las fuentes de carbono más investigadas son carbohidratos de fácil asimilación como sacarosa, fructosa y glucosa. En la revisión realizada, no se encontraron modelos aplicados al uso de glicerol puro o GRIB como fuente de carbono.

En las expresiones de μ reportadas en la Tabla 17, se observa que la velocidad específica de crecimiento se describe a partir de los siguientes modelos:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Ecuación 21}$$

$$\mu = \mu_m \left(\frac{S^n}{K_S^n + S^n} \right) \quad \text{Ecuación 22}$$

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{R}{R_m} \right) \quad \text{Ecuación 23}$$

Donde

μ_m : velocidad específica máxima de crecimiento (1/h)

K_S : constante de saturación (g/L)

n : parámetro adimensional

R_m : máxima concentración viable de biomasa residual (g/L)

La velocidad específica de crecimiento puede ser expresada en función del sustrato (Ecuaciones 21 y 22) o independiente del sustrato (Ecuación 23) (Mavituna & Sinclair, 2008).

La Ecuación 21 fue desarrollada por Jacques Lucien Monod, con el fin de describir la fase exponencial y de desaceleración de los microorganismos. En esta ecuación, se asume como mecanismo de replicación celular la fisión binaria, el valor de μ_m corresponde a la velocidad de replicación en la fase exponencial y el valor de K_s corresponde a la concentración de sustrato limitante en el punto donde μ es la mitad de μ_m . Este es el modelo más utilizado para describir el crecimiento microbiano en sistemas *batch* y *fed-batch* (Clarke, 2013). La Ecuación 22 se conoce como Moser o sigmoideal, siendo un modelo derivado de Monod (Mavituna & Sinclair, 2008). La Ecuación 23, corresponde a un modelo logístico, es independiente de la concentración de sustrato y tiene gran aplicación en casos de estudio en los cuales no es posible tener información referente al sustrato limitante (Mavituna & Sinclair, 2008).

Altas concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno, pueden causar inhibición en el crecimiento y en la formación de productos (Greasham, 1993). En las expresiones de velocidad específica de crecimiento de los modelos desarrollados por Gahlawat & Srivastava (2013), Patwardhan & Srivastava (2008), Khanna & Srivastava (2005), Raje & Srivastava (1998) y Mulchandani (1989), se describe la inhibición causada a partir de altas concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizando las ecuaciones:

$$\mu_i = \frac{S_m}{S_m + S} \quad \text{Ecuación 24}$$

$$\mu_i = 1 - \left(\frac{S}{S_m}\right)^m \quad \text{Ecuación 25}$$

Donde

μ_i : velocidad de inhibición

S_m : Concentración donde inicia la inhibición (g/L)

m : parámetro adimensional

En los modelos presentados en la Tabla 17, se observa que los únicos sustratos que se tomaron como limitantes para el crecimiento bacteriano y la producción de PHB fueron las fuentes de carbono y nitrógeno. En la Tabla 18 se presenta el tipo de reactor utilizado y las condiciones de aireación y agitación empleadas en los modelos previamente citados.

Los montajes realizados en biorreactor mantienen el porcentaje de oxígeno disuelto en un valor superior al 20%, de modo que cuando se utiliza este tipo de montaje no se considera al oxígeno como un limitante en el crecimiento y en la producción de PHB.

Tabla 18. Tipo de reactor utilizado, condiciones de aireación, agitación y % de OD empleados en los modelos matemáticos desarrollados para la producción de PHB

Autor	Reactor (Volumen)	Agitación	Aireación	%OD
Gahlawat & Srivastava, 2013	Biorreactor (7 L)	Se ajustó manualmente para mantener un %OD constante.		30
Faccin <i>et al.</i> , 2012	Biorreactor (5 L)	400 - 700 rpm	1 v.v.m.	Mínimo 40
Penloglou <i>et al.</i> , 2012	Biorreactor (3 L)	100 - 1000 rpm	N. R.	20
Pirouz <i>et al.</i> , 2011	Erlenmeyer (250 mL)	250 rpm	N. A.	N. A.
Wang <i>et al.</i> , 2010	Biorreactor (3 L)	400 rpm	4.5 L/min	N. R.
Mahmoudi <i>et al.</i> , 2010	Erlenmeyer (500 mL)	250 rpm	N. A.	N. A.
Somashekara <i>et al.</i> , 2009	Erlenmeyer (500 mL)	250 rpm	N. A.	N. A.
Patwardhan & Srivastava, 2008	Biorreactor (7 L)	Se ajustó manualmente para mantener un %OD constante.		30
Wang <i>et al.</i> , 2007	Erlenmeyer (500 mL)	180 rpm	N. A.	N. A.
Khanna & Srivastava, 2006	Biorreactor (7 L)	200 - 500 rpm	1 v.v.m.	Mínimo 20
Khanna & Srivastava, 2005	Biorreactor (7 L)	Se ajustó manualmente para mantener un %OD constante		30
Raje & Srivastava, 1998	Biorreactor (2 L)	Se ajustó manualmente para garantizar un %OD mínimo		Mínimo 20
Mulchandani <i>et al.</i> , 1989	Biorreactor (3.5 L)	600 rpm	1.8 vvm	Mínimo 80

v.v.m. volumen de aire/(volumen de líquido*minuto)

N. R. No reporta

N. A. No aplica

En contraste con otros microorganismos, como *Cupriavidus necator*, el cual, acumula en promedio 50% de PHB manteniendo un nivel mínimo del OD de 30% (Khanna & Srivastava, 2005; Khanna & Srivastava, 2006; Patwardhan & Srivastava, 2008), estudios indican que limitar la disponibilidad de oxígeno en el medio de fermentación es conveniente para favorecer la acumulación del PHB en *Bacillus megaterium*. De acuerdo a la investigación realizada por RamKumar Pandian (2010) con una cepa nativa de *Bacillus megaterium* las células acumulan PHB debido al estrés creado por la limitación del oxígeno en el medio. Un comportamiento similar fue encontrado por Sabra & Abou-Zeid (2008); en este estudio la acumulación de PHB en *B. megaterium* DSMZ 90 disminuyó de 52%

(OD: 1-3%) a 18% (OD: 10%). Este comportamiento fue también observado experimentalmente para *B. megaterium* B2 durante el desarrollo del presente trabajo (Ver Anexo C).

La necesidad de limitar la disponibilidad de oxígeno tiene una explicación desde el punto de vista de la fisiología celular; la molécula de Acetyl Co-A es un intermediario importante en la síntesis de PHB, pero también un componente clave en la respiración celular. Acetyl Co-A es oxidado en el ciclo de Krebs para generar energía o formar biomasa. Debido al carácter aerobio de *B. megaterium*, se puede concluir que altas concentraciones de oxígeno incrementan la actividad del ciclo Krebs, limitando de esta forma la producción de PHB (Faccin *et al.*, 2013).

Por lo tanto, los experimentos *batch* y *fed-batch* se llevaron a cabo bajo condiciones de limitación de oxígeno. Adicionalmente, el modelo propuesto describe la concentración de oxígeno en el medio y lo considera como sustrato limitante en la velocidad específica de crecimiento de *B. megaterium* B2.

Balance de masa para el oxígeno (Mavituna & Sinclair, 2008)

La variación de oxígeno disuelto en el medio de cultivo puede plantearse como la diferencia entre el oxígeno que difunde desde el aire al medio y el consumido por el microorganismo:

$$\frac{dO}{dt} = OTR - O_{cons} \quad \text{Ecuación 26}$$

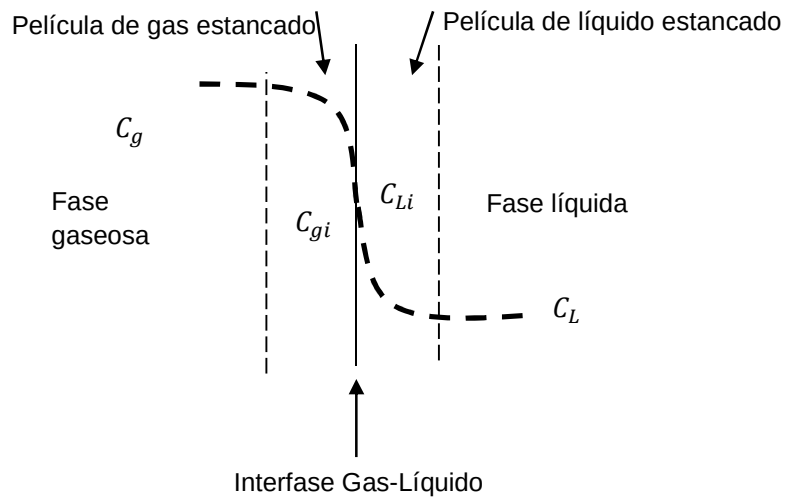
Donde

OTR : Por sus siglas en ingles Oxygen Transfer Rate (Oxígeno que difunde desde el aire al medio de cultivo.)

O_{cons} : Demanda de oxígeno (Oxígeno consumido por el microorganismo).

El oxígeno se transfiere de la fase gaseosa a la fase líquida a través de la interfase gas-líquido creada cuando el aire es burbujeado a través del medio de cultivo (Figura 15).

Figura 15. Esquema de la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida



Fuente: Modificado (Mavituna & Sinclair, 2008)

La difusión de oxígeno está regida por el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno $k_L a$ y puede expresarse en función de la concentración de oxígeno en el líquido como:

$$OTR = k_L a * (C_g^* - C_o))$$

Ecuación 27

Dónde:

$k_L a$: Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (1/h)

C_g^* : Concentración de saturación del oxígeno disuelto en el líquido en la interfase gas-líquido (g O₂/L).

C_O : Concentración de oxígeno disuelto en el medio de fermentación (g O₂/L)

El consumo de oxígeno por parte del microorganismo, es proporcional al crecimiento de la biomasa residual (R), a la formación de PHB y al mantenimiento celular:

$$O_{cons} = -\frac{1}{Y_{R/O}} \left(\frac{dR}{dt} \right) - \frac{1}{Y_{P/O}} \left(\frac{dP}{dt} \right) - m_O R \quad \text{Ecuación 28}$$

Donde

m_O : Constante asociada al consumo de oxígeno para el mantenimiento celular (1/h)

$Y_{R/O}$: Rendimiento de biomasa residual con respecto al oxígeno consumido.
(g R/ g O)

$Y_{P/O}$: Rendimiento de PHB con respecto al oxígeno consumido. (g P/g O)

Reemplazando la Ecuación 11 y la Ecuación 13 en la Ecuación 28, se obtiene:

$$O_{cons} = -\left(\frac{1}{Y_{R/O}} + \frac{k_1}{Y_{P/O}} \right) * \mu * R - \left(\frac{k_2}{Y_{P/S}} + m_O \right) * R \quad \text{Ecuación 29}$$

Definiendo nuevos parámetros:

$$k_5 = \left(\frac{1}{Y_{R/O}} + \frac{k_1}{Y_{P/O}} \right) \quad \text{Ecuación 30}$$

$$k_6 = \left(\frac{k_2}{Y_{P/O}} + m_S \right) \quad \text{Ecuación 31}$$

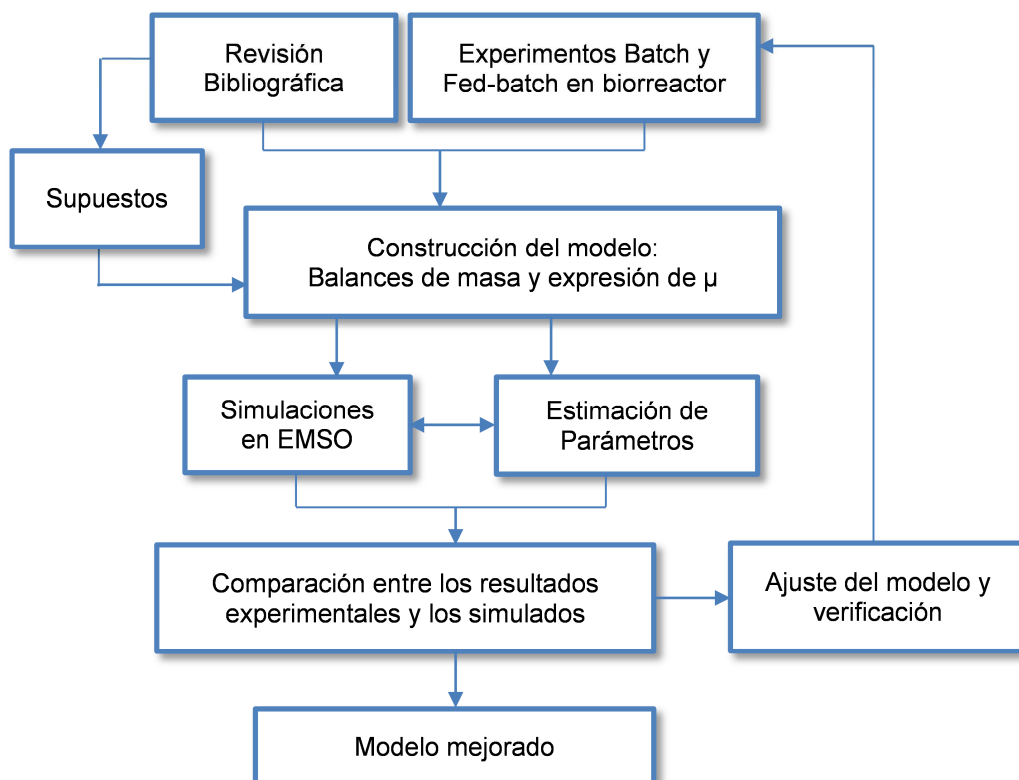
La expresión de consumo del oxígeno con respecto al tiempo (Ecuación 26) se simplifica así:

$$\frac{dO}{dt} = k_L a * (C_g^* - C_O) - (k_5 * \mu * R + k_6 * R) \quad \text{Ecuación 32}$$

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada para desarrollar el modelo se presenta en la Figura 16.

Figura 16 Metodología utilizada para desarrollar el modelo matemático de producción de PHB



3.2.1. Experimentos *batch* y *fed-batch*

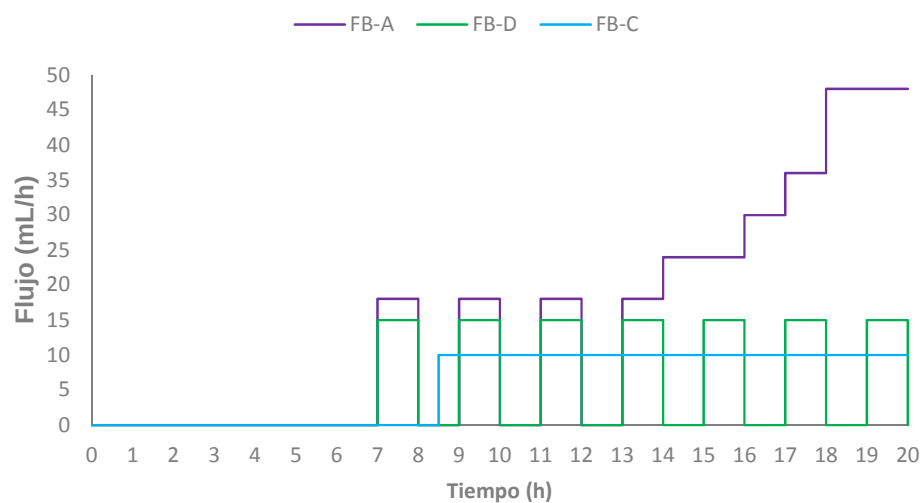
Experimentos en operación *batch*

Los datos de los experimentos *batch* empleados para el desarrollo del modelo matemático se presentaron en la Sección 2.3.2 y fueron obtenidos de acuerdo con lo descrito en la Sección 2.2.4.

Experimentos en operación *fed-batch*

Con el objetivo de conocer la influencia del glicerol y la fuente de nitrógeno sobre las demás variables medidas del proceso, se diseñaron 3 experimentos en operación *fed-batch*: alimentación ascendente (FB-A), alimentación discontinua (FB-D) y alimentación continua (FB-C). Las estrategias de alimentación empleadas se presentan en la Figura 17. La solución empleada para la alimentación contenía glicerol (484 g/L) y nitrógeno (18 g/L). Con estas estrategias de alimentación se buscó someter al microorganismo a valores extremos de exceso y deficiencia de las fuentes de carbono y nitrógeno. La información obtenida de ésta serie de experimentos permitió aumentar la capacidad del modelo matemático para describir fuertes cambios en los valores de las concentraciones de sustratos, biomasa y producto.

Figura 17. Estrategias de alimentación utilizadas en los experimentos *fed-batch*



Para cada experimento *fed-batch* se reactivó un vial de *B. megaterium* B2 y se utilizó el medio optimizado en el capítulo 2. La composición del medio fue: 7.6 g/L glicerol, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 3 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L ácido cítrico, 1.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 2 g/L MOPS. El medio fue suplementado con 1 mL de solución de elementos traza con la composición descrita en la Sección 1.2.3.

Las fermentaciones se realizaron en un biorreactor de 7.5 L (BioFlo 115; New Brunswick Scientific, USA) con un volumen inicial de 4 L de medio. El aire se suministró a un flujo de 4 L/min, la velocidad del agitador se estableció en 400 rpm. La temperatura y el pH se mantuvieron a 34 °C y 7, respectivamente. Se tomaron muestras cada hora para medir la concentración de biomasa, PHB, glicerol y nitrógeno. La cuantificación se determinó de acuerdo con lo descrito en la Sección 1.2.8.

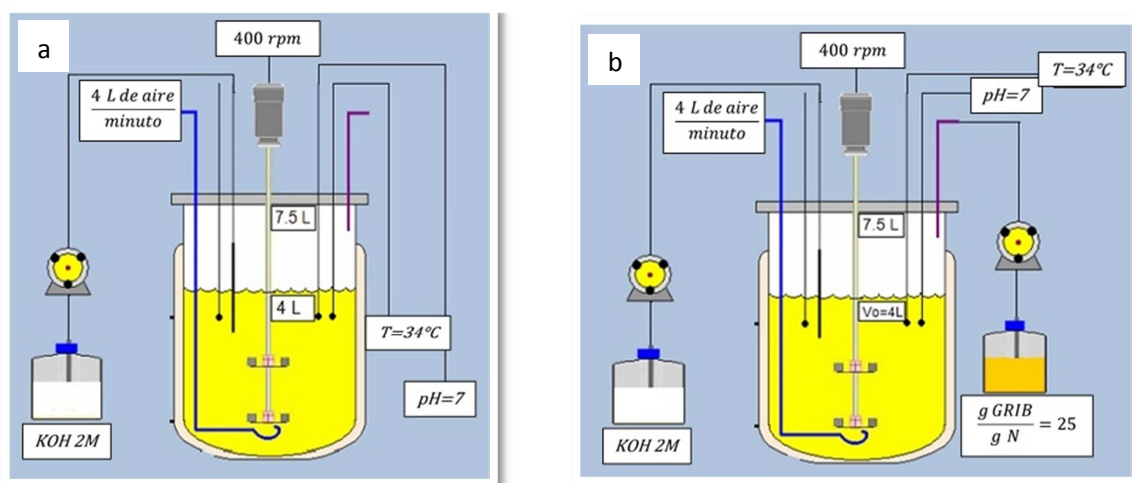
3.2.2. Modelo matemático para la producción de PHB por *B. megaterium* B2

Para el desarrollo del modelo se consideró que el volumen de control equivale al volumen de medio de cultivo en el biorreactor. Como experimentalmente se ha trabajado con una agitación uniforme y constante, fue posible modelar el sistema considerando homogeneidad en el medio en cuanto a pH, temperatura y concentración de sustrato, producto y biomasa.

En operación *batch* (Figura 18-a), este volumen se mantuvo constante (4 L) y el sistema es cerrado, excepto para el oxígeno. En operación *fed-batch*, el volumen de medio es una variable del proceso con un valor inicial 4 L y un volumen máximo de 5,6 L. El cultivo *fed-batch* es un sistema abierto en el que ingresa el oxígeno y las fuentes de carbono y nitrógeno (Figura 18-b).

La construcción del modelo contempló la interacción de los diferentes balances de masa y la definición de una expresión para describir la velocidad específica de crecimiento del microorganismo (μ) a partir del análisis de los resultados de las fermentaciones *batch* y *fed-batch*.

Figura 18. Esquema de la fermentación en (a) *batch* y (b) *fed-batch*



Balances de masa en operación batch

Los balances de masa que expresan la producción de biomasa residual, PHB y los consumos de glicerol, nitrógeno y oxígeno, corresponden a las Ecuaciones 11, 13, 16, 20 y 32, respectivamente.

Balances de masa en operación fed-batch

Para describir la fermentación en operación *fed-batch*, es necesario modificar las ecuaciones planteadas e incluir nuevas variables: el flujo de alimentación (F), las concentraciones de los nutrientes agregados en ese flujo (S_f : 484 g/L y N_f : 18 g/L) y el volumen de trabajo en el biorreactor (V). Este volumen, da el criterio de parada para una fermentación en operación *fed-batch*, ya que todos los

biorreactores cuentan con un volumen máximo de trabajo. En este caso, el volumen máximo de trabajo es 5.6 litros.

En la Tabla 19 se observan las ecuaciones modificadas.

Tabla 19. Formulación general del modelo propuesto modificado para fermentaciones en *fed-batch*

Variable	Ecuación
Volumen de trabajo en el biorreactor (V)	$\frac{dV}{dt} = F$
Biomasa Residual (R)	$\frac{dR}{dt} = (\mu - F/V) * R$
Producto (P)	$\frac{dP}{dt} = k_1 * \mu * R + k_2 * R - \left(\frac{F}{V}\right) * P$
Glicerol	$\frac{dS}{dt} = -(\alpha * \mu + \gamma) * R + \left(\left(\frac{F}{V}\right) * Sf - \left(\frac{F}{V}\right) * S\right)$
Nitrógeno	$\frac{dN}{dt} = -(\mu * k_3 + k_4) * R + \left(\left(\frac{F}{V}\right) * Nf - \left(\frac{F}{V}\right) * N\right)$

3.2.3. Simulaciones y estimación de parámetros

Las simulaciones con el modelo propuesto y la estimación de parámetros se llevaron a cabo utilizando el software EMSO, el cual fue desarrollado en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Los valores iniciales de los parámetros α , γ , k_1 , k_2 , k_3 y k_4 , se estimaron analizando los resultados de las fermentaciones *batch* y *fed-batch*. Para ello se realizó la linealización de las Ecuaciones 13, 18 y 20, obteniéndose las Ecuaciones 33, 34 y 35.

$$\frac{1}{R} \frac{dP}{dt} = k_1 * \mu + k_2 \quad \text{Ecuación 33}$$

$$\frac{1}{R} \frac{dS}{dt} = -(\alpha * \mu + \gamma) \quad \text{Ecuación 34}$$

$$\frac{1}{R} \frac{dN}{dt} = -(k_3 * \mu + k_4) \quad \text{Ecuación 35}$$

Siguiendo la estructura canónica de la ecuación de la recta (Ecuación 36), las gráficas se construyeron como indica la Tabla 20.

$$y = m * x + b \quad \text{Ecuación 36}$$

Tabla 20. Análisis de la estructura linealizada de las ecuaciones de variación de PHB y sustratos con respecto al tiempo

Término	Ecuación 33	Ecuación 34	Ecuación 35
x	μ	μ	μ
y	$\frac{1}{R} \frac{dP}{dt}$	$\frac{1}{R} \frac{dS}{dt}$	$\frac{1}{R} \frac{dN}{dt}$
m	k_1	$-\alpha$	$-k_3$
b	k_2	$-\gamma$	$-k_4$

Los valores experimentales de la velocidad específica de crecimiento fueron calculados mediante integración de la Ecuación 11.

$$\frac{1}{R} * dR = \mu * dt \quad \text{Ecuación 37}$$

$$\int \frac{1}{R} * dR = \int \mu * dt \quad \text{Ecuación 38}$$

$$\ln R|_{R_0}^R = \mu * t|_{t_0}^t \quad \text{Ecuación 39}$$

$$\mu = \frac{\ln(R/R_0)}{t-t_0} \quad \text{Ecuación 40}$$

Tomando $t - t_0 = 1 h$, se obtiene:

$$\mu = \ln(R/R_0) \quad \text{Ecuación 41}$$

Para calcular la velocidad máxima de crecimiento (μ_m), primero se calculó μ empleando la Ecuación 40.

Donde:

R_0 : Concentración de biomasa residual al inicio de la fase exponencial.
(g R/L)

t_0 : Tiempo transcurrido de la fermentación al inicio de la fase exponencial. (h)

Posteriormente, se graficó μ vs t para los puntos pertenecientes a la fase de crecimiento exponencial y se tomó μ_m como la pendiente de la recta resultante.

A partir de las estimaciones iniciales de los parámetros mencionados, se procedió a realizar la estimación final de los parámetros utilizando el software EMSO. El software varía el valor de los parámetros hasta encontrar una solución que minimice las diferencias entre el valor real y el simulado, utilizando la técnica de mínimos cuadrados, con base en la siguiente función objetivo:

$$F_{obj} = \sum_j \sum_i (y_{ij} - \hat{y}_{ij})^2$$

Donde,

y_{ij} valor experimental de la variable j en el tiempo i

$\hat{y}_{ij}$ valor simulado de la variable j en el tiempo i

j variables estudiadas (R, P, S, N, O y μ)

i puntos experimentales

Tanto en la estimación de parámetros como en las simulaciones finales, los valores de $\hat{y}_{ij}$ se obtuvieron utilizando el integrador DASSLC para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales.

3.2.4. Análisis estadístico del modelo propuesto (Gutierrez & de la Vara 2008)

La evaluación de la calidad del modelo obtenido fue evaluado por medio del coeficiente de ajuste R^2 , el cual se interpreta como la proporción de la variabilidad de los datos explicada por el modelo y el error estándar de estimación σ_y , que es una medida del error para cada variable calculada por el modelo.

El error estándar de estimación se calculó para las seis variables estudiadas, utilizando los datos de los cuatro experimentos realizados (Batch y tres Fed-batch), de acuerdo a la siguiente expresión.

$$\sigma_y = \sqrt{\frac{\sum_i \sum_j (y_{ij} - \hat{y}_{ij})^2}{n_T - n_P}} \quad \text{Ecuación 42}$$

Donde,

- σ_y Error estándar de estimación de la variable y
- y_{ij} Valor experimental de la variable y del experimento i en la hora j
- $\hat{y}_{ij}$ Valor simulado de la variable y del experimento i en la hora j
- n_T número total de datos experimentales
- n_P número total de parámetros estimados

Se realizó un test F para evaluar si existen diferencias significativas en las variables estudiadas para los experimentos realizados. Para realizar este test se estimaron dos varianzas. La primera, σ_y^2 , es el cuadrado del error estándar de estimación y representa la estimación del error experimental generado por la técnica de mínimos cuadrados. La segunda, σ_{proc}^2 , evalúa la variabilidad entre

experimentos debido a diferencias en las estrategias de alimentación, fue definida como:

$$\sigma_{proc}^2 = \frac{\sum_j (y_{1j} - y_{2j})^2}{n_e} \quad \text{Ecuación 43}$$

donde,

y_{1j} valor experimental de la variable y en el experimento 1 en la hora j

y_{2j} valor experimental de la variable y en el experimento 2 en la hora j

n_e numero de pares de datos experimentales de la variable y en los experimentos 1 y 2

De este modo se puede definir:

$$F_0 = \frac{\sigma_{proc}^2}{\sigma_y^2} \quad \text{Ecuación 44}$$

Donde

F_0 Estadístico de prueba entre el par de experimentos 1 y 2 para la variable y .

Así, si F_0 es mayor al valor critico de F (F_{TAB}), significa que existen diferencias significativas para la variable y en el subconjunto de experimentos evaluados.

F_{TAB} es el valor límite del intervalo de confianza unilateral con una seguridad de 95%

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

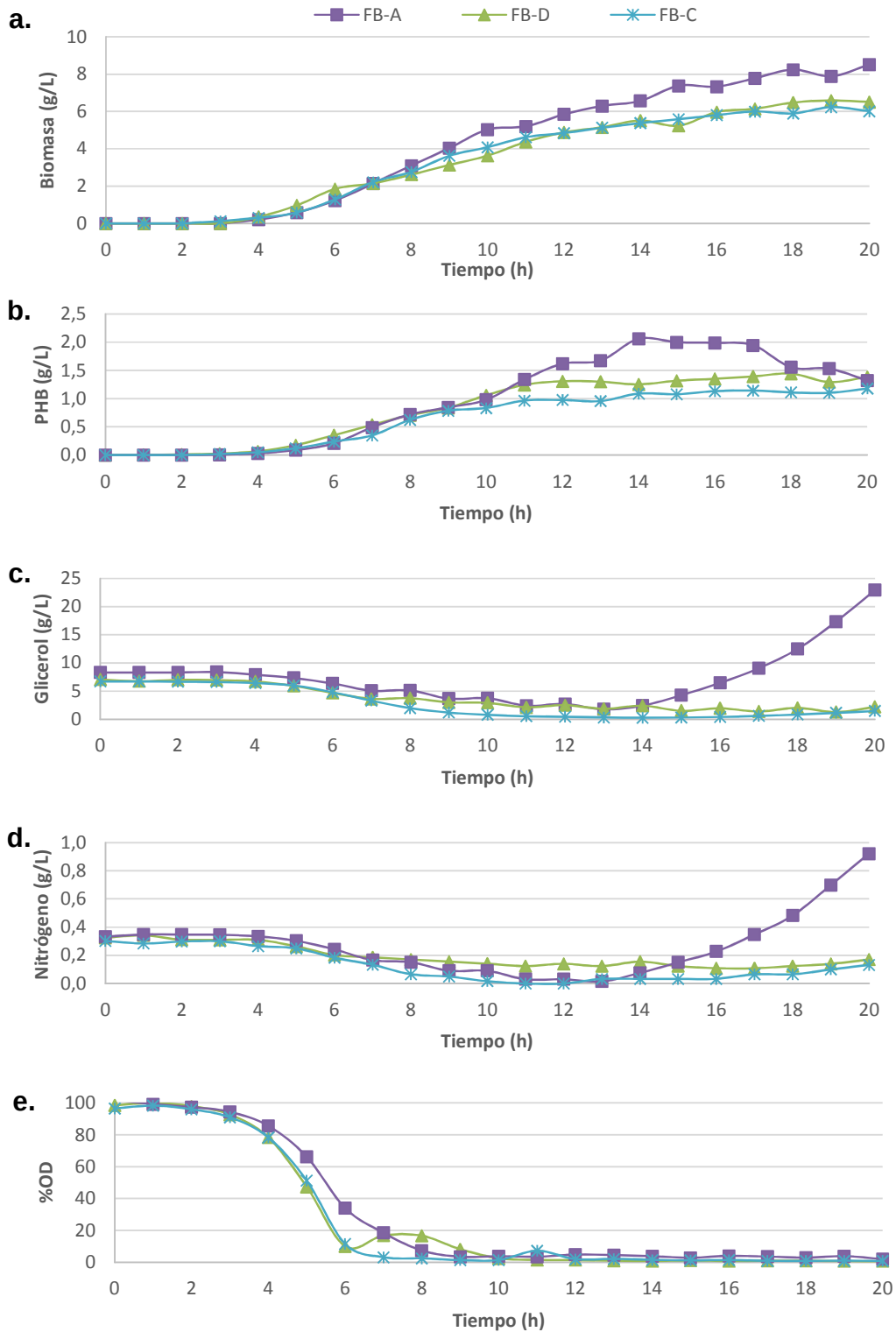
3.3.1. Experimentos en operación *fed-batch*

En la Figura 19-a, se observa que en todos los cultivos realizados se presenta una fase *Lag* de 4 horas. En esta fase de adaptación la concentración promedio de biomasa fue 0.286 ± 0.069 g/L y el consumo promedio de glicerol fue 0.345 ± 0.058 g/L. Los flujos de alimentación evaluados se presentan en la Figura 17.

La biomasa presentó un comportamiento similar en los tres experimentos, alcanzando el valor más alto en la alimentación que garantizó un exceso de las fuentes de carbono y nitrógeno, FB-A (8.52 g/L a las 20 horas de fermentación) y valores similares en las condiciones que existió una limitación de nutrientes, FB-D (6.51 g/L y FB-C: 6.02 g/L a las 20 horas de fermentación).

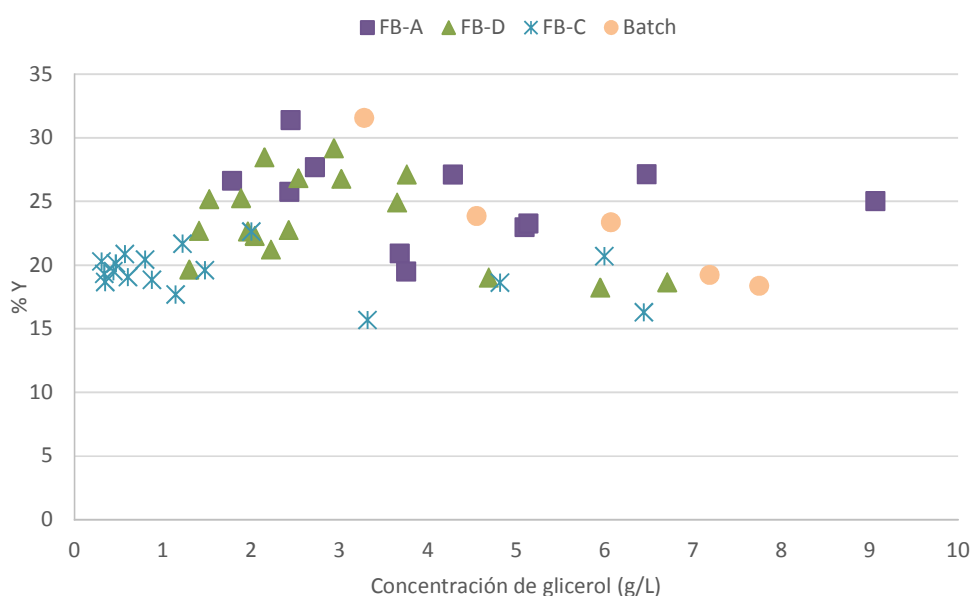
La mayor producción de PHB se alcanzó con la estrategia de alimentación FB-A (2.06 g/L en la hora 14 con una acumulación del 31,38% y una productividad de 0.147 g/(L*h)). En la 18-b y 18-c se observa que la producción de PHB se detuvo a partir de la hora 15, cuando la concentración de glicerol superó 4 g/L. Las alimentaciones discontinua y continua, no fueron favorables para la producción de polímero, puesto que la máxima concentración de PHB alcanzada en los experimentos fue FB-D: 1.38 g/L y FB-C: 1.18g/L, mientras que la estrategia FB-A logró aumentar en un 72% la producción y en un 35% la productividad de PHB con respecto al experimento *batch* (1.20 ± 0.06 g/L y $q=0.109$ g/(L*h)).

Figura 19 Producción de a. biomasa, b. PHB, concentración de c. glicerol, d. nitrógeno y e. porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de fermentación en experimentos *fed-batch*.



En la Figura 20, se presenta el porcentaje de acumulación intracelular de PHB, con respecto a la concentración de glicerol del experimento *batch* y los tres *fed-batch* realizados. Se observa que la mayor acumulación alcanzada esta alrededor de 30% y se obtuvo en los experimentos *batch*, FB-A y FB-D. El experimento FB-C obtuvo acumulaciones cercanas al 20%. La concentración de glicerol que favorece la acumulación es cercana a 3 g/L.

Figura 20. Porcentaje de acumulación intracelular de PHB por *B. megaterium* B2 con respecto a la concentración de glicerol del experimento *batch* y los seis *fed-batch* realizados



La concentración y la acumulación de PHB obtenida por *B. megaterium* B2 es similar a los valores alcanzados por otras cepas de *Bacillus* en cultivo *fed-batch*. En el estudio realizado por Valappil (2007), una cepa nativa de *B. cereus* alcanzó una acumulación y concentración de PHB de 38% y 1.14 g/L en 32 horas ($q=0.036$ g/(L*h)) utilizando glucosa como fuente de carbono. En López (2012), una cepa nativa de *B. megaterium* acumuló un 29% de polímero y obtuvo una concentración de 3.3 g/L en 32 horas ($q=0.103$ g/(L*h)) utilizando glucosa como fuente de carbono. La productividad alcanzada en el experimento FB-A por

B. megaterium B2 ($q=0.147 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$) es mayor que la reportada por los autores citados a pesar de utilizar una fuente de carbono no convencional como lo es el GRIB.

Como se observa en la Figura 19-c y 19-d las concentraciones de glicerol y nitrógeno presentan comportamientos similares, y tienen una relación de consumo C/N aproximadamente de 25. Las velocidades máximas de consumo de glicerol y nitrógeno por parte de *B. megaterium* B2 corresponden a: $2 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ y $0.08 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ respectivamente.

El perfil del porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de fermentación (Figura 19-e) presenta un comportamiento muy similar en los tres experimentos. Durante la fase *Lag*, el consumo de oxígeno es mínimo y después la concentración cae rápidamente hasta estabilizarse (entre las horas 6 y 8) en valores cercanos a cero.

3.3.2. Modelo matemático para la producción de PHB

El desarrollo del modelo para la producción de PHB se basó en los balances de masa desarrollados en la sección 3.1 bajo las siguientes consideraciones operacionales:

- La fase de adaptación de *B. megaterium* B2 no se incluyó en el modelo por lo tanto la hora cuatro (4) del proceso, corresponde a la hora cero (0) del modelo.
- Todos los nutrientes, excepto el glicerol (S), el nitrógeno (N) y el oxígeno (O), se consideran en exceso.
- Las velocidades máximas de consumo de glicerol y nitrógeno por parte de *B. megaterium* B2 corresponden a: $2 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ y $0.08 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ respectivamente.
- La producción de PHB es función de la biomasa residual (R), la velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración de glicerol (S).

Balances de masa

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 20 la producción de PHB se favorece con concentraciones de glicerol cercanas a 3 g/L. Por lo tanto se propone la siguiente expresión:

$$\frac{dP}{dt} = \left(k_1 * \mu * R * \frac{k_7}{1+|k_7-S|} \right) + k_2 * R \quad \text{Ecuación 45}$$

Donde

k_7 constante asociada a la producción de PHB relacionada con el consumo de glicerol (g/L)

Esta expresión se utilizó en el rango de concentración de glicerol de 2 a 5 g/L, para los valores por fuera de este rango se utilizó la Ecuación 13.

En el experimento *batch* se observó que cuando el glicerol se acababa, la bacteria consumía el PHB acumulado. En el experimento FB-A se observó que cuando la concentración de glicerol aumentaba de 12.5 g/L, las células consumían el PHB acumulado. Con el fin de describir estas dos situaciones, se propone la siguiente expresión para describir el consumo de PHB por *B. megaterium* B2:

$$\frac{dP}{dt} = -k_8 * R \quad \text{Ecuación 46}$$

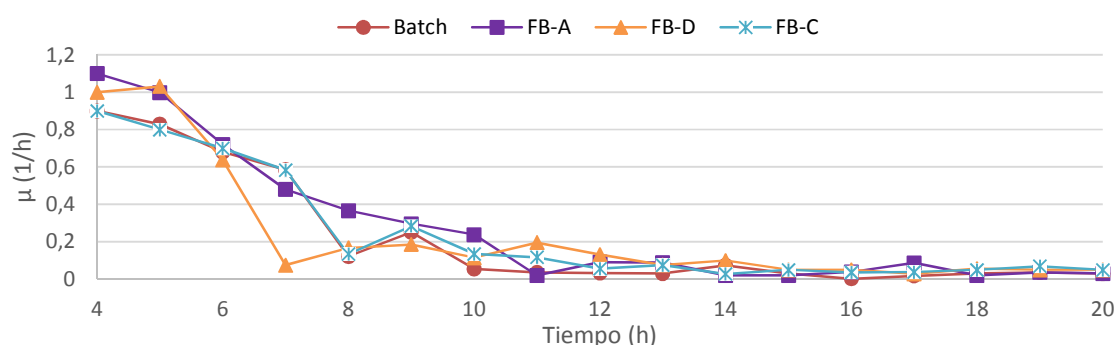
Donde

k_8 constante asociada al consumo de PHB (g PHB/ gR*h)

Expresión de velocidad específica de crecimiento

En la Figura 21, se presentan las velocidades específicas de crecimiento de los experimentos *batch*, FB-A, FB-D y FB-C, calculadas utilizando la Ecuación 41.

Figura 21. Perfil de la velocidad específica de crecimiento de los experimentos *batch*, FB-A, FB-D y FB-C.



La velocidad específica de crecimiento disminuye a través del tiempo y tiene un perfil similar al de la concentración de oxígeno disuelto. *B. megaterium* B2 es un microorganismo aerobio, por lo tanto, la alta disponibilidad de oxígeno favorece el crecimiento del microorganismo. En los experimentos *batch* y *fed-batch* desarrollados el microorganismo fue sometido a condiciones de exceso y déficit de las fuentes de carbono y nitrógeno. En la Figura 19-c y 19-d, se observó que las fuentes de carbono y nitrógeno que tienen un perfil de concentración muy similar, teniendo una relación de consumo C/N de 25. Por lo tanto, la expresión de μ tiene en cuenta solo dos variables: la concentración de oxígeno (O) y la concentración de glicerol (S).

Para hallar la expresión de μ que describe adecuadamente todos los datos de los experimentos *batch* y *fed-batch*, se evaluaron diversas combinaciones de las ecuaciones Monod y sigmoideal. La ecuación que de acuerdo al modelo describe

los resultados obtenidos para la velocidad específica de crecimiento con un coeficiente de ajuste (R^2) superior a 0.9 es:

$$\mu = \mu_m * \left(\frac{S^n}{S^n + K_s^n} + \frac{O}{O + K_O} \right) \quad \text{Ecuación 47}$$

3.3.3. Estimación de parámetros

El modelo planteado tiene 16 parámetros, la estimación de todos los parámetros excepto C_g^* , se llevó a cabo en el software EMSO. El parámetro C_g^* : (concentración de saturación del oxígeno disuelto en el líquido en la interfase gas-líquido ($\text{g O}_2/\text{L}$)), se determinó en el medio de fermentación sin inocular a 34°C con una agitación de 400 rpm y un flujo de aire de 1vvm utilizando un sensor polarográfico calibrado, el resultado fue $0.007 \text{ g O}_2/\text{L}$. Este valor es similar a la solubilidad del oxígeno en agua bajo una presión de aire de 1 atmosfera y 35°C : $0.00752 \text{ g O}_2/\text{L}$ (Doran, 1995).

Para estimar los 15 parámetros restantes, se tomaron los datos de las 17 horas de fermentación (tiempo 4 a 20) de los cuatro experimentos realizados, *batch* y tres *fed-batch*), en total se dispuso de 68 datos para cada variable.

Los valores iniciales de los parámetros μ_m , α , γ , k_1 , k_2 , k_3 y k_4 , son los promedios de las estimaciones realizadas por la linealización explicada en la Sección 3.2.3 (Tabla 21).

Tabla 21. Parámetros estimados linealizando los balances de glicerol, nitrógeno y PHB.

Exp.	Parámetros						
	μ_m (1/h)	α (g S/g R)	γ (g S/(g R*h))	k_1 (g P/g R)	k_2 (g P/(g R*h))	k_3 (g N/g R)	k_4 (g P/(g R*h))
Batch	0.6329	0.9167	0.4484	-0.0413	0.1846	0.0672	0.0078
FB-A	0.6002	1.6124	-0.3434	0.1693	0.0158	0.1247	-0.0262
FB-D	0.6376	0.9617	0.0141	0.1932	0.0201	0.0631	-0.00055
FB-C	0.7003	1.4929	-0.0375	0.1107	0.0105	0.0585	0.0047
Media	0.6427	1.2459	0.0204	0.1080	0.0578	0.0784	-0.0036
σ	0.0418	0.3580	0.3261	0.1054	0.0847	0.0311	0.0155

Se observa que para todos los parámetros, excepto para μ_m , se tienen desviaciones estándar altas en comparación al valor promedio de la variable; este hecho reafirma la necesidad de la optimización de parámetros mediante el uso de software.

De acuerdo a Djelal (2006), los valores de k_La determinados por el método dinámico son mayores en cultivos inoculados que en cultivos estériles. Sin embargo son del mismo orden de magnitud. Esto es debido a que la transferencia de oxígeno se favorece gracias al consumo celular. Para determinar el valor inicial del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, k_La , se determinó experimentalmente por el método dinámico (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009): $0.0129 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$ (46.32 h^{-1}), este resultado es similar al reportado por Faccin (2013): 0.018 s^{-1} , bajo las mismas condiciones de agitación y aireación.

Los resultados de tal estimación son presentados en la Tabla 22.

Tabla 22 Parámetros estimados utilizando el software EMSO

Parámetro	Unidades	Valor
μ_m	1/h	0.648646
N	Adimensional	2.99
K_S	g S/L	4.65031
K_O	g O ₂ /L	0.00557448
k_1	g P/g R	0.28114
k_2	g P/(g R*L)	-0.005005
k_3	g N/g R	0.1186
k_4	g N/(g R*L)	0.00149989
k_5	g O ₂ /g R	0.469182
k_6	g O ₂ /(g R*h)	0.0727053
$k_L a$	1/h	53.9
k_7	g S/L	4.50537
k_8	g P/(g R*L)	0.0218362
α	g S/gR	2.6
Y	g S/(g R*L)	0.0449691

El valor calculado para μ_m (0.648646 h^{-1}) es menor que el estimado por Faccin 2012 ($1.0780 \pm 4.75\text{E}-2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$) para el cultivo de una cepa de *B. megaterium* empleando sacarosa como fuente de carbono, esto es debido a que el glicerol es una fuente de carbono más difícil de asimilar que la sacarosa.

El valor de $k_L a$ (53.9 h^{-1} , 0.015s^{-1}) y la velocidad de consumo de oxígeno por parte del microorganismo (valor máximo $0.097 \text{ mg O}_2/(\text{L*s})$) (Ecuación 29), se encuentran en el rango de valores esperados de acuerdo al estudio realizado por Tribe (1995) : $k_L a$ $0.01 - 0.15 \text{ s}^{-1}$; velocidad de consumo de oxígeno por parte del microorganismo $0.05 - 1 \text{ mg O}_2/(\text{L*s})$.

3.3.4. Evaluación de la calidad del modelo obtenido

En las Figuras 22 y 23 se presenta la comparación entre los valores experimentales y simulados de las seis variables estudiadas utilizando los parámetros presentados en la Tabla 22. En la Tabla 23 se presentan los coeficientes de ajuste y los errores de estimación de cada variable. En la Tabla 24 se presentan los valores de F_0 y el valor de F_{TAB} .

Figura 22 Perfiles de las velocidades específicas de crecimiento en experimentos *batch* y *fed-batch*. Las líneas continuas representan los valores simulados.

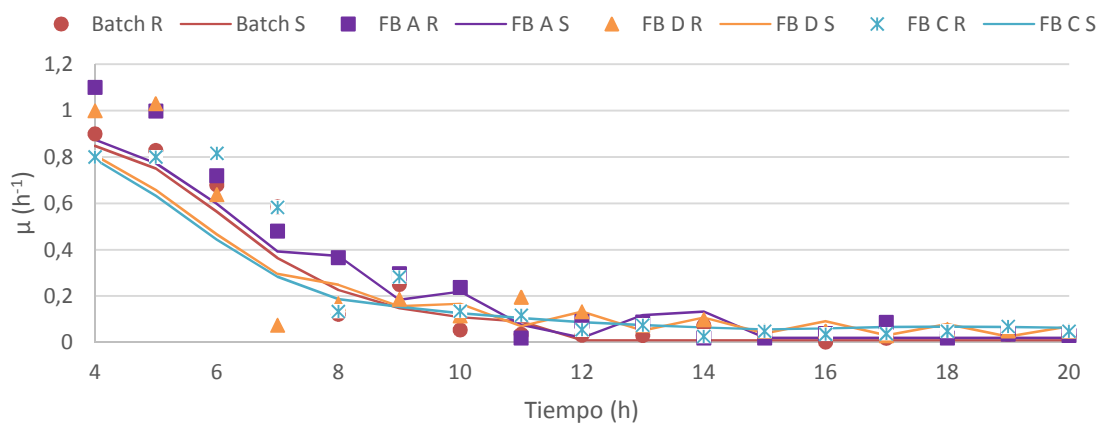


Figura 23 Comparación entre los valores simulados (líneas continuas) y experimentales (puntos) de los experimentos *batch* y *fed-batch*.

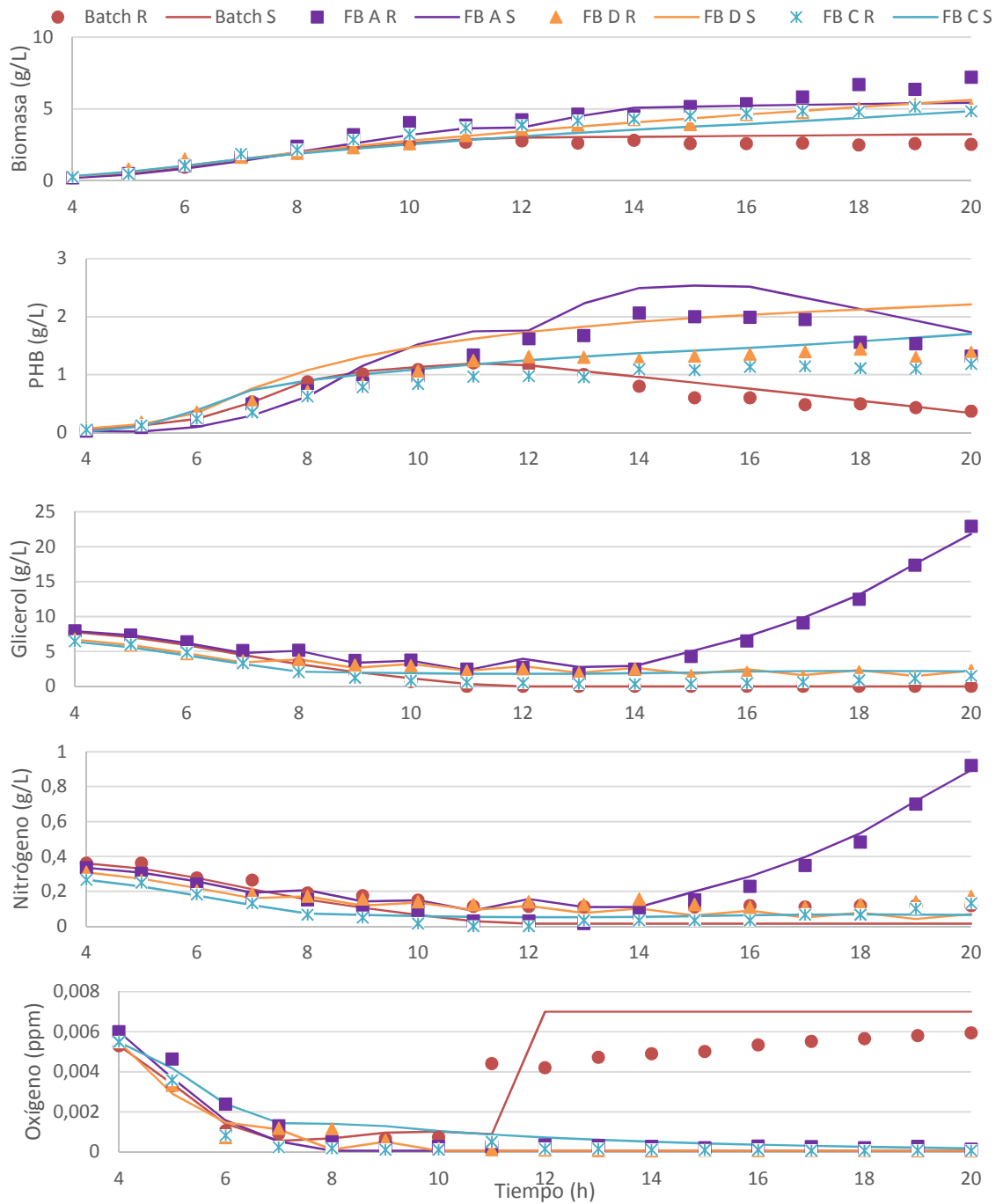


Tabla 23 Coeficientes de ajuste y error estándar de estimación del modelo propuesto

Experimento	Coeficiente de ajuste (R^2)					
	R	P	S	N	O	μ
<i>Batch</i>	0.937	0.952	0.996	0.899	0.819	0.937
FB A	0.943	0.969	0.992	0.984	0.982	0.960
FB D	0.986	0.973	0.978	0.747	0.837	0.848
FB C	0.969	0.964	0.859	0.822	0.791	0.920
Error estándar de estimación						
σ_y	0.576	0.223	0.734	0.065	0.001	0.121

Tabla 24. Valores de F_0 calculados para todos los posibles subconjuntos de datos de los experimentos realizados. F_{TAB} : 1.8193

Conjunto de experimentos	R	P	S	N	O	μ
<i>Batch</i> FB-A	16.307	13.800	126.890	17.570	0.014	0.094
<i>Batch</i> FB-D	6.429	5.898	5.621	0.436	0.015	0.178
<i>Batch</i> FB-C	6.723	3.337	1.529	2.164	0.015	0.012
FB-A FB-D	2.920	2.588	97.335	15.977	0.000	0.144
FB-A FB-C	2.446	5.563	112.301	18.660	0.000	0.084
FB-C FB-D	0.388	0.947	3.388	1.9030	0.000	0.173

De acuerdo a los resultados del test F, existe una diferencia significativa en la producción de biomasa residual y polímero de todos los experimentos realizados, excepto entre el FB-C y FB-D. En cuanto a la concentración de glicerol, no hay diferencias significativas entre los experimentos *batch* y FB-C. Con respecto a la concentración de nitrógeno los experimentos *batch* y FB-D son equivalentes.

No hay diferencia significativa en los valores de oxígeno y velocidad específica de crecimiento de los 4 experimentos. Esto es debido a que todos los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones de limitación de oxígeno y que μ es función de la concentración de oxígeno.

El alto coeficiente de correlación obtenido para la producción de PHB en los cuatro experimentos desarrollados (R^2 promedio 0.919), demuestra la pertinencia de la expresión propuesta (Ecuación 44).

3.4. CONCLUSIONES

Se desarrolló un modelo matemático para describir la producción de PHB por *B. megaterium* B2 el cual además de los balances de biomasa, sustrato y producto, incluyó el balance de oxígeno y una modificación de la ecuación de Luedeking-Piret permitiendo tener en cuenta la influencia de la concentración de glicerol (S). El coeficiente de correlación (R^2), el error de estimación estándar (σ_y) y el test F corroboran la descripción que el modelo realiza del comportamiento de las variables biomasa residual (R), PHB (P), glicerol (S), nitrógeno (N) y oxígeno (O).

Se determinó que la mejor estrategia de alimentación es FB-A, permitiendo obtener una concentración de PHB de 2.06 g/L. Este valor corresponde a un incremento del 72% con respecto a la producción en *batch*.

3.5. REFERENCIAS

Clarke, K. G. (2013). Microbial kinetics during batch, continuous and fed- batch processes Bioprocess Engineering: Woodhead Publishing.

doi: 10.1533/9781782421689.97

Djelal, H., Larher, F., Martin, G., & Amrane, A. Effect of the dissolved oxygen on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing under salt stress conditions. En *Journal of Biotechnology*. 2006. vol. 125(no. 1), p. 95-103.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.005>

Doran, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*: Elsevier Science & Technology Books. 1995.

Faccin, D. J. L., Correa, M. P., Rech, R., Ayub, M. A. Z., Secchic, A. R., & Cardozo, N. S. M. Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. En *J Chem Technol Biotechnol*. 2012. vol. 87, p. 325-333.

Faccin, D. J. L., Rech, R., Secchi, A. R., Cardozo, N. S. M., & Ayub, M. A. Z. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. En *Process Biochemistry*. 2013. vol. 48(no. 3), p. 420-425.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.004>

Gahlawat, G., & Srivastava, A. K. Development of a mathematical model for the growth associated Polyhydroxybutyrate fermentation by *Azohydromonas australica* and its use for the design of fed-batch cultivation strategies. En *Bioresource Technology*. 2013. vol. 137(no. 0), p. 98-105.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.023>

Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En *Biotechnology Advances*. 2009. vol. 27(no. 2), p. 153-176.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>

Greasham, R. L. Media for Microbial Fermentations *Biotechnology* (pp. 128-137). 1993.

Gutierrez, H., & de la Vara , R. *Análisis y Diseño de Experimentos*. México: Mc Graw Hill. 2008.

Khanna, S., & Srivastava, A. K. A Simple Structured Mathematical Model for Biopolymer (PHB) Production. En *Biotechnol. Prog.* 2005. vol. 21, p. 830-838.

Khanna, S., & Srivastava, A. K. Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. En *Biochemical Engineering Journal*. 2006. vol. 27(no. 3), p. 197-203.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.006>

Koller, M., Horvat, P., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlic, A., & Braunegg, G. Assessment of formal and low structured kinetic modeling of polyhydroxyalkanoate synthesis from complex substrates. En *Bioprocess Biosyst Eng.* 2006. vol. 29, p. 367-377.

López, J. A., Naranjo, J. M., Higuera, J. C., Cubitto, M. A., Cardona, C. A., & Villar, M. A. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: outlook on future developments with endospore forming bacteria. En *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2012. vol. 17, p. 250 - 258.

Luong, J. H. T., & Mulchandani, A. Kinetics of biopolymer synthesis: a revisit. En *Enzyme Microb. Technol.* 1988. vol. 10, p. 326-332.

Mahmoudi, M., Sharifzadeh, B., Najafpour, G. D., Tabandeh, F., & Eisazadeh, H. Kinetic model for polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Hydrogenophaga pseudoflava* and verification of growth conditions. En *African Journal of Biotechnology*. 2010. vol. 9(no. 21), p. 3151-3157.

Mavituna, F., & Sinclair, C. Modelling the Kinetics of Biological Activity in Fermentation System. En B. McNeil & L. M. Harvey (Eds.), *Practical Fermentation Technology* (pp. 167-230). Chichester: Wiley. 2008.

Mulchandani, A., Luong, J. H. T., & Groom, C. Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697. En *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1989. vol. 30(no. 1), p. 11-17.

doi: 10.1007/bf00255990

Patwardhan, P., & Srivastava, A. K. Fed-batch cultivation of *Wautersia eutropha*. En *Bioresource Technology*. 2008. vol. 99(no. 6), p. 1787-1792.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.034>

Penloglou, G., Chatzidoukas, C., & Kiparissides, C. Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: An integrated modelling approach and experimental validation. En *Biotechnology Advances*. 2012. vol. 30, p. 329-337.

Penloglou, G., Roussos, A., Chatzidoukas, C., & Kiparissides, C. A combined metabolic/polymerization kinetic model on the microbial production of poly(3-hydroxybutyrate). En *New Biotechnology*. 2010. vol. 27(no. 4), p. 358-367.

Pirouz, F., Ardjmand, M., & Baei, M. S. Kinetics Evaluation of Cell Growth and PHB Production by *Azotobacter beijerinckii* DSMZ 1041. En *World Applied Sciences Journal*. 2011. vol. 14, p. 392-397.

Raje, P., & Srivastava, A. K. Updated mathematical model and fed-batch strategies for poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*. En *Bioresource Technology*. 1998. vol. 64(no. 3), p. 185-192.
doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00173-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00173-9)

RamKumar Pandian, S., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Rameshkumar, N., Jeyaraj, M., & Gurunathan, S. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. En *Bioresource Technology*. 2010. vol. 101(no. 2), p. 705-711.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.040>

Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, & Kalia, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. En *Bioresour. Technol.* 2003. vol. 87, p. 137-146.

Sabra, W., & Abou-Zeid, D. M. Improving feeding strategies for maximizing polyhydroxybutyrate yiel by *Bacillus megaterium*. En *Res. J. Microbiol.* 2008. vol. 3, p. 308-318.

Somashekara, D. M., Rastogi, N. K., & Ramachandriah, S. T. A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. En *New Biotechnol.* 2009. vol. 26, p. 92-98.

Tribe, L. A., Briens, C. L., & Margaritis, A. Determination of the Volumetric Mass Transfer Coefficient (k_La) using the dinamyc "Gas Out - Gas In" method. Analysis of errors caused by dissolved oxygen probes. En *Biotechnology and Bioengineering*. 1995. vol. 46, p. 388-392.

Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, T., Bucke, C., & Roy, I. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. En *Journal of Biotechnology*. 2007. vol. 132(no. 3), p. 251-258.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.03.013>

Wang, J., Fang, F., & Yu, H.-Q. Substrate consumption and biomass growth of *Ralstonia eutropha* at various S₀/X₀ levels in batch cultures. En *Bioresource Technology*. 2007. vol. 98, p. 2599-2604.

Wang, J., Yue, Z.-B., Sheng, G.-P., & Yu, H.-Q. Kinetic analysis on the production of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Cupriavidus necator* with a consideration of substrate inhibition, cell growth, maintenance, and product formation. En *Biochemical Engineering Journal*. 2010. p. 422-428.

CONCLUSIONES GENERALES

B. megaterium B2 fue identificado como la cepa nativa con mayor capacidad para la producción de PHB a partir de glicerol residuo de la industria de biodiesel. Una producción de 0.29 g/L en 14 horas de cultivo *batch* (50 mL de medio) permitió demostrar que el microorganismo asimila este residuo como fuente de carbono.

El proceso de fermentación a temperatura de 34°C, c oncentraciones de glicerol y Na₂HPO₄ de 7.6 g/L y 3 g/L respectivamente, favorece la acumulación intracelular de PHB por *B. megaterium* B2 incrementando un 48% su producción (0.43g/L) con respecto a las condiciones iniciales. Al garantizar la estabilización de pH en 7, un flujo de aire de 1 vvm y una agitación de 400 rpm en un biorreactor de 4L se observó un incremento significativo en la producción de PHB (1.20g/L).

La estrategia de alimentación con flujo ascendente (FB-A), permitió obtener un incremento del 72% en la producción de polímero (2.06 g/L) con respecto a la fermentación en operación batch.

El modelo matemático desarrollado describe satisfactoriamente la producción de biomasa, PHB y el consumo de las fuentes nutricionales (carbono y nitrógeno), sirviendo como base para diseñar una nueva estrategia de alimentación que incrementará la producción de PHB (3.6±0.2 g/L) en 75% con respecto a FB-A.

RECOMENDACIONES

- Emplear el modelo matemático desarrollado como nueva herramienta de predicción en el estudio del proceso, enfocando las actividades en el aumento de la producción y acumulación del polímero.
- Realizar diseños técnicos del escalamiento del proceso, acompañados de estudios de factibilidad financiera. Determinar el punto de equilibrio en función de la producción y acumulación del polímero, a partir del cual la producción de PHB a partir de GRIB empieza a ser viable económicamente.
- Caracterizar térmica y mecánicamente el polímero producido para establecer las posibles aplicaciones industriales.

ANEXO A. PRECIO COMERCIAL DEL PHB

A continuación se presenta la información suministrada por las empresas Biotechnology Co y PHB Industrial S/A con respecto al precio del PHB

- Correo suministrado por representante de PHB Industrial.



- Información suministrada por Biotechnology Co.

BIOMER
biodegradable polymers



Price list: (status: September 1, 2014)

	% Bio	Food	3,5 kg *)	25 kg bag	>200 kg	>=1 ton
Biomer®P209	88,8%	✓	28,57/kg	19,20/kg	14,62/kg	12,25/kg
Biomer®P316	97,8%		29,14/kg	19,36/kg	14,79/kg	12,40/kg
Biomer®P226	89,8%	✓	30,00/kg	19,92/kg	16,22/kg	12,76/kg
Biomer®P304	97,9%		30,29/kg	20,12/kg	15,40/kg	12,90/kg
Biomer®P300	91,8%	✓	30,29/kg	20,20/kg	15,45/kg	12,95/kg
Biomer®P319	97,3%		30,86/kg	20,52/kg	15,70/kg	13,15/kg
Biomer®P310	97,7%	✓	30,86/kg	20,52/kg	15,70/kg	13,15/kg

All prices in Euro exw. Terms: 30 days. Prepayment is needed for new customers. The volume prices relate to single shipments.

*) Test bags will be credited in case we receive an order of 200 kg or more within 6 months after shipping.

When ordering resins for extrusion or food contact (where available) please add the suffixes E or F (e.g. Biomer®P226E or Biomer®P226F)

Biomer, Forst-Kasten-Str. 15, D-82152 Krailling
Tel. +49/89/12 765 136, Fax +49/89/12 765 137, e-mail: mail@Biomer.de

ANEXO B. INFORME PRESENTADO POR CORPOGEN



CORPORACIÓN CORPOGEN
Carrera 5 No 66A-34
Bogotá, Colombia
Tels: 8050118/19 – Ext 101
Fax: 3484607
E-mail: corpogen@corpogen.org
www.corpogen.org

RESULTADO IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PROCARIOTES
ESCUELA DE BACTERIOLOGÍA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL

Bogotá D.C., marzo 11 de 2015

Doctora
CAROLINA GUZMÁN LUNA
Escuela de bacteriología
Universidad Industrial de Santander

Este análisis se hizo sobre dos de los tres aislamientos recibidos el pasado 23 de enero e identificados como B1, B2 y B8

Sobre estas muestras se realizaron los siguientes procedimientos:

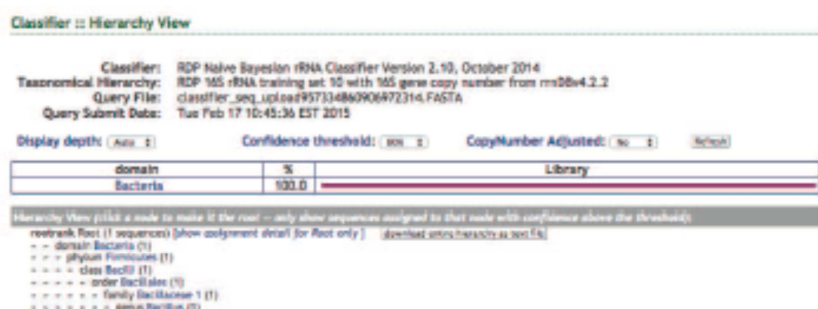
- ✓ Aislamiento y purificación del DNA.
- ✓ Amplificación por PCR de la región de 1465 pb del gen ribosomal 16S.
- ✓ Purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación con los iniciadores 27F, 518F, 800R, y 1492R del gen ribosomal 16S.
- ✓ Limpieza manual de cada una de las secuencias de los fragmentos obtenidos.
- ✓ Ensamblaje de las secuencias y obtención de la secuencia problema.

- ✓ Análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada, mediante la comparación contra las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), Green genes (Lawrence Berkeley National Laboratory) y RDP (Ribosomal Database Project)
- ✓ Alineamiento y generación de un árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema.
- ✓ Clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

RESULTADOS AISLAMIENTO B2

Inicialmente, el clasificador de RDP (Ribosomal Database Project) pudo determinar que se trata de una secuencia de un microorganismo perteneciente al género *Bacillus*, sin embargo el poder de resolución de este clasificador, no permite asignar una especie (Figura 1.1).

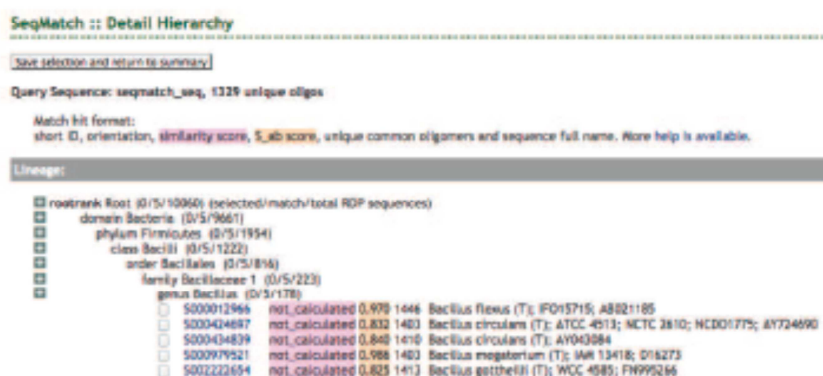
Figura 1.1. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la base de datos RDP.



La búsqueda en la base de datos de 16s Greengenes, clasifico a la secuencia como similar a *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*.

La base de datos de secuencias, del algoritmo Seqmatch-RDP (Figura 1.2) contra aislamientos cultivados indica que la secuencia problema ensamblada es muy similar en la mayoría de su longitud con la cepa tipo identificada como *Bacillus megaterium*.

Figura 1.2. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra SeqMatch-RDP



Los resultados del análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada de 1392 pb contra la base de datos curada del NCBI, Genomic Reference Sequences, RefSeq, indican que tiene un 100% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes *Bacillus megaterium*.

Finalmente, el árbol de distancias (Figura 1.3) construido a partir de las 50 secuencias de microorganismos cultivables más cercanas, disponibles en la base de datos RefSeq del NCBI, muestra que la secuencia problema se agrupa con secuencias de la especie *Bacillus megaterium*, con un soporte de ramas de más del 95%.

Con base en el anterior análisis y teniendo en cuenta que la metodología usada solamente permite identificación confiable hasta nivel de especie, se puede afirmar con un muy alto grado de probabilidad, que la secuencia problema pertenece a la especie *Bacillus megaterium*.

Figura 1.3. Arbol filogenético



Árbol de distancias construido a partir de los 48 mejores "hits" con respecto a la base de datos RefSeq. En rojo, el nodo correspondiente a la secuencia problema

Secuencia ensamblada B2

5'

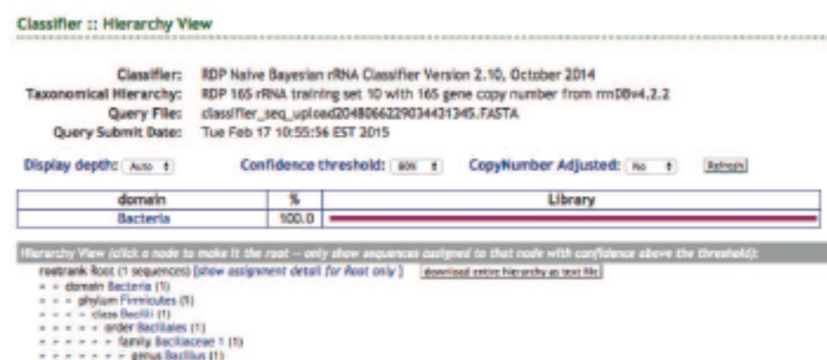
TCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAG
AAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCT
CCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGC
GGTGCAATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCG
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
GTACAAGAGTAACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCA
ACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGA
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAG
GCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG
TTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA
ACTCTAGAGATAGAGCGTTCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGATGGT
TGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGTTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAAT
CCCATAAAACCATTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACCCGCCCG

3'

RESULTADOS AISLAMIENTO B8

Inicialmente, el clasificador de RDP (Ribosomal Database Project) pudo determinar que se trata de una secuencia de un microorganismo perteneciente al género *Bacillus*, sin embargo el poder de resolución de este clasificador, no permite asignar una especie (Figura 2.1).

Figura 2.1. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la base de datos RDP.



La búsqueda en la base de datos de 16s Greengenes, clasifico a la secuencia como similar a *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*.

La base de datos de secuencias, del algoritmo Seqmatch-RDP (Figura 2.2) contra aislamientos cultivados indica que la secuencia problema ensamblada es muy similar en la mayoría de su longitud con la cepa tipo identificada como *Bacillus megaterium*.

Figura 2.2. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra SeqMatch-RDP

SeqMatch :: Detail Hierarchy

[Save selection and return to summary](#)

Query Sequence: seqmatch_seq, 1278 unique oligos

Match hit format:
short ID, orientation, **similarity score**, **E-value score**, unique common oligomers and sequence full name. [More help is available.](#)

Lineage:

```

[+] root: Root (0/5/10083) (selected/match/total RDP sequences)
[+] domain Bacteria (0/5/9684)
[+] phylum Firmicutes (0/5/1954)
[+] class Bacilli (0/5/1222)
[+] order Bacillales (0/5/816)
[+] family Bacillaceae 1 (0/5/223)
[+] genus Bacillus (0/5/178)
[+] S000012960 not_calculated 0.989 1446 Bacillus firmus (T); F015715; AB021189
[+] S000424697 not_calculated 0.837 1403 Bacillus circulans (T); ATCC 4513; MCTC 2610; NC001775; AY724690
[+] S000434839 not_calculated 0.847 1410 Bacillus circulans (T); AY043084
[+] S000979521 not_calculated 0.989 1403 Bacillus megaterium (T); IAM 13418; D16273
[+] S00222654 not_calculated 0.828 1413 Bacillus guthriei (T); WCC 4585; FV995266

```

Los resultados del análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada de 1340 pb contra la base de datos curada del NCBI, Genomic Reference Sequences, RefSeq, indican que tiene un 100% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes *Bacillus megaterium*.

Finalmente, el árbol de distancias (Figura 2.3) construido a partir de las 50 secuencias de microorganismos cultivables más cercanas, disponibles en la base de datos RefSeq del NCBI, muestra que la secuencia problema se agrupa con secuencias de la especie *Bacillus megaterium*, con un soporte de ramas de más del 95%.

Con base en el anterior análisis y teniendo en cuenta que la metodología usada solamente permite identificación confiable hasta nivel de especie, se puede afirmar con un muy alto grado de probabilidad, que la secuencia problema pertenece a la especie *Bacillus megaterium*.

Figura 2.3. Arbol filogenético



Árbol de distancias construido a partir de los 48 mejores "hits" con respecto a la base de datos RefSeq. En rojo, el nodo correspondiente a la secuencia problema

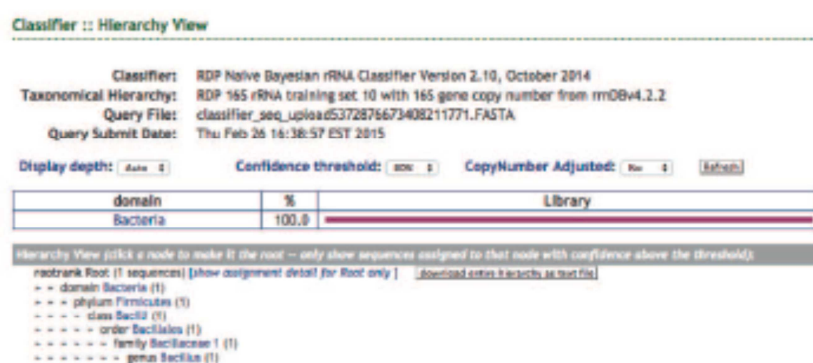
Secuencia ensamblada B8

5'
CTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATA
GGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGA
TGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT
GCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTACAAGAGTAAGTACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGGAACCTGAGTGACAGAGAGAA
AAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACT
GGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGA
GCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
TTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
CCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
CTGGGCTACACAGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGT
CAAGCCAATCCCATAAAACCACTTCAAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTAC
ATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGACACACC
3'

RESULTADOS AISLAMIENTO B1

Inicialmente, el clasificador de RDP (Ribosomal Database Project) pudo determinar que se trata de una secuencia de un microorganismo perteneciente al género *Bacillus*, sin embargo el poder de resolución de este clasificador, no permite asignar una especie (Figura 3.1).

Figura 3.1. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la base de datos RDP.

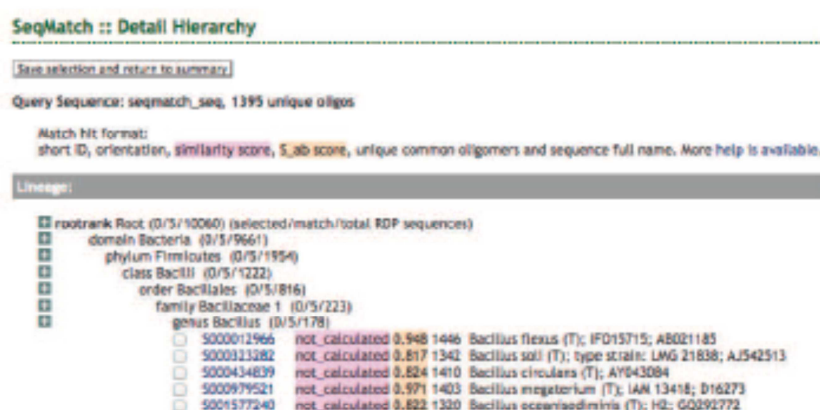


La base de datos de secuencias, del algoritmo Seqmatch-RDP (Figura 3.2) contra aislamientos cultivados indica que la secuencia problema ensamblada es muy similar en la mayoría de su longitud con la cepas tipo identificadas como *Bacillus megaterium*

La búsqueda en la base de datos Greengenes indica que la secuencia problema es muy similar a secuencias de *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*.

Los resultados del análisis taxonómico de la secuencia de 1464 pb contra la base de datos nr del NCBI, indican que tiene un 99,7% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes *Bacillus megaterium* y *Bacillus aryabhattai*.

Figura 3.2. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra SeqMatch-RDP



El árbol de distancias (Figura 3.3) construido a partir de las 50 secuencias de microorganismos cultivables más cercanas, disponibles en la base de datos RefSeq del NCBI, muestra que la secuencia problema se agrupa en el mismo clado con secuencias de *Bacillus megaterium* y *Bacillus aryabhattai*, con un soporte de ramas del 95%.

Bacillus megaterium es una bacteria ubicua mientras que, de acuerdo con una revisión preliminar, *Bacillus aryabhattai*, ha sido únicamente aislada de la estratosfera. Ambas especies se pueden diferenciar por condiciones de crecimiento y fenotipo¹.

Con base en el anterior análisis y teniendo en cuenta que la metodología usada solamente permite identificación confiable hasta nivel de especie, se puede afirmar, que la secuencia problema pertenece al género *Bacillus*, con un muy alto grado de probabilidad de tratarse de *Bacillus megaterium* o *Bacillus aryabhattai*.

Referencias

¹ S. Shivaji, P. Chaturvedi, Z. Begum, P.K. Pindi, R. Manorama, D.A. Padmanaban, Y.S. Shouche, S. Pawar, P. Vaishampayan, C.B.S. Dutt, G.N. Datta, R.K. Manchanda, U.R. Rao, P.M. Bhargava, J.V. Narlikar. *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhattai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59 (2009), pp. 2977–2986

Figura 3.3. Arbol filogenético – Aislamiento B1



Árbol de distancias construido a partir de los 49 mejores "hits" con respecto a la base de datos RefSeq. En rojo, el nodo correspondiente a la secuencia problema

Secuencia ensamblada – Aislamiento B1

5'
TCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAG
AAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCT
CCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGC
GGTGCACTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCG
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA
GTACAAGAGTAACCTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCA
ACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGA
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAG
GCGGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG
TTTCCGCCCTTATGCTGTCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA
ACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGT
TGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAAT
CCCATAAACCATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCCGGGGGAATACCGTTCCCGGGCCT
TGTAACAACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAAGTCGGTGAGT
AACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGG
3'

TABLA RESUMEN DE RESULTADOS

MUESTRA		B1	B2	B8
Longitud de la secuencia ensamblada (pb)		1464	1392	1340
Resultados RefSeq Genomic NCBI	Microorganismo	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
	% de identidad	99,7 %	100 %	100 %
	% de cobertura	100 %	100 %	100 %
Resultados Seqmatch-RDP		<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
Resultados Greengenes		<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
		<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
CONCLUSIÓN	Género	(A)	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
	Espede		<i>megaterium</i>	<i>megaterium</i>

(A) No se puede asignar una especie. Se puede afirmar, con alto grado de probabilidad, que se puede tratar de *Bacillus megaterium* o *Bacillus aryabhattai*.

**CORPORACIÓN CORPOGEN
ÁREA DE PRODUCTOS Y SERVICIOS
SERVICIO DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS**

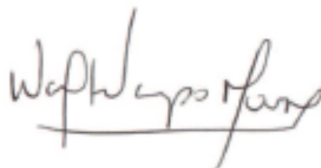
Procesamiento de las muestras – Luz Karime Afanador

Secuencia de ácidos nucleicos - MacroGen Inc. - Corea

Análisis bioinformático – Liliana Pinzón

Revisión general – Walter Ocampo Moure

Anexos - Archivos secuencias sin procesar



Walter Ocampo Moure
Jefe área de productos y servicios
Corporación CorpoGen

-----FIN DEL INFORME-----

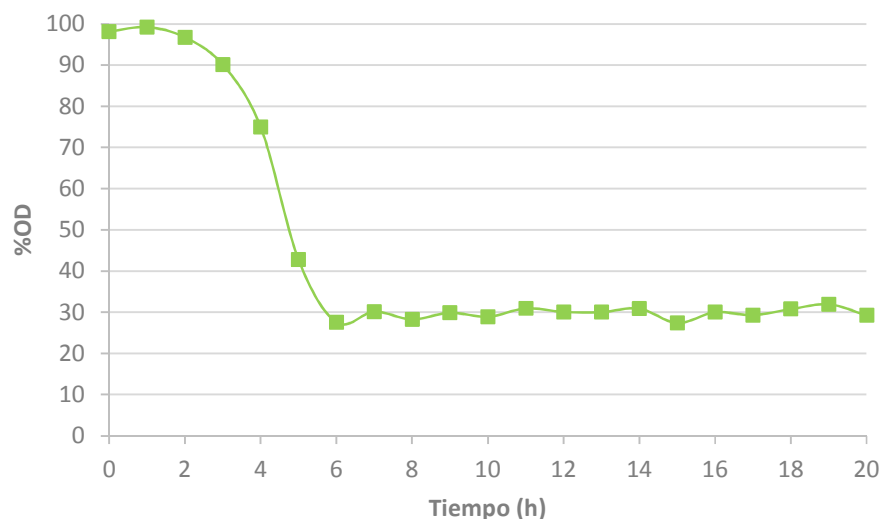
ANEXO C. EXPERIMENTO FED-BATCH A OXIGENO CONSTANTE

Con el fin de determinar si *B. megaterium* B2 presenta el comportamiento reportado por RamKumar Pandian (2010) y Sabra & Abou-Zeid (2008) en bacterias del genero *Bacillus* con relación a la disponibilidad de oxígeno en el medio; se evaluó la influencia del oxígeno disuelto (OD) en la producción de PHB, fijando un valor mínimo en el proceso de 30% de saturación en el medio de fermentación. Se decidió realizar un cultivo en modo *fed-batch* para prolongar la duración del experimento, permitiendo de esta manera observar la influencia del oxígeno en la acumulación de PHB durante el tiempo.

El control del OD disuelto se realizó mediante variaciones de la agitación del medio (400–700 rpm) y el flujo de aire suministrado al fermentador (1–4 vvm). Se empleó el medio de sales optimizado presentado en el capítulo dos del documento. Con el fin de garantizar la presencia de las fuentes de carbono y nitrógeno, a partir de la hora 7 se inició la alimentación de glicerol (484 g/L) y nitrógeno (18 g/L) a un flujo de 15 mL/h, utilizando una bomba peristáltica, después de 12 horas de operación el flujo se aumentó a 35 mL/h hasta la hora 16 en donde posteriormente se aumentó a 57 mL/h hasta la hora 20 del proceso.

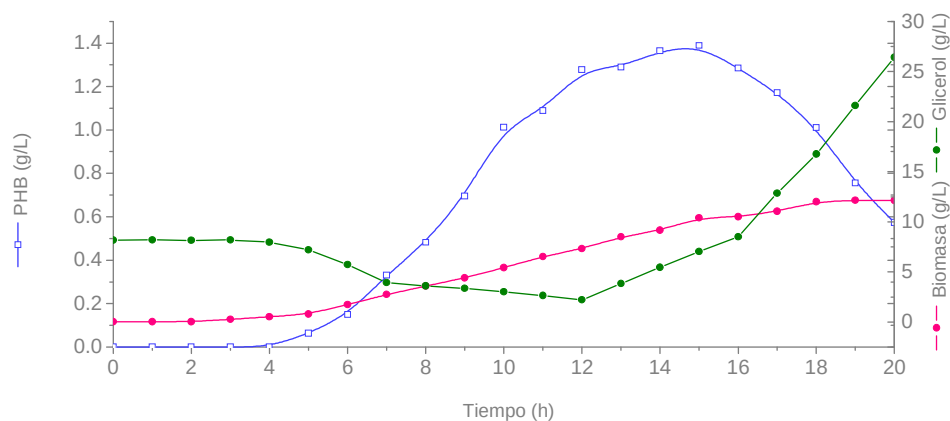
En la Figura 24 se presenta el perfil del porcentaje de OD en el medio de fermentación durante el proceso.

Figura 24 Porcentaje de OD en el medio de fermentación con un valor mínimo de 30%



En la Figura 25 se presentan los resultados de la fermentación de *B. megaterium* B2 manteniendo el OD en un valor mínimo de 30%. Se observa una fase *Lag* de 4 horas seguida de una fase exponencial que se mantuvo durante todo el experimento alcanzando una concentración de biomasa de 12.1 g/L. La producción de PHB alcanzó una concentración máxima de 1.4 g/L en la hora 15 del proceso con una acumulación intracelular ($Y_{P/X}$) de 15%, lo cual representa una disminución de 50% con respecto a la máxima acumulación obtenida en el experimento en Batch (31%). Después de la hora 15, el microorganismo inicia el consumo del PHB, disminuyendo la concentración y acumulación intracelular del polímero hasta 0.6 g/L y 5%, respectivamente.

Figura 25. Producción de biomasa, PHB y consumo de glicerol por *B. megaterium* B2 manteniendo el OD en un valor mínimo de 30%



Por lo tanto, se corrobora que para la producción de PHB por *B. megaterium* B2 es aconsejable limitar la disponibilidad de oxígeno en el medio. Para ello se plantea continuar con la estrategia de aeración y agitación empleada en los cultivos *batch*.

REFERENCIAS

RamKumar Pandian, S., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Rameshkumar, N., Jeyaraj, M., & Gurunathan, S. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. En *Bioresource Technology*. 2010. vol. 101(no. 2), p. 705-711.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.040>

Sabra, W., & Abou-Zeid, D. M. Improving feeding strategies for maximizing polyhydroxybutyrate yield by *Bacillus megaterium*. En *Res. J. Microbiol.* 2008. vol. 3, p. 308-318.